

# **Biotechnologická produkcia kyseliny hyalurónovej**

Veronika Hanúsková

---

Bakalárska práca  
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika Hanúsková**  
Osobní číslo: **T11603**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Biotechnologická produkce kyseliny hyaluronové**

Zásady pro vypracování:

1. Charakteristika kyseliny hyaluronové, její vlastnosti, biologická aktivita a využití.
2. Metody produkce kyseliny hyaluronové.
3. Biotechnologická produkce hyaluronanu, princip.
4. Produkční organizmy.
5. Izolace a purifikace konečného produktu.
6. Srovnání biotechnologické produkce s dalšími možnostmi výroby, výhody, nevýhody.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. NEČAS, J., BARTOŠÍKOVÁ, L., BRAUNER, P., KOLÁR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med.* 2008, vol. 53, no. 8, p. 397-411.
2. KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R., GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, vol. 29, p. 17-25.
3. SHALABY, W. S., BURG, K. J. L. Absorbable and biodegradable polymers. CRC Press, 2003, 304 s. ISBN 978-0-8493-1484-1.
4. PHILLIPS, O. G., KENNEDY, J. F., WILLIAMS, A. P. Hyaluronan: Chemical, biochemical and biological aspects. Woodhead Publishing Ltd., 2002, 560 s. ISBN 1-85573-570-9.
5. ANDRE, P. Hyaluronic acid and its use as a rejuvenation agent in cosmetic dermatology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. 2004, 4, p. 218-222.

Vedoucí bakalářské práce:

**RNDr. Iva Hauerlandová, Ph.D.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

**10. února 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**23. května 2014**

Ve Zlíně dne 10. února 2014

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
děkan



  
Ing. Martina Černeková, Ph.D.  
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: HANUSKOVÁ VERONIKA

Obor: T.V.T.K.D.....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 22. 5. 2014

Hanusková Veronika

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Táto bakalárska práca sa zameriava na základné vlastnosti a biotechnologickú výrobu kyseliny hyalurónovej, jej separáciu, purifikáciu a následné využitie. Zahrňuje tiež vzájomné porovnávanie rôznych výrobných procesov a ich vzájomné výhody a nevýhody. Ďalej pojednáva o produkčných mikroorganizmoch, ktoré tvoria túto kyselinu a o ich metabolických cestách, ktoré k tejto tvorbe vedú. Bežne používané mikroorganizmy pre túto výrobu sú mikroorganizmy rodu *Streptococcus*, najmä *Streptococcus zooepidemicus* a potom geneticky modifikovaný *Bacillus subtilis*. Jednou z najväčších výhod biotechnologickej produkcie je z pohľadu priemyslu jej rentabilita.

Kľúčové slová: kyselina hyalurónová, *Streptococcus zooepidemicus*, *Bacillus subtilis*, purifikácia

## **ABSTRACT**

This bachelor's thesis aims at the primary features and biotechnological production of hyaluronic acid. It deals with its separation and purification processes as well as its following usage. Furthermore, it mutually compares different production processes and covers their advantages and disadvantages. The thesis discusses not only various production microorganisms forming this acid but also their metabolic processes leading to this formation. A genus of microorganisms *Streptococcus* is commonly used for this production, mainly *Streptococcus zooepidemicus* and then genetically modified *Bacillus subtilis*. As far as industry is concerned, one of the biggest advantages of biotechnological production is undoubtedly its rentability.

Keywords: hyaluronic acid, *Streptococcus zooepidemicus*, *Bacillus subtilis*, purification

Dovoľujem si poďakovať sa vedúcej bakalárskej práce RNDr. Ive Hauerlandovej, Ph.D. za odbornú pomoc a cenné rady, ktoré mi poskytla pri jej vypracovaní.

Prehlasujem, že odovzdaná verzia bakalárskej práce a verzia elektronická nahraná do IS/STAG sú totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	<b>11</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA KYSELINY HYALURÓNOVEJ</b> .....	<b>12</b>
1.1 VLASTNOSTI HA .....	13
1.1.1 Reologické a viskoelastické vlastnosti.....	13
1.1.2 Hygroskopickosť .....	13
1.2 BIOLOGICKÁ AKTIVITA .....	13
1.2.1 Oprava tkanív .....	14
1.2.2 Kyselina hyalurónová a nádorové ochorenia .....	14
1.2.3 Humektant .....	15
1.3 VYUŽITIE.....	15
1.3.1 Lineárna forma .....	15
1.3.2 Derivovaná forma.....	17
1.3.3 Sieťovaná forma .....	17
<b>2 METÓDY PRODUKCIE KYSELINY HYALURÓNOVEJ</b> .....	<b>18</b>
2.1 EXTRAKCIA .....	19
2.1.1 Extrakcia z kohútích hrebienkov .....	20
2.1.2 Extrakcia z rybích očí.....	20
2.2 FERMENTÁCIA .....	21
2.3 <i>IN VITRO</i> PRODUKCIA .....	22
<b>3 BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCIA HYALURONANU</b> .....	<b>25</b>
3.1 BIOSYNTÉZA KYSELINY HYALURÓNOVEJ <i>S. ZOOEPIDEMICUS</i> .....	25
3.1.1 Fermentačné podmienky a médium .....	26
3.1.2 Kultivačné techniky .....	28
3.2 BIOSYNTÉZA KYSELINY HYALURÓNOVEJ NEPATOGÉNNYMI MIKROORGANIZMAMI .....	29
3.2.1 <i>Bacillus subtilis</i> .....	30
3.2.2 <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	31
<b>4 PRODUKČNÉ MIKROORGANIZMY</b> .....	<b>32</b>
4.1 STREPTOKOKY.....	32
4.1.1 Pyogénne streptokoky .....	33
4.1.2 Iné streptokoky .....	33
4.2 NEPATOGÉNNÉ MIKROORGANIZMY .....	34
<b>5 IZOLÁCIA A PURIFIKÁCIA KONEČNÉHO PRODUKTU</b> .....	<b>36</b>
5.1 SEPARÁCIA A PURIFIKÁCIA HA PO STREPTOKOKOVEJ FERMENTÁCIÍ .....	36
5.2 TANGENCIÁLNA MIKROFILTRÁCIA.....	37
<b>6 POROVNANIE BIOTECHNOLOGICKEJ PRODUKCIE S ĎALŠÍMI     MOŽNOSŤAMI VÝROBY</b> .....	<b>38</b>
6.1 POROVNANIA .....	38
<b>ZÁVER</b> .....	<b>40</b>
<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY</b> .....	<b>41</b>
<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK</b> .....	<b>46</b>



<b>ZOZNAM OBRÁZKOV .....</b>	<b>48</b>
<b>ZOZNAM TABULIEK .....</b>	<b>49</b>
<b>ZOZNAM PRÍLOH.....</b>	<b>50</b>

## ÚVOD

Kyselina hyalurónová je polysacharid, glykosaminoglykán tvorený z opakujúcich sa jednotiek D-glukurónovej kyseliny a N-acetylglukóزامínu. Bežne sa vyskytuje v rôznych tkanivách, kde zastáva rôzne funkcie, slúži napríklad ako lubrikant, hydratačná látka, plnivo alebo biologicky aktívna látka. Je teda prirodzenou súčasťou nášho organizmu, či už v kĺbovej tekutine, očnej bulve, koži alebo pupočnej šnúre. V poslednej dobe je veľmi žiadaná a používaná v komerčne dostupnej kozmetike v medicíne a iných odvetviach. Jej dopyt je spôsobený jej výnimočnými vlastnosťami. To podnietilo štúdium ohľadom jej ekonomickej výhodnej výroby a jej ďalších možných využití. Pôvodne sa kyselina hyalurónová získavala extrakciou z kohútích hrebienkov, ale dnes sa už väčšinou vyrába pomocou biotechnológií s využitím mikroorganizmov. Tieto mikroorganizmy produkujú kyselinu hyalurónovú prirodzene alebo sú k tomu modifikované metódami génového inžinierstva. O bezpečnosti geneticky modifikovaných mikroorganizmoch a ich produktoch sa neustále vedú polemiky, majú svojich prívržencov aj odporcov.

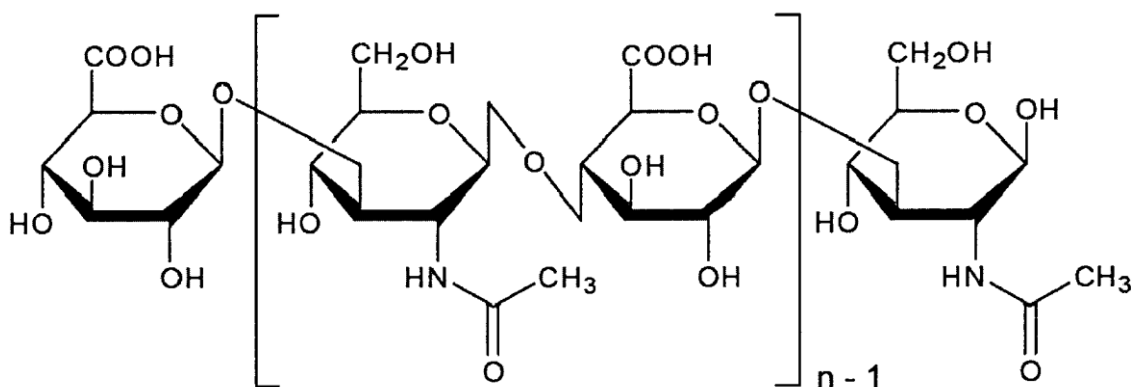
Dlhý čas sa skúmali optimálne podmienky výroby kyseliny hyalurónovej a následne jej výhodná izolácia a purifikácia, tak aby výťažok bol čo najväčší a najväčšej kvality, keďže pre vyrábajúce firmy je zisk prvoradý.

V tejto bakalárskej práci sú zhrnuté základné vlastnosti tohto unikátneho polyméru, jeho biotechnologická výroba a mikroorganizmy, ktoré je možné využiť pre produkciu. Posledná kapitola je venovaná porovnaniam jednotlivých postupov.

## **I. TEORETICKÁ ČASŤ**

## 1 CHARAKTERISTIKA KYSELINY HYALURÓNOVEJ

Kyselina hyalurónová (HA) bola prvýkrát izolovaná v roku 1934 Karolom Meyrom a jeho asistentom Jánom Palmerom zo sklovca kravieho oka. Jej názov je odvodený od gréckeho slova *hyalos*, čo znamená sklo, a anglického spojenia *uronic acid*, ktoré sa prekladá ako uronová kyselina. Termín hyaluronan bol zavedený v roku 1986 v súlade s medzinárodnou nomenklatúrou polysacharidov, a to tak, aby obsahol rôzne formy HA (kyselina hyalurónová, sodná alebo jej iná soľ). Kyselina hyalurónová je zložená z opakujúceho sa disacharidu. Tento disacharid sa skladá z monosacharidu D-glukurónovej kyseliny, ktorá sa viaže beta-1,3 väzbou na druhý monosacharid N-acetylglukózáminu. Následne sú tieto disacharidy pospájané v polymérbeta-1,4 glykozidickou väzbou. Jej základná štruktúra je znázornená na obr. 1.



Obr. 1. Základná štruktúra kyseliny hyalurónovej [6].

Táto kyselina patrí do skupiny glykozaminoglykánov (GAGs), pričom je konštrukčne najjednoduchšia. Ako jediná nie je kovalentne viazaná na ošové bielkoviny, nesyntetizuje sa v Golgiho aparáte a nie je sulfátovaná. V ľudskom tele sa vyskytuje skoro vo všetkých telesných tekutinách a tkanivách ako sodná alebo iná soľ, pričom sa jej vlastnosti výrazne nemenia. Je napríklad súčasťou sklovca oka, kĺbov ako súčasť synoviálnej tekutiny (kĺbové mazivo), kože, svalov, pupočnej šnúry atď.[1, 6, 7]

Dĺžka reťazca je rôzna, záleží to na jej pôvode. Býva to zvyčajne okolo  $10^4$  až  $10^7$  daltonov (Da). [2]

## 1.1 Vlastnosti HA

Väčšina vlastností je odvodená od správania sa HA v roztoku. V ňom je molekula stabilizovaná vodíkovými väzbami, ktoré sú rovnobežné s osou reťazca. Polyméry zaujímajú helikálnu špirálovitú konfiguráciu, ktorá dáva molekule v roztoku celkovú štruktúru špirály. Polomer otáčania je asi 200 nm, takže špirála môže byť považovaná za vysoko hydratovanú guľu schopnú viazať až tisíc krát väčšie množstvo vody než je vlastná hmotnosť polyméru. Hlavná časť vody je mechanicky imobilizovaná vo vnútornej časti sférickej štruktúry a nie je na polysacharid chemicky viazaná. [9]

### 1.1.1 Reologické a viskoelastické vlastnosti

Charakter kyseliny hyalurónovej vo vodnom roztoku prechádza z newtonského na neneutronský. Jej správanie zodpovedá pseudoplasitickej kvapaline, čo znamená, že jej viskozita klesá so zvyšujúcou sa rýchlosťou šmykovej deformácie. Jej viskozita taktiež klesá aj pri konštantnej rýchlosti šmykovej deformácie v čase. Thixotropné správanie kyseliny sa často využíva v lekárstve. Intenzita tohto správania rastie s molekulovou hmotnosťou a koncentráciou. Čím vyššia je koncentrácia a molekulová hmotnosť, tým vyššiu viskoelasticitu má roztok. Viskoelasticita roztokov HA je tiež závislá od hodnoty pH a od iónovej sily prostredia. [13, 20]

### 1.1.2 Hygroscopicita

Vysoká schopnosť viazať vodu je spojená s hydrofóbnym chemickým charakterom kyseliny. Keďže sú na reťazci prítomné karboxylové skupiny, pri fyziologickom pH sa správa ako polyelektrolyt a v prítomnosti vody je teda schopná zväčšiť svoj objem až 1000-násobne. Vďaka svojej schopnosti viazať vodu ju zadržuje v tkanive, a tak môže zmeniť objem kože a jej stlačiteľnosť. [6, 20]

## 1.2 Biologická aktivita

Biologickú aktivitu HA vo všeobecnosti najviac ovplyvňuje jej molekulová hmotnosť. Čím je vyššia, tým menšia je biologická aktivita v zmysle regulácie pochodov v organizme alebo regulácie buniek. Vysokomolekulárna HA teda zastáva väčšinou úlohu štruktúrnej jednotky. Nízkomolekulárna HA (s molekulovou hmotnosťou pod 500 kg/mol) má vysokú biologickú aktivitu, ktorá sa zväčšuje so znižujúcou sa molekulovou hmotnosťou, vplýva na rôzne pochody v tkanivách a bunkách. Hyaluronan sa vyskytuje v tkanivách v dvoch

rôznych formách – ako viazaný v extracelulárnom matrice alebo voľne ako humektant (koža), lubrikant (kĺbový maz), látka udržiavajúca tvar (očná buľva) či ako zložka plniva (pupočná šnúra). [7]

Takmer polovica z celkovej HA vyskytujúcej sa v tele je sústredená v koži v intracelulárnom priestore (až 2,5 g/l). Koža je najväčším orgánom, tvorí asi 1/10 celkovej hmotnosti a má plochu asi 1,5 až 2 m<sup>2</sup>. V pokožke HA priaznivo ovplyvňuje hojenie rán, degeneratívne ochorenia alebo starnutie. Ďalšou funkciou hyaluronanu je ochranná funkcia, podieľa sa na tvorbe ochrannej bariéry kože. Má rolu zachytávača voľných radikálov, ktoré vznikajú v dôsledku ultrafialovej zložky slnečného žiarenia. [6]

### 1.2.1 Oprava tkanív

HA podporuje angiogézu a je neimunogénna. Bolo dokázané, že ak sa pri hojení rán zvýšila hladina HA napríklad lokálnou aplikáciou, došlo k rýchlejšiemu zahojeniu a redukcii zjazvenia. HA ako väčšinová zložka extracelulárneho matrixu prispieva k hojeniu rán prostredníctvom opravy a zvýšenia pevnosti tkanív. Kolagén produkovaný fibroblastmi je jedným z kľúčových faktorov pri obnove podporného matrixu v mieste poranenia a práve kolagén do značnej miery určuje konečnú povahu a vzhľad jaziev. Príčinou tvorby hypertrofických jaziev je zvýšená tvorba kolagénu, najmä kolagénu I a III, ktorý nie je degradovaný. Fragmenty HA stimulujú proliferáciu fibroblastov a v mieste jazvy znižujú celkovú produkciu kolagénu v týchto bunkách. [25, 26]

Kyselina hyalurónová je tiež častou zložkou preparátov určených k hojeniu rán. Vplyvom HA peny na hojenie poraneného tkaniva sa zaoberali Cho a kol. Autori zistili, že pri aplikácii polyuretánovej peny impregnovanej sulfadiazínom strieborným, ktorá obsahovala kyselinu hyalurónovú, sa po týždni od aplikácie na experimentálnom modeli znížila veľkosť rany o 77% a koža bola na úrovni potkanej bez zápalu alebo žltej chrasty. [4, 14, 35]

### 1.2.2 Kyselina hyalurónová a nádorové ochorenia

Rakovina sa dá všeobecne definovať ako súbor rozličných chorôb. Tieto choroby sa charakterizujú ako nekontrolovateľný rast buniek, ktorý vedie k invázii tkanív a následnému roznášaniu do ostatných častí tela (metastázovanie). Prežitie rakovinových buniek závisí na ich schopnosti adhézie na tkaninový matrix, aby sa mohli rozmnožovať, migrovať a napádať ostatné tkanivá bez toho, že by si ich imunitný systém všimol a zakročil voči nim. HA má širokú škálu aktivity v tele, čím môže byť vysvetlený vysoký počet receptorov

viažucich túto kyselinu. Sú to napríklad receptory na povrchu buniek, receptor sprostredkujúci motilitu, transmembránové proteíny, receptory pre endocytózu, intracelulárne proteíny a iné. Bolo dokázané, že výška hladiny HA je zvýšená pri rôznych rakovinových tkanivách a predpokladá sa, že sa tu tvorí menej hustá medzibunková hmota, čím sa zvyšuje pohyblivosť buniek rovnako ako schopnosť invázie do iných tkanív. Hyaluronan môže slúžiť ako ukazovateľ pre progresiu rôznych nádorov. Je zapojený do všetkých aspektov správania rakovinových buniek, čo môže viesť k potlačeniu alebo, naopak, k podpore rozvoja týchto buniek v závislosti od okolností. Úloha hyluronanu pri rozvoji rakoviny ešte nie úplne známa. [1, 10, 11, 12]

### 1.2.3 Humektant

HA sa so svojimi vlastnosťami radí medzi humektanty. Sú to látky, ktoré zvyšujú obsah vody vo vrchných vrstvách kože a dopĺňajú látky prirodzeného hydratačného faktoru kože (Natural Moisturizing Factor. NMF). NMF je skupina hydrofilných látok, medzi ktoré patria aminokyseliny, cukry, kyselina mliečna, kyselina pyrrolidon karboxylová alebo močovina. Prirodzenou zložkou NMF je HA a to predovšetkým vďaka tomu, že má vo svojej štruktúre veľa hydroxylových skupín, schopných viazať veľké množstvo vody. Je teda hygroskopická a zadržuje vodu, čím zabraňuje jej vyparovaniu vplyvom zmien teploty a vlhkosti. [7, 8, 36]

## 1.3 Využitie

HA má široké využitie v medicíne a kozmetike, vrátane liečby osteoartritídy, očnej chirurgie, plastickej chirurgie, podávania liekov, hydratácie kože, hojenia rán a v tkaninovom inžinierstve. Jej molekuly majú rovnakú štruktúru vo všetkých druhoch a vo všetkých tkanivách, preto nevyvoláva žiadnu imunitnú odozvu. HA sa používa tak, ako sa prirodzene vyskytuje, t.j. v lineárnej forme. Aby sa však mohla účinne použiť pre viac účelov, je potrebná jej chemická modifikácia. Pod pojmom modifikácia sa v našom prípade myslí derivácia a sieťovanie. Zobrazenie týchto foriem je vidieť na obr. 2. [4, 20]

### 1.3.1 Lineárna forma

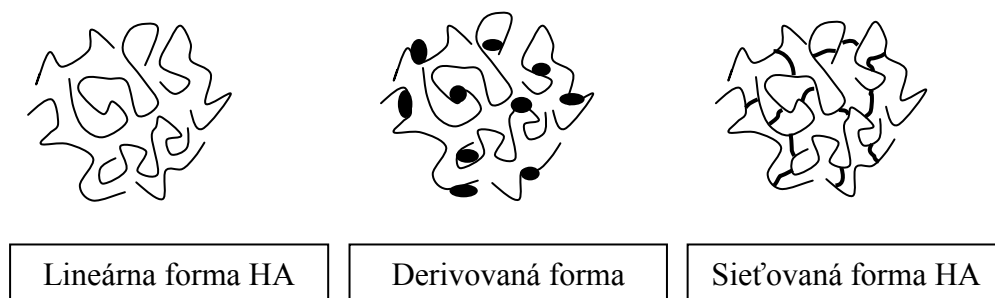
HA sa bežne vyskytuje v lineárnej forme a v tejto forme sa aj používa v oblastiach kozmetiky, v medicíne pri hojení rán alebo v očnom lekárstve. V kozmetike sa uplatňujú v radách krémov. Väčšina firiem má krémy na báze kyseliny hylurónovej a prezentujú jej účinnosť pri vyhladzovaní vrások a jej hydratačné vlastnosti. Vrásky sa objavujú na koži v dôsledku

vyčerpania HA a starnutia. Krémy s touto kyselinou hydratujú kožu a zvyšujú jej elasticitu, čím znižujú hĺbku vrások. V skutočnosti sa však po nanosení jej roztoku na kožu na nej vytvorí tenká vrstva, ktorá absorbuje vzdušnú vlhkosť a týmto spôsobom hydratuje pokožku a vypĺňa vrásky. Navyše údajne stimuluje migráciu epidermálnych buniek. Ďalšou jej výhodou je, že udržiava biologicky aktívne látky obsiahnuté v danom kozmetickom prostriedku na mieste nanosenia a pomáha im ľahšie prenikat' do kože, čo sa využíva aj vo farmakológii. HA tiež chráni pokožku pred UV žiarením. [20]

Ďalší možné využitie HA je v oblasti transportu liečiv vo farmakológii. HA umožňuje lepšie prenikanie niektorých látok do pokožky a ich udržanie na mieste pôsobenia. Napríklad pomáha liečivu diklofenaku prenikat' cez stratum corneum do epidermis. Diklofenak sa používa pri liečbe aktinickej keratózy. Liečivá tohto typu sa využívajú najmä pri všeobecných kožných podráždeniach a poraneniach, akými sú odreniny, oblasti kožných štepov, prvý a druhý stupeň popálenia, chirurgické rezy, niekedy aj na metabolické a cievne vredy či preležaniny. [20]

V očnom lekárstve (oftalmológii) sa HA využíva vďaka jej viskoelastickým vlastnostiam. Vysoká viskozita v statickom stave umožňuje manipuláciu s očným tkanivom, nízka viskozita pri vysokej rýchlosti šmykovej deformácie nám dovoľuje jej vstrekovanie či jej nasávanie. Naopak, elasticita chráni očné bunky pred poškodením lekáorskými nástrojmi či implantátmi. Používajú sa hlavne pri implantácii očnej šošovky, pri transplantáciách rohovky, pri glaukóme (zelený zákal) a pri operáciách sietnice. Okrem chirurgie sa využíva aj v rôznych roztokoch, ktoré sú určené pre výplach očí. Tam sa používa pre stabilizáciu slzného filmu, hydratáciu a ako lubrikant rohovky.

Ďalšia možnosť použitia lineárnej HA je v urológii, kde sa využíva v poslednej dobe ako účinná alternatívna liečba intersticiálnej cystitídy, recidivujúcich infekcií močových ciest a hemoragickej cystitídy. Táto liečba je však stále obmedzená. [20]



Obr. 2. Používané formy HA [20].



### 1.3.2 Derivovaná forma

HA sa derivuje hlavne esterifikáciou a sulfatáciou. Sulfatujú sa hydroxylové skupiny a estrifikujú sa zvyšky karboxylových skupín. Pri esterifikácii náboj celého polyméru klesá, čím sa zvyšuje hydrofóbnosť. V dôsledku toho klesá rozpustnosť vo vodných roztokoch v závislosti na stupni esterifikácie. Najčastejšie používané derivované formy sú estery kyseliny hyalurónovej, a to benzyl ester hyaluronanu. Tie sa používajú najmä v tkaninovom inžinierstve. Úplne esterifikované hyaluronové deriváty sa používajú v mnohých lekárskejších aplikáciách pre opravu tkanív, riadené uvoľňovanie liečiva, regeneráciu nervov a ako obväzové materiály. Ukázalo sa tiež, že tieto derivované formy HA môžeme využiť ako scaffoldy (nosiče, podporné štruktúry pre rast buniek) pri regenerácii kože a chrupavky. [20]

### 1.3.3 Sieťovaná forma

Sieťované deriváty sa používajú najmä v estetickej medicíne, pri liečbe osteoartritídy a v tkaninovom inžinierstve. Použitie sieťovaného hyaluronanu sa v estetickej medicíne v posledných rokoch výrazne zvýšilo. Je to forma kožnej výplne, ktorá sa intradermálnymi injekciami dostáva do kože. Vysoký dopyt je spôsobený aj tým, že ide o nechirurgický zákrok. Používa sa na vyplnenie vrások a pre zväčšenie objemu mäkkých tkanív pier a prs. Už v roku 2008 bolo podľa americkej spoločnosti estetickej plastickej chirurgie 85% dermálnych plnív na báze kyseliny hyalurónovej.

Plnivá sú väčšinou vyrobené z rôzne sieťovaných mikročastíc HA, ktoré sú suspendované vo fyziologickom roztoku. Niekedy tiež obsahujú lineárnu nesieťovanú kyselinu kvôli zjednodušeniu vtláčania. Od klinického použitia závisí koncentrácia HA, stupeň sieťovania, veľkosť častíc a modul pružnosti. Sieťované a tiež aj lineárne produkty na báze HA sa používajú na liečbu osteoartritídy, keďže sú prirodzenou súčasťou synoviálnej tekutiny, ktorá v kĺbe plní úlohu lubrikantu. V artritických kĺboch je HA rozkladaná, znižuje sa jej viskozita, a teda aj jej lubrikačné a tlmivé vlastnosti. HA je schopná potlačiť degeneráciu, ochrániť plochy mäkkých tkanív kĺbov, normalizovať reologické vlastnosti synoviálnej tekutiny a znižovať vnímanie bolesti. [24, 20]

## 2 METÓDY PRODUKCIE KYSELINY HYALURÓNOVEJ

Obvyklým zdrojom HA pre priemyselnú výrobu sú kohútie hrebienky, hovädzia synoviálna tekutina a sklovec a s rastúcou ponukou aj biotechnológie. Rozdelenie produkčných metód je vidno na obr. 3. Rôzne koncentrácie z rôznych zdrojov sú uvedené v tab. 1. Bola tiež vypovedaná myšlienka využívať sklovec z očí rýb, ktoré majú tiež vyššiu koncentráciu tejto kyseliny. [16]

Tab. 1. Koncentrácia HA z rôznych zdrojov [16].

Zdroje	HA (g na l alebo kg)	Referencie
Kohútie hrebienky	8 - 45	Nakano et al. (1994)
Synoviálna tekutina z hovädzieho dobytky	15 - 40	Cullis-Hill (1989)
Synoviálna tekutina z prasiat <sup>3</sup>	0,5 - 6	Murado et al. (2012)
Sklovec z hovädzieho dobytky	0,3	Gherezghiher et al. (1987)
Sklovec z prasiat	0,04	Murado et al. (2012)
Bakteriálne kultúry	2 - 6	Johns et al. (1994), Cooney et al. (1999)
Sklovec z mečúňa <sup>2</sup>	0,055	Murado et al. (2012)
Sklovec zo žraloka <sup>3</sup>	0,3	Murado et al. (2012)

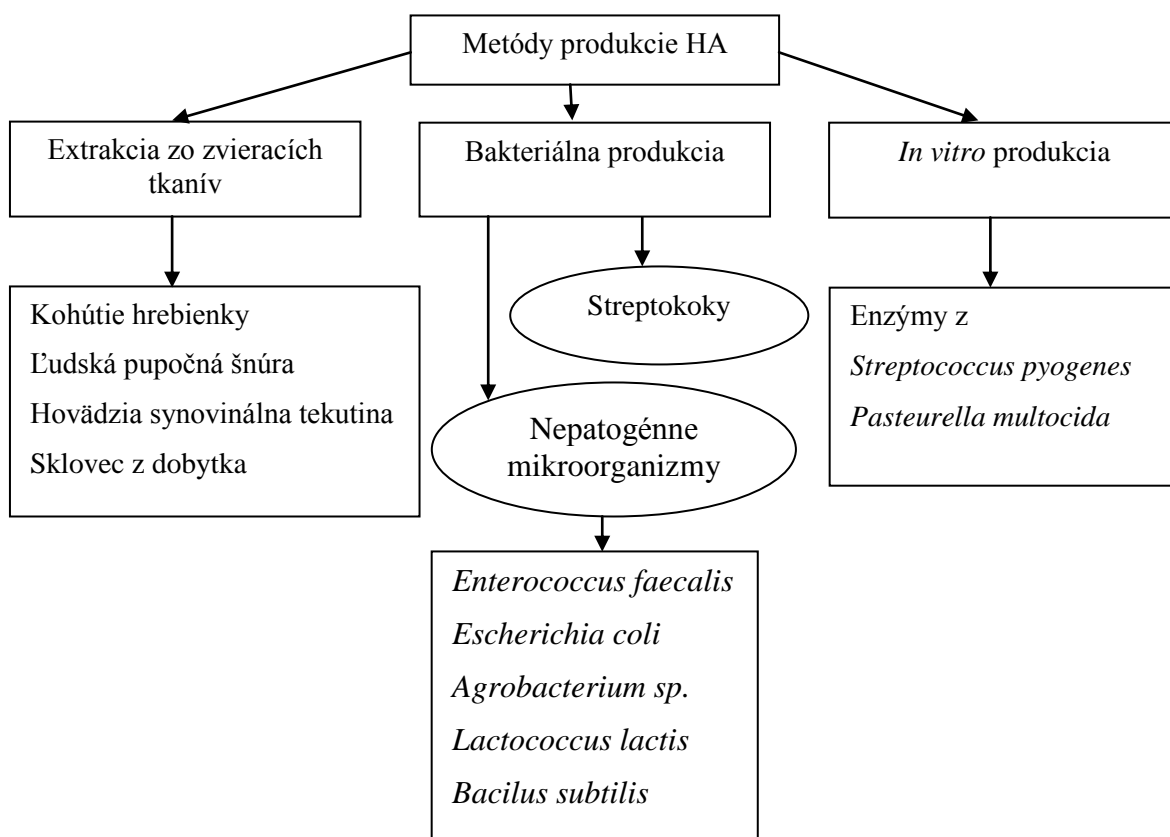
<sup>1</sup> Systematicky poskytované hospodárske zvieratá s blížiacou sa koncentráciou k minimu, veľmi často synoviálna tekutina v kĺboch prakticky chýbala

<sup>2</sup> *Xiphias gladius*

<sup>3</sup> *Prionace sp.*

V nedávnych rokoch však vzrástla obava týkajúca sa používania produktov zo živočíšnych zdrojov v technickej, ale hlavne biomedicínskej a farmakologickej oblasti. Všetky produkty HA na báze kohútich hrebienkov musia byť opatrené upozornením na možné alergické reakcie. Mikrobiálna produkcia zase využívala mikroorganizmy z rodu *Streptococcus*, prvá

komerčne fermentovaná HA bola produkovaná druhom *Streptococcus zooepidemicus*. V tejto oblasti sa ale obávalo potenciálu tvorby bakteriálnych exotoxínov. Z týchto dôvodov by bolo výhodné nájsť alternatívny zdroj HA, ktorý by sa vyhol týmto úskaliam. V poslednej dobe sa vyskytla atraktívna alternatíva v produkcii HA geneticky modifikovanými baktériami, kde sa môžu zmierniť obavy z bezpečnosti. Ako produkčné mikroorganizmy boli použité gramnegatívne aj grampozitívne baktérie, vrátane *Bacillus sp.*, *Lactococcus lactis*, *Agrobacterium sp.* a *Escherichia coli*. [5, 3, 2]



Obr. 3. Rozdelenie produkčných metód [20].

## 2.1 Extrakcia

Extrakcia je separačný proces, pri ktorom sú v kontakte dve vzájomne nemiešateľné látky. Látky sa oddeľujú na základe rôznej rozpustnosti v použitých rozpúšťadlách. Čím väčší je rozdiel medzi rozdeľovacími koeficientmi látok, tým dokonalejšie je ich oddelenie. Tu sa používa extrakcia, pri ktorej sa extrahuje z pevnej do kvapalnej fázy.

### 2.1.1 Extrakcia z kohútích hrebienkov

Je to tradičná metóda založená na extrakcii rozpúšťadlom z tkaninových extraktov zvierat, s následným zrážaním cetylpyridinium chloridom.

Jedna z prvých prác zaoberajúcich sa extrakciou z kohútích hrebienkov bola publikovaná Swannem v roku 1968, ktorý navrhol nasledujúci postup. Hrebienky sa mechanicky krájajú, aby sa z nich získali malé kúsky. Nasleduje ich premytie etanolom, ktoré sa opakuje, kým sa neobjaví zákal. V ďalšom kroku je za stáleho miešania robená extrakcia zmesou vody a chloroformu, počas ktorej hrebene napučia. Po tomto napučaní sa z média filtruje pevný podiel a pridá sa chlorid sodný. Postupne sú robené ďalšie chloroformové extrakcie. Nakoniec sú vzorky enzymaticky štiepené proteázou s následnou extrakciou a centrifugáciou. [20, 37]

Ďalšou možnosťou extrakcie, ktorá sa používa, je rozdrvenie kohútích hrebienkov v elektrickom mlynčeku na kúsky veľké asi 0,5 cm. Tie sa následne uložia do acetónu do chladničky, kde sa z nich týmto spôsobom odstráni tuk. Po asi 2 hodinách sa acetón vypustí a napustí sa čistý. To sa opakuje 10-krát. Po extrakcii tuku sa dajú tieto rozdrvené kúsky sušiť, aby sa zostávajúci acetón vyparil. Takto vysušené sa vložia do 5% roztoku octanu sodného, ktorý sa mení každé 2 hodiny, 10-krát. Postupne sa v roztoku zhromažďuje viskózna kvapalina, takže pri výmene octanu sodného sa roztok pretláča cez bavlnenú tkaninu. Následne sa zvyšky hrebienkov likvidujú. K získanému vodnému roztoku sa pridáva etanol a vyniknutá zrazenina sa centrifuguje, rozpustí v 5% roztoku octanu sodného a znova sa centrifuguje. Zo supernatantu sa nečistoty ako bielkoviny odstraňujú štvornásobným pretrepávaním s chloroformom a následne niekoľkokrát s chloroform-amyl alkoholom v pomere 1:2. Výsledný roztok je dialyzovaný. Roztok sa vyzráža znova s etanolom a potom sa vysuší lyofilizáciou. Získa sa tak prášok HA. Z 500 g kohútích hrebienkov sa touto metódou získa asi 500 mg finálnej suchej kyseliny hyalurónovej. [15]

Pre získanie viskózneho roztoku HA sa asi 50 mg práškovej HA rozmieša v 15 ml vody, ktorá sa následne zahreje na 30 – 40°C po dobu 15 minút. Potom sa doplní voda na objem 50 ml, pričom vzniká číry roztok. [15]

### 2.1.2 Extrakcia z rybích očí

Rybie oči sú alternatívnym zdrojom HA, pričom pri ich použití sa predchádza riziku bovinnej spongiformnej encefalopatie (BSE). Postup extrakcie popisuje Murado a kol., ktorý

použili oči rýb mečúňa obyčajného (*Xiphias gladius*) a žraloka (*Prionace sp.*). Oči boli zmrazené a následne sa narezali dvomi až tromi sériovými rezmí. Fragmenty sa potom rozmrazili na rovnobežných nylonových vláknach (pletivo s uzlami zvyšuje straty a čas procesu a okrem toho zvyšuje podiel nečistôt), ktoré umožňovali prepustiť sklovec, ale nie optický aparát a šošovky. Následne sa tento materiál zhomogenizoval, aby sa dokončila deštrukcia sklovca, ktorý sa vyčistil odstredovaním. Takto sa získali 3 fázy: usadené nečistoty, malá frakcia lipidov, ktorá sa odsala, a väčšinovú fázu, ktorú tvoril viskózný sklovec. Následne boli vzorky podrobené ultrafiltrácii a elektrodispozícii. Bielkovinový koncentrát bol potom solený 0,5 molárnym chloridom sodným a pomaly sa vyzrážal 99% etanolom pri miešaní, aby sa zabránilo tvorbe vločiek. Tento roztok sa potom inkuboval pri asi 5 °C a sediment sa samovoľne vyzrážal počas 3-5 hodín inkubácie. Pomocou peristaltickej pumpy sa potom číri supernatant odstránil a sediment s bielkovinami a HA sa znova rozpustil miešaním s vodou a etanolom. Suspenzia sa následne zriedila vodným alkoholickým roztokom, ktorý bol v rovnakom pomere ako predchádzajúca voda a etanol. Objem tejto suspenzie by sa mal priblížiť ekvivalentne k 1/5 pôvodného bielkovinového koncentrátu. Takto pripravený zriedený roztok sa centrifugoval, pričom sa odstránil sediment s nerozpustnými bielkovinami a ďalej sa pracovalo so supernatantom. Následne sa pridal roztok etanolu a hydroxidu sodného a po premiešaní sa roztok vyzrážal a fázy boli oddelené centrifugáciou. Supernatant obsahoval bielkovinové frakcie. Alkalický sediment obsahujúci HA sa ešte rozpustil v roztoku vody a etanolu spolu s vodným roztokom etanolu so sodnou soľou kyseliny fosforečnej za účelom neutralizácie. Pri neutralizácii sa z dôvodu zníženia molekulovej hmotnosti nepoužívala ani kyselina chlorovodíková ani octová. Homogénny roztok sa následne odstredoval a supernatant s kyslinou hyalurónovou sa oddelil. [16]

## 2.2 Fermentácia

Fermentácia alebo kvasenie je metabolický proces, pri ktorom sa deje premena látky za účasti enzýmov mikroorganizmov. Prebiehajú chemické premeny organických látok, väčšinou sacharidov, pričom vznikajú látky energeticky chudšie. Fermentácia podľa druhu mikroorganizmu prebieha za rôznych podmienok, s rôznym zdrojom a inou výťažnosťou. Ako už bolo zmienené pre produkciu HA sa používajú grampozitívne aj gramnegatívne baktérie.

Medzi najpoužívanejšie sa radia baktérie čeľade *Streptococcaceae*. Streptokoky sú nespo-  
rulujúce baktérie, majú guľovitý tvar a zvyčajne rastú v pároch alebo retiazkach obklopené  
extracelulárnou kapsulou. V tomto prípade sa využívajú takzvané  $\beta$ -hemolytické strepto-  
koky skupiny A a C. Patria tam druhy ako *Streptococcus equi*, *Streptococcus equisimilis*,  
*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* či *Streptococcus zooepidemicus*.  
Z gramnegatívnych baktérií je to *Pasteurella multocida*. Pre aplikácie v kozmetickom  
priemysle je zaujímavá produkcia *S. zooepidemicus* a *S. equi*. [2, 21, 20]

*Streptococcus zooepidemicus* aj *Pasteurella multocida* produkujú HA prostredníctvom  
špecifických membránovo viazaných glykozyltransferáz, ktoré sa volajú HA syntázy. Vý-  
roba HA streptokokmi môže byť ovplyvnená genetickými faktormi, napr. produkciou ex-  
tracelulárneho enzýmu hyaluronidázy, ktorý znižuje koncentráciu a molekulovú hmotnosť  
produktu. Biotechnologická výroba kmeňom *S. zooepidemicus* je podrobne opísaná  
v kapitole 3.1. [20]

Pri fermentácii je tiež dôležité vytvoriť ideálne podmienky. Podmienkami sa myslí pH,  
teplota, rýchlosť miešania, prevzdušnenie, vhodné fermentačné médium a fermentačný  
mód. Najmä aeróbne podmienky a počiatočná koncentrácia glukózy má veľký vplyv na  
výťažok HA a molekulovú hmotnosť. Molekulová hmotnosť zase ovplyvňuje reologické  
vlastnosti a tým aj použitie HA. Priemerná molekulová hmotnosť pri streptokokovej fer-  
mentácii je 1-2 MDa, maximálna dosiahnutá je 4 MDa. Okrem podmienok je tiež dôležitá  
rovnováha medzi rýchlosťou syntézy HA a rýchlosťou poskytovania prekursorov cukrov.  
Zvýšená expresia génov podieľajúcich sa na syntéze UDP-glukurónovej kyseliny znižuje  
molekulovú hmotnosť, zatiaľ čo nadmerná expresia génov podieľajúcich sa na biosyntéze  
UDP-N-acetylglukózaminu ju zvyšuje. Takže manipuláciou rovnováhy môžeme získať aj  
HA s vysokou molekulovou hmotnosťou. [2, 20]

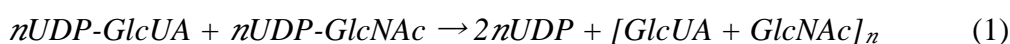
### 2.3 *In vitro* produkcia

*In vitro* produkcia HA sa robí pomocou izolovanej HA syntázy. Táto metóda sa používa,  
keď chceme polymér kyseliny hyalurónovej s presne definovanou molekulovou hmotnos-  
ťou a disperzitou. HA syntáza je za presne definovaných podmienok schopná katalyzovať  
reakciu *in vitro* rovnakým spôsobom, ako katalyzuje syntézu *in vivo*, teda syntézu  
z nukleotido aktivovaných cukrov. Enzymatickou syntézou sa zaoberali napríklad De Luca  
a kol. Enzymatická syntéza pomocou HA syntázy zo *Streptococcus pyogenes* mala nízku  
výťažnosť, okolo 20 %. Zvýšená bola na 90 %, keď sa syntéza spojila s *in situ* enzymatic-

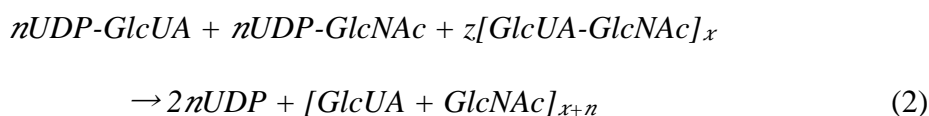
kou regeneráciou nukleotidových cukrov pomocou UDP a relatívne lacných substrátov, glukóza-1-fosfátu a N-acetyl glukózamin-1-fosfátu. Priemerná molekulová hmotnosť takto syntetického hyaluronanu bola okolo  $5,5 \times 10^5$  Da, čo zodpovedá stupňu polymerizácie 1500. [38]

Hyaluronan s vysokou molekulovou hmotnosťou je možné získať enzymatickou polymerizáciou použitím rekombinovanej *P. multocida* HA syntázy (PmHAS) exprimovanej *E. coli*. PmHAS používa dve oddelené glykozyltransferázy, ktoré pripojujú monosacharidy (D-glukurónová kyselina a N-acetylglukózamín) na vznikajúci polysacharidový reťazec.

HA syntéza pomocou PmHAS prebieha *de novo* syntézou z dvoch prekursorov podľa vzťahu (1)



s následným predĺžením akceptorového oligosacharidového reťazca, striedavým opakovaným pridávaním UDP-cukrov (2).



Dĺžka reťazca je riadená vlastnosťami PmHAS. Dôležitým znakom PmHAS je, že k predĺženiu reťazca dochádza na neredukujúcom konci rastúceho reťazca. Toto umožňuje použitie modifikovaných akceptorov ako možných substrátov, a preto je možné syntetizovať polyméry HA s rôznymi koncovými skupinami. Štúdie ukázali veľký potenciál pre *in vitro* enzymatickú syntézu HA polymérov a oligomérov s nízkou disperzitou, ale pre použitie vo veľkom meradle je potrebný ďalší vývoj.

Prekážky predstavuje:

- produkcia enzýmov pre syntézu HA
- selektívna separácia UDP produktu z reakčnej zmesi, aby sa zabránilo inaktivácii enzýmu a aby sa umožnila recyklácia UDP pre syntézu substrátov UDP-cukrov
- vývoj účinných postupov pre výrobu akceptorov (oligosacharidov HA) ako templátov pre predĺženie

- vývoj jednoduchých technologií s nízkými náklady pro syntézu cukrových nukleotidových substrátů, vzhledem k tomu, že cukrové nukleotidy jsou drahé substráty, jejich regenerace je zásadná pro rozvoj ekonomického procesu výroby HA [23]



### 3 BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKČIA HYALURONANU

Mikrobiálna produkcia HA v priemyselnom meradle bola prvýkrát dosiahnutá na začiatku osemdesiatych rokov 20. storočia japonskou firmou Shiseido. Bežne používaným kmeňom pri tejto výrobe bol *S. zooepidemicus*, ktorý produkuje pri vhodných podmienkach a použití jednorazovej kultivácie približne 6-7 g/l HA. [2]

#### 3.1 Biosyntéza kyseliny hyalurónovej *S. zooepidemicus*

Metabolická cesta tvorby hyaluronanu *S. zooepidemicus* bola v poslednej dobre objasnená. Gén kódujúci HA syntázu je súčasťou *has* operónu, ktorý kóduje aj jeden alebo viac enzýmov, ktoré sa podieľajú na biosyntéze potrebných aktivovaných cukrov. Operón *has* kóduje 5 génov: hyaluronan syntázu (*hasA*), UDP-glukóza dehydrogenázu (*hasB*), UDP-glukóza pyrofosforylázu (*hasC*), gén kódujúci bifunkčný enzým s acetyltransferázovou a pyrofosforylázovou aktivitou (*hasD*) a gén kódujúci fosfoglukoizomerázu (*hasE*). Gény *hasB* a *hasC* sa podieľajú na syntéze UDP-glukurónovej kyseliny, zatiaľ čo *hasD* a *hasE* sú zapojené do syntézy UDP-N-acetylglukózaminu. Biosyntéza hyaluronanu je pre baktérie nákladný proces, pokiaľ ide o zdroj uhlíka a energie. Metabolická dráha biosyntézy HA sa čiastočne prekrýva s metabolickými dejmi biosyntézy bunkovej steny, čo vedie ku kompetícii syntézy HA a rastu buniek. Pochopenie metabolickej syntézy je dôležité, pretože umožňuje kontrolu dĺžky reťazca a zvýšenie výťažnosti. [23]

Základom pre prekurzory HA (UDP-N-acetylglukózamin a UDP-glukurónovú kyselinu) je glukóza-6-fosfát a fruktóza-6-fosfát. Syntézu môžeme rozdeliť do dvoch dráh, kde sa v každej vytvorí základný prekurzor HA.

Prvú tvorí reakcie, kde glukóza-6-fosfát je pomocou enzýmu  $\alpha$ -fosfoglukomutázy premenená na glukóza-1-fosfát. Ďalším krokom je naň adovať UTP pomocou UDP-glukózy pyrofosforylázy, tak vzniká UDP-glukóza. Nakoniec oxidáciou primárneho alkoholu UDP-glukózy UDP-glukóza dehydrogenázou získavame prvý prekurzor kyseliny hyalurónovej UDP-glukurónovú kyselinu. Schéma produkcie je v prílohe č.1. [2]

Druhá dráha je tvorená reakciou kde amidotransferáza prenáša amido skupinu z glutamínu na fruktóza-6-fosfát, čím sa získa glukozamín-6-fosfát. Ďalej sa fosfátové skupiny preskupia fosfoglukózamin mutázou, kde produktom je glukozamín-1-fosfát. V nasledujúcom kroku sa vyrobí acetylovaná forma fosfoglukózaminoacetyl transferázami. K výslednému

N-acetylgluzaimne-1-fosfát sa pridá UTP a pomocou enzýmu pyrofosforylázysa získa druhý prekursor, UDP-N-acetylglukozamin. [2]

Medzi produkciou prekursorov pre HA a rastom buniek existuje konkurencia. Bunka pre svoj rast využíva glukóza-1-fosfát, UDP-glukózu a UDP-N-acetylglukózamin. Vysoká špecifická rýchlosť rastu tiež nie je priaznivá pre syntézu HA. Kompetícia vzniká aj medzi glykolýzou, a to o toku uhlíka. Z tohto dôvodu oslabenie glykolýzy a zníženie rýchlosti tvorby biomasy sú účinné pre zvýšenie výťažnosti HA.

Získanie HA o vyššej molekulovej hmotnosti môžeme doceliť napríklad prostredníctvom zlepšenia vlastností produkujúceho kmeňa, optimalizáciou prevádzkových podmienok alebo prostredníctvom metabolického inžinierstva. [2, 23, 17]

### 3.1.1 Fermentačné podmienky a médium

Na médium sú streptokoky nutrične náročné baktérie a majú špecifické požiadavky na výživu. Okrem toho geneticky modifikované kmene sú často auxotrofné pre niektoré aminokyseliny a vitamíny. Streptokokové kmene pre produkciu hyaluronanu všeobecne používajú glukózu ako zdroj uhlíka. Iné zdroje uhlíka sú škrob, laktóza, sacharóza, a dextrin. Využitie zdrojov uhlíka ako je škrob a laktóza sa používajú kvôli nižším nákladom, čo je dôležité vzhľadom na ekonomiu procesu. Priemerné médium zvyčajne obsahuje kvasničný extrakt, masový extrakt alebo hydrolyzát kazeínu. Ako rastové faktory sa pridáva teľacia krv alebo sérum a niekedy lyzozým, ktorý stimuluje produkciu HA. Zhang a kol. vyvinul dokonca médium bez séra, kde je zdrojom uhlíku škrob pričom koncentrácia HA dosiahla 6,7 g/l. [2, 20, 23]

Kultivačné podmienky pre streptokoky, konkrétne pre *S. zooepidemicus*, sú zvyčajne pH 7 a teplota 37°C. Ale najvyššia produkcia HA a najvyššia molekulová hmotnosť HA boli získané pri suboptimálnych rastových podmienkach, pretože keď bunky rastú pomaly, uhlík a energetické zdroje sú k dispozícii pre iné procesy. Výroba mikrobiálnej HA *S. zooepidemicus* je typicky viskóznym proces, takže rýchlosť miešania a hladina kyslíka významne ovplyvňuje produkciu HA. Účinky rýchlosti miešania, prevzdušňovania, šmykového napätia a rozpustnosť kyslíka na mikrobiálne produkcie HA boli rozsiahle študované. Aeróbné podmienky kultivácie zvyšujú produktivitu HA produkcie až o 50%. [2, 23]

Stimulačné účinky prevzdušnenia sa môžu vysvetliť následne:

- rozpustený kyslík v médiu môže viesť k vyššej produkcii kyseliny octovej na úkor kyseliny mliečnej, a tak sa generuje viac molekúl ATP, navyše vznikajúce ATP pri tvorbe kyseliny octovej pôsobí priaznivo na dosiahnutie vyššieho titra HA
- kyslík môže podporovať syntézu HA vďaka agregácii streptokokových buniek sprostredkovaných ich HA kapsulami
- aerácia môže zvýšiť akumuláciu acetyl-CoA, vďaka čomu je možné väčšie množstvo acetyl-CoA použiť na syntézu HA na úkor centrálného metabolizmu uhlíku

Napriek tomu je treba rozlišovať vplyv rýchlosti miešania a prevzdušnenia. Podľa Hasegawy a kol. sa produkcia HA zvyšuje s rastúcou mierou prevzdušňovania a rýchlosťou miešania. Avšak, príliš vysoká rýchlosť miešania by mohla viesť k poškodeniu buniek, a to zase vedie k poklesu koncentrácie HA. [39]

Nedávne štúdie tiež zistili, že existuje kritická hladina rozpusteného kyslíka pre syntézu HA, je to 5 %. Keď je hladina rozpustného kyslíka nižšia ako 5 %, tak zvýšenie rýchlosti prevzdušnenia a miešania priaznivo ovplyvnilo produkciu HA. Keď je vyšší ako 5 %, tak vplyv rýchlosti miešania a prevzdušňovania bol malý až mizivý. [2]

Fermentačné podmienky tiež zásadne ovplyvňujú molekulovú hmotnosť získanej HA, sú to najmä prevzdušnenie a šmykové napätie. Pri streptokokovej aeróbnej fermentácii prevzdušnenie môže v porovnaní s anaeróbnymi podmienkami zvýšiť molekulovú hmotnosť produktov. Vyššiu hladinu rozpusteného kyslíku uprednostňuje taktiež vysoká molekulová hmotnosť, zatiaľ čo k nižšej molekulovej hmotnosti vedie vysoké šmykové napätie. Je to pravdepodobnosťou v dôsledku degradácie, ktorú spôsobuje reaktívne kyslíkové radikály, ktoré sú vytvorené v aeróbnych podmienkach pri vysokom šmykovom napätí. Oxidačnej degradácii HA sa dá zabrániť pridaním látky zachytávajúcej kyslík, akou je kyselina salicylová v kultivačnom médiu, čo vedie k zvýšeniu molekulovej hmotnosti. Kombinácia vysokej hladiny kyslíka a mierneho šmykového napätia môže byť teda stratégia pre výrobu HA s vysokou molekulovou hmotnosťou. [23, 17]

### 3.1.2 Kultivačné techniky

Pre fermentáciu sa používajú rôzne techniky. Rozlišujeme:

- jednorazová (batch) kultivácia – ide o uzavretý systém, kde všetky živiny aj inokulum sú privádzané na počiatku kultivácie a postupne spotrebované. Dochádza tu k akumulácii biomasy a metabolitov. Objem bioreaktora je konštantný.
- prietoková jednorazová (fed-batch) kultivácia – jedna alebo viac živín sú dávkované do bioreaktora v priebehu kultivácie, pričom produkt zostáva v bioreaktore. Objem nie je konštantný. Riadením rýchlosti prietoku limitujúceho substrátu môžeme ovplyvniť rýchlosť spotreby substrátu riadením reakčných rýchlostí a metabolizmu. Výhodou je, že riadenou zmenou koncentrácie živín možno ovplyvniť výťažok alebo produktivitu. Živiny sú dodávané v priebehu kultivácie a médium sa neodvádza, takže objem bioreaktora rastie.
- kontinuálna kultivácia – kontinuálna kultivácia je otvorený systém, kde dochádza k plynulému (nepretržitému) dodávaniu živín (médiá) a zároveň k plynulému odberu média pozmeneného metabolickou činnosťou mikroorganizmov aj s časťou biomasy. Rýchlosť prietoku je rovná rýchlosti odtoku, objem bioreaktora je tak konštantný. [42]

Jednorazová kultivácia je dominantný prevádzkový mód pre výrobu HA. Fed-batch je v porovnaní s jednorazovou kultiváciou časovo menej náročný proces, a tak sa zvyšuje produktivita syntézy HA. Kombináciou oboch techník je možné produkciu ďalej zefektívniť. Pri fermentácii *S. zooepidemicus* sa používa kombinácia režimu fed-batch s koncentráciou sacharózy 1,0g/l v priebehu 0-8 hodín a následne sa prechádza do batch módu, ktorý sa uplatňuje počas 8-20 hodín, s počiatočnou koncentráciou sacharózy 15 g/l. Touto dvojstupňovou fermentáciou sa zvýši produkcia o 32 % v porovnaní s jednoduchou batch fermentáciou. [2]

V poslednej dobe sa tiež využívala opakovaná jednorazová kultivácia pre výrobu HA. Aj pri tomto postupe bola produkcia HA významne zvýšená.

Kontinuálna kultúra je najlepšia stratégia pre zlepšenie objemovej produkcie pri HA syntéze, a to z týchto dôvodov:

- rast buniek môže byť udržiavaný v exponenciálnej fáze. Rozšírenie exponenciálnej fázy by mohlo viesť k zvýšeniu množstva HA, pretože bolo preukázané, že syntéza

HA sa zastaví v stacionárnej fáze a vylučovaniu HA syntázy a ďalších proteínov bunkovej steny je zabránené

- suboptimálne podmienky pre rast, obmedzenie živín spôsobí zníženie kompetície o zdroje medzi rastom buniek a syntézou HA
- viskozita média môže byť riadená riadením koncentrácie HA, čím sa zlepši prenos hmoty v reaktore

Pri ďalšom porovnaní kontinuálny proces oproti jednorazovému procesu predlžuje kultivačnú periódu, čím sa zníži čas strávený v reaktore a tiež stupeň polydisperzity. [2, 23]

### 3.2 Biosyntéza kyseliny hyalurónovej nepatogénnymi mikroorganizmami

Medzi ďalšie produkčné mikroorganizmy patria už hore zmienené *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium sp.*, *Lactococcus lactis* a *Bacillus subtilis*. Tieto kmene sú geneticky modifikované, aby sa zvýšila výťažnosť, kvalita a znížili náklady na výrobu a taktiež aby sa zabránilo riziku kontaminácie exotoxínmi. Do genómu týchto mikroorganizmov je zavedený gén HA syntázy pochádzajúci od streptokokov alebo *P. multocida*. Heterologná expresia HA syntázy je dostačujúca pre indukciu produkcie kyseliny hyalurónovej u produkčných mikroorganizmov. [23]

Časť biosyntetickej dráhy HA je zhodná s dráhou biosyntézy bunkovej steny a predstavuje pre hostiteľský mikroorganizmus záťaž vďaka nedostatku cukrových prekurzorov pre syntézu bunkovej steny. Ideálne produkčný kmeň by teda mal mať dostatok prekurzorov pre oba procesy. Toho môžeme dosiahnuť napríklad koexpresiou génu pre HA syntázu a gény, ktoré zvýšia intracelulárnu dostupnosť cukrových prekurzorov. [23]

Účinný produkčný kmeň *E. coli* JM109 bol získaný koexpresiou HA syntázy z *Pasteurella multocida* a (UDP)-glukóza dehydrogenáz z kmeňa *E. coli* K5. Tento kmeň má produkciu pri fad-batch procese 2,0-3,8g/1L HA v 1-L bioreaktore. [40]

Produkčný kmeň *L. lactis* získaný zavedením celého operónu zo *S. zooepidemicus*. Okrem génu pre HA syntázu (*hasA*) a génu pre UDP-glukóza dehydrogenázu (*hasB*), bol súčasťou operónu aj gén *hasC* (UDP-glukóza pyrofosforyláza). Zavedením týchto génov sa významne zvýši produkcia HA. Takto geneticky upravený kmeň *L. lactis* NZ9000 s transformovaným plazmidom pSJR3 (*hasA*, *hasB* a *hasC* gény) sa dokázalo produkovať až 1,8 g/l v 2,4-L batch bioreaktore. [41]

### 3.2.1 *Bacillus subtilis*

*Bacillus sp.* sa už dlhý čas používa v priemysle pre výrobu rôznych produktov napr. hydrolytické enzýmy ako sú proteázy,  $\alpha$ -amylázy a špeciálnych chemických látok ako sú vitamíny či aminokyseliny. Ich vysoko rozvinuté biosyntetické schopnosti a GRAS označenie (generally recognized as safe) zaručili rastúce využitie v priemysle. GRAS je vlastne všeobecné uznanie ich produktov za bezpečné vzhľadom k tomu, že *B. subtilis* neprodukuje edotoxíny a exotoxíny, taktiež je jedným z najlepšie charakterizovaným a preskúmaným grampozitívnym mikroorganizmom. Jeho genóm ponúka široké pole pre genetické manipulácie. Okrem toho tiež neprodukuje hyaluronidázu, ktorá by mohla znížiť výťažnosť HA, týmto sa stal jedným z produkčných mikroorganizmov pre výrobu HA. [3]

Len niekoľko druhov vie prirodzene syntetizovať HA. Jediný enzým ktorý chýba *B. subtilis* je hyaluronan syntáza, ktorá je kódovaná genóm *hasA*. K ďalším genóm potrebným pre výrobu HA, ako je *hasB*, *hasC* či *hasD*, má *B. subtilis* homológy, ktoré sú označené ako *tuaD*, *gtaB* a *gcaD*. Výroba HA pomocou *B. subtilis* môže byť dosiahnutá niekoľkými rôznymi spôsobmi. Najčastejšie sa operón *has* z rodu *Streptococcus* skupiny A alebo C zaviedie do *B. subtilis*. Alternatívou sú umelé operóny, ktoré sa môžu skladať aj z génov *B. subtilis*. Tento spôsob je prítlačlivý z dôvodu že endogénne gény sú často efektívnejšie u svojho prirodzeného hostiteľa. Preto sa používa operón, ktorý obsahuje gén *hasA* od streptokokov, ale ostatné gény sú *B. subtilis* pôvodné, teda homológy spomenuté vyššie. Syntéza prekurzorov HA, t.j. základných monosacharidov, je rovnaká ako pri *S. zooepidemicus* vzhľadom k tomu, že *B. subtilis* taktiež patrí medzi grampozitívne baktérie. Syntéza HA je pre bunku náročná hlavne z hľadiska spotreby energie a uhlíku. Pre každý mol vyrobenej disacharidovej jednotky HA sa spotrebujú 2 mol glukózy, 5 mol nukleozidtrifosfátu (3 ATP a 2 UTP) a 1 mol acetyl-koenzýmu A. Ak sa vyrába veľké množstvo HA, môže to predstavovať značnú metabolickú záťaž pre bunku. Navyše, niektoré z cukrov obsiahnutých v tejto ceste sa vyžadujú aj pre dôležité bunkové funkcie, ako je napríklad stavba bunkovej steny. K tomu, aby sa bunka syntetizovala veľké množstvo HA, je nutné, aby sa zdroje cukru udržiavali na zodpovedajúcich úrovniach pre udržanie rastu buniek. *B. subtilis* sa ukázal byť dobrým produkčným mikroorganizmus pre výrobu HA, a to na základe niekoľkých kritérií. Je schopný produkovať až 5 g/l HA s molekulovou hmotnosťou 1 až 1,2 miliónov Da pri kultivácii na minimálnom médiu so sacharózou pri pH 7 a 37 °C. Okrem toho je netoxinogénny a produkovaná kyselina hyalurónová je vylučovaná do okolitého prostredia čo zjednodušuje následne spracovanie. Z ekonomického hľadiska je to taktiež

výhodné z dôvodu schopnosti *B. subtilis* rásť aj na minimálnom médiu, na rozdiel od náročnejších streptokokov. Jedinou nevýhodou je, že modifikované kmene vo všeobecnosti produkujú HA s nižšou koncentráciou ako streptokoky. [3]

### 3.2.2 *Streptococcus thermophilus*

V poslednej dobe bolo identifikovaných niekoľko divokých kmeňov *S. thermophilus* produkujúcich HA. *S. thermophilus* je grampozitívna baktéria mliečneho kvasenia. Používa sa v potravinárskom priemysle na výrobu jogurtov. Zistilo sa že produkuje rôzne exopolysacharidy s rôzne opakujúcimi sa jednotkami a rôznymi dĺžkami reťazca. Avšak pomerne dlho neboli známe kmene produkujúce HA. Prvýkrát bola produkcia HA zistená v mliečnom médiu, kde ju vyprodukoval *S. thermophilus* YIT 2084, ktorý je súčasťou startérovej kultúry pri výrobe jogurtov. Pri syntéze HA u *S. thermophilus* hrajú dôležitú úlohu tri gény *hasA* (HA syntáza), *hasB* (UDP-glukóza dehydrogenáza) a *glmU* (pyrofosforyláza). Nadmerná expresia génu *glmU* znižuje produkciu HA a koncentráciu buniek. Toto zníženie môže byť spôsobené neschopnosťou tolerovať vysokú intracelulárnu koncentráciu UDP-N-acetylglózaminu. Naopak, nadmerná expresia oboch génov *hasA* a *hasB* zvyšuje produkciu HA rovnako, ako aj ich samostatná expresia, či už *hasA* alebo *hasB*. [10]

Na výrobu 1 mol opakujúceho sa disacharidu, základnej jednotky HA, sa celkovo spotrebujú 4 mol ATP. Produkcia veľkého množstva HA však má negatívny vplyv na rast *S. thermophilus*. Je teda dôležité, aby sa udržiavala metabolická rovnováha. Pokiaľ sú pre fermentáciu použité aeróbne mikroorganizmy, môže pre ne vysoká viskozita média znamenať problémy s transportom kyslíku. *S. thermophilus* je fakultatívne anaeróbny a nevyžaduje kyslík pre výrobu HA. To znamená, že použitie tohto organizmu zjednodušuje fermentáciu a následné postupy čistenia.

Molekulová hmotnosť čistej HA vyrobenej týmto kmeňom bola priemerne 1 MDa, čo je menej ako u iných patogénnych streptokokov. Jedným z dôvodov môže byť rozdielnosť v aktivite HA syntázy. Čistená HA z týchto kmeňov je vhodná pre priemyselné použitie. Očakáva sa, že tento kmeň bude mať veľký potenciál pre využitie v potravinách, kozmetických a lekárskejších odvetviach. V posledných rokoch sa skonštruoval tak, že jeho výťažnosť dosiahla 1,2 g/l. [10, 23]

## 4 PRODUKČNÉ MIKROORGANIZMY

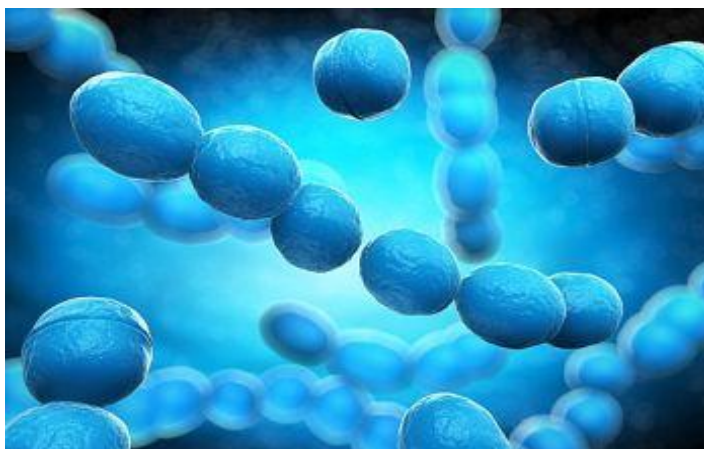
Pod pojmom produkčné mikroorganizmy sa myslia organizmy produkujúce kyselinu hyalurónovú. Mikroorganizmy ju produkujú, buď prirodzene, alebo sú pre tento účel geneticky modifikované. Ako už bolo spomenuté v predchádzajúcich kapitolách, prirodzeným priemyselne využívaným rodom je rod *Streptococcus*.

### 4.1 Streptokoky

Streptokoky patria do čeľade *Streptococcaceae*. Sú to grampozitívne aerotolerantné koky, ktoré sa podľa staršieho klasifikačného systému delia do 6 skupín:

- pyogénne streptokoky
- orálne streptokoky
- iné streptokoky
- anaeróbne streptokoky
- enterokoky
- streptokoky mliečneho kysnutia

V novšom pojatí klasifikácie streptokokov sa navrhlo ponechať iba 3 pôvodné skupiny: pyogénne, orálne a iné streptokoky. Streptokoky sú charakteristické usporiadaním kokov do párov a retiazok, ako môžeme vidieť na obr. 4. Všetky druhy sú náročné na prívod rastových faktorov a fermentujú laktózu na kyselinu mliečnu. Niektoré streptokoky môžu spôsobiť u ľudí ako aj u zvierat závažné ochorenia, ďalšie sú len príležitostne patogénne alebo saprofyty. [30, 31]



Obr. 4. Všeobecná stavba streptokokov [18].



#### 4.1.1 Pyogénne streptokoky

Podľa najnovšej klasifikácie zahrňujú sérologické skupiny A, C, G a sérologickú skupinu L. V praxi sa tiež často nazývajú  $\beta$ -hemolytické podľa hemolýzy na krvnom agare. Tá sa prejavuje na krvnom agare jasnými zónami okolo kolónií. Táto skupina obsahuje druhy:

- *S. pyogenes*
- *S. equi subsp. equi*
- *S. equi subsp. zooepidemicus*
- *S. dysgalaciae*
- *S. canis*
- *S. iniae*

*S. equi subsp. zooepidemicus* je jedným z dvoch poddruhov *Streptococcus equi*. Je nepohyblivou, nesporulujúcou, zapuzdrenou, grampozitívnou kokovou baktériou. Jeho bunková stena pozostáva zo špecifických sacharidov a mukopeptidových polymérov. Pri gramovom farbení sa teda bude zafarbovať bunková stena na modrofialovo. Pri kvasení *S. zooepidemicus* produkuje kyselinu hyalurónovú a kyselinu mliečnu. Kyselina mliečna je faktor, ktorý môže regulovať produkciu HA, a to znížením premeny substrátu na HA. Syntéza HA je pre *S. zooepidemicus* vysoko energeticky náročná. Ako člen skupiny C streptokokov je veľmi citlivý na penicilín, rovnako je citlivý na ďalšie antibiotiká, ako sú ampicilín, nitrfurány a erytromycín. Oproti tomu je odolný voči amikacínu a tribrissenu (trimethoprim/sulfadiazin). Rastie na nutrične bohatých médiách pri teplotách v rozmedzí 25 až 45°C. Optimálna kultivačná teplota pre *S. zooepidemicus* je 37°C. [30, 32]

*S. zooepidemicus* tvorí normálnu bakteriálnu flóru u koní. Bol izolovaný z infekčných rán koní a iných cicavcov, ako sú kravy, zajace a prasce. V niektorých prípadoch bol izolovaný aj pri výteroch ľudského krku. Výnimočne spôsobuje aj infekcie u človeka, ktoré sú vždy spojené buď s kontaktom so zvieratami (kone), alebo s požitím nepasterizovaných mliečnych výrobkov. Spôsobuje rôzne ochorenia vrátane sepsy, endokarditídy, krčnej lymfadenitída, septická artritída a iných. Zaraduje sa medzi patogénny, ktorý spôsobuje ochorenia dýchacích ciest, maternice, rán u koní a mastitídy u cicavcov. Celkové príznaky infekcie *S. zooepidemicus* sú lézie, horúčka, serózný až mukopurulentní výtok z nosa a ťažkosti s dýchaním. [32]

#### 4.1.2 Iné streptokoky

Z iných streptokokov nás s ohľadom na produkciu HA zaujíma grampozitívny *S. thermophilus*. Ten tvorí ovoidné nesporujúce a nepohyblivé bunky o priemere 0,7 až 0,9  $\mu\text{m}$

v pároch alebo dlhých reťazkách. Bunková stena je tvorená mureinom, ktorý je zložený z N-acetylglukózaminu a N-acetylmuramovej kyseliny. Táto štruktúra umožňuje *S. thermophilus* znášať zvýšené teploty. Ďalej sa *S. thermophilus* vyznačuje tvorbou dvoch mliečnych dehydrogenáz produkujúcich L-laktát. Fermentuje glukózu, laktózu, manózu a fruktózu. Jeho optimálna teplota rastu je medzi 40 až 45°C, pričom jeho horná rastová hranica je 52°C a dolná 21-19°C. Izoluje sa z mlieka na médiách s hydrolyzovaným kazeínom a fermentovateľným sacharidom, taktiež dobre rastie v lakmusovom mlieku. Vyskytuje sa v mlieku a v mliečnych produktoch natívne ako aj vo forme čistiacich zákysových mliekarenských kultúr používaných pri výrobe jogurtov, tvarohov a syrov s vysoko dohrievanou syrovinou. Tiež sa vyskytuje ako kontaminant vo výmenníkoch tepla pasterizačných strojov. Niektoré kmene *S. thermophilus* produkujú exopolysacharidy vrátane HA. Štyridsať šesť kmeňov bolo izolovaných z mliečnych potravín a skúmala sa ich produkcia HA. Výsledkom bolo 6 kmeňov produkujúcich exopolysacharidy vrátane HA. *S. thermophilus* YIT 2084 mal výraznú vysokú produktivitu HA (asi 8 mg/l). *S. thermophilus* YIT 2084 má veľký potenciál pre použitie v lekárskech, kozmetických a potravinárskych odbo-  
rov, hoci jeho kultivačné podmienky je potrebné ešte zlepšiť. [30, 33]

## 4.2 Nepatogénne mikroorganizmy

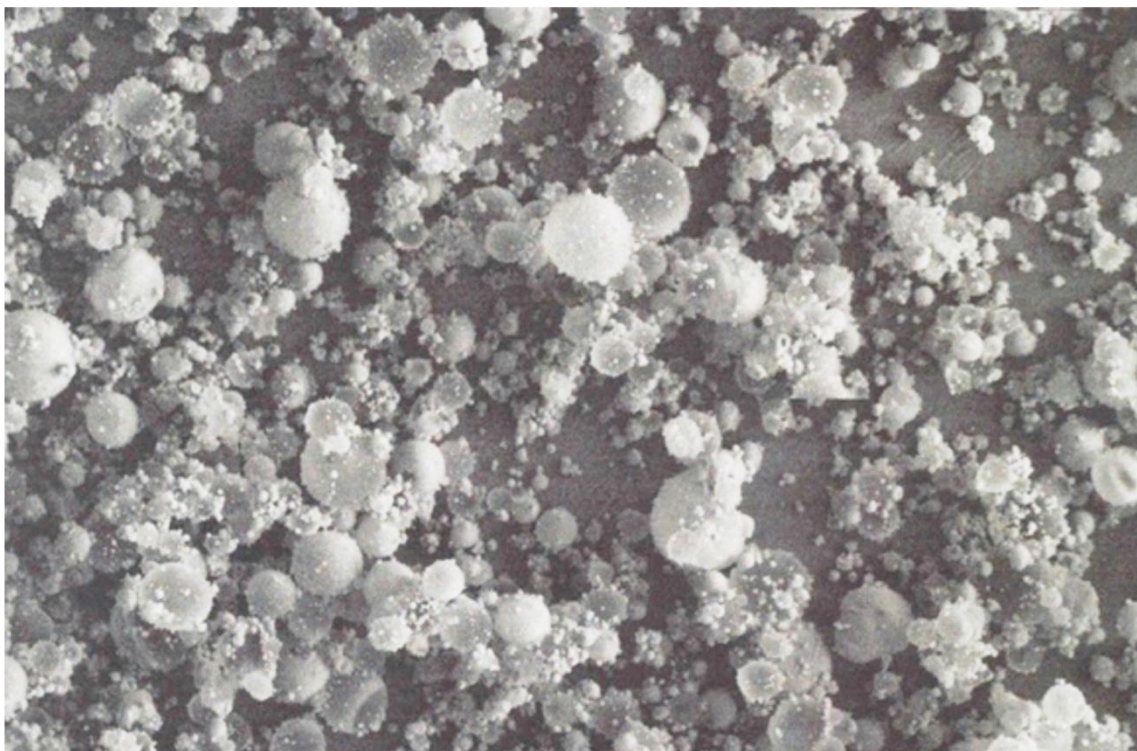
Patogénne mikroorganizmy sú schopné infikovať hostiteľa a vyvolať jeho ochorenie. Nepatogénne túto schopnosť nemajú. Pri výrobe HA sa stretávame s týmito mikroorganizmami: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium sp.*, *Lactococcus lactis* a *Bacillus subtilis*. Z vyššie uvedených je najzaujímavejším v posledných rokoch *Bacillus subtilis*.

Čeľaď *Bacillaceae* obsahuje rod *Bacillus*, ktorého druhy sa delia na:

- chladnotolerantné, rastú pri 0°C
- mezofilné, rastú pri teplotách 7 až 4°C
- termofilné, sem patrí *B. subtilis*

*B. subtilis* je takmer všade prítomný, tvorí pomerne malé peritrichné bunky, ako môžeme vidieť na obr. 4. Patrí medzi aeróbne grampozitívne baktérie, ktorým sa darí v pôde. Jeho bunková stena sa skladá hlavne z peptidoglykánu zvaného tiež mureín. Vytvára bariéru medzi prostredím a bunkou. Je tiež zodpovedná za udržiavania tvaru buniek. Optimálna teplota rastu je 25 až 35°C. Pri nepriaznivých podmienkach vytvára odolné endospóry oválneho tvaru alebo prijíma DNA z vonkajšieho prostredia, ktorá mu umožňuje sa prispô-

sobiť modifikáciou. Tvorba endospór musí prebehnúť ešte pred úplným vyčerpaním všetkých živín. *B. subtilis* dokáže využívať širokú škálu sacharidov.



Obr. 5. *B. subtilis* produkujúci HA snímaný rastovacím elektrónovým mikroskopom [5].

*B. subtilis* sa v priemyselnom meradle využíva hlavne pre výrobu enzýmov. Vylučuje ich veľké množstvo, ale priemyselne sú najdôležitejšie amylázy a proteázy. Taktiež produkuje antibiotiká, ktoré môžu obsahovať polymyxín, difficidin, subtilin, a mycobacillin. *Bacillus* môže degradovať polyméry, ako sú bielkoviny, škrob, a pektín preto sa významne podieľajú na cykle uhlíka a dusíka. Napriek tomu je pomerne málo zodpovedný za primárne kazeenie potravín. Môže ich kontaminovať, avšak zriedka spôsobuje otravu jedlom. V poľnohospodárstve sa u rastlín sa používa ako fungicíd. Baktérie kolonizované na koreňových systémoch sú totiž schopné konkurovať plesniam, ktoré vyvolávajú ochorenie. *B. subtilis* je výhodný v tom, že ako fungicíd nemá vplyv na človeka. [30, 31, 34]

## 5 IZOLÁCIA A PURIFIKÁCIA KONEČNÉHO PRODUKTU

Po skončení fermentácie je dôležité správne izolovať a purifikovať HA, aby sa neznehodnotila. Vo všetkých fermentačných procesoch sa počas fermentácie HA uvoľňuje do média, je to väčšinou ku konci fermentácie v stacionárnej fáze rastovej krivky. Oddelenie streptokokových buniek je pomerne zložité. Po skončení kvasenia má fermentačné médium strednú dynamickú viskozitu, ktorá sa zvyšuje až dosahuje 2000 až 3000 Pa.s. Z toho dôvodu sa vylučuje možnosť odstredenia, jedine ak použijeme zriedené médium. Pre separáciu a purifikáciu sa zvyčajne používa veľké množstvo organických rozpúšťadiel, ako je etanol, acetón, izopropanol atď. Avšak tento proces je zložitý a časovo náročný, čo vedie k vysokým nákladom. Okrem toho rozpúšťadlá alebo iné pridané látky môžu byť potenciálnymi kontaminantmi a znižovať kvalitu HA. Vo všetkých prípadoch treba byť dôsledný pri odstraňovaní endotoxínov, hlavne ak daná HA má byť použitá v medicíne a farmácii.

V poslednej dobe sa na separáciu využíva opakované zrážanie, ultrafiltrácia alebo zrážanie cetylpyridínium chloridom (CPC). Taktiež sa študuje pomocný vplyv filtračnej pôdy na separáciu biomasy a HA. Rovnako sa hodnotí vplyv na priemernú molekulovú hmotnosť tohto biopolyméru. Vnútoraná viskozita HA sa zvyšuje s nárastom molekulovej hmotnosti, a to predstavuje hlavnú prekážku v priebehu kvasenia rovnako, ako čistenia. Parametre fermentácie, ktoré vyvažujú produkciu HA, ktorá je nepriamo úmerná k rastu, sú veľmi dôležité. [20, 28]

### 5.1 Separácia a purifikácia HA po streptokokovej fermentácii

Purifikácia pre HA získanú jednorazovou kultiváciou prostredníctvom *S. zooepidemicus* sa robieva už bez použitia veľkého množstva rozpúšťadiel, čím sa líši od iných procesov. Postupuje sa nasledovne:

- HA sa z pôdy vyzráža 2-propanolom (1:1, v/v) a resuspenduje v 3% (w/v) octane sodnom
- resuspendovaný roztok HA sa spracuje na silikagély pri izbovej teplote a 150 otáčkach za minútu po dobu 2 hodín
- vyčistený roztok HA sa sústredí centrifugáciou, 20 minút pri 4°C
- HA roztok sa vedie cez aktívne uhlie (0,45  $\mu\text{m}$ ), prietok 14 ml/ min.

- roztok sa ďalej čistí ultrafiltráciou v diafiltračnom móde, po riedeniach s pyrogénou vodou, zriedený roztok sa čerpá (15 až 20 ml/ min.) do filtra s priečnym tokom vybaveného s 50 kDa prerušovanou polyéter sulfónovou kazetou
- roztok HA z diafiltrácie sa sterilizuje prechodom cez filter s 0,22  $\mu\text{m}$  pórmí

Prostredníctvom spracovania na silikagély a aktívneho uhlia sa odstráni až 96 % proteínových nečistôt. Ultrafiltrácia v diafiltračnom móde ďalej odstraňuje nečistoty, čím sa získa produkt s 0,06 % bielkovín. Hoci sa diafiltrácia používala aj pred tým, vyššie uvedení postup je efektívnejší a dáva lepšiu kvalitu HA. Konečná sterilizácia poskytuje sterilnú HA s výťažkom 65 %. Takto získaná HA spĺňa štandard European Pharmacopoeia a je v súlade so špecifikáciami britského liekopisu pre medicínsku HA. Tento proces je jednoduchý a ekonomicky výhodný. [20, 29]

## 5.2 Tangenciálna mikrofiltrácia

Tangenciálna mikrofiltrácia (TFF) je vhodnou metódou pre odstraňovanie zvyškov buniek a získanie syntetizovaného produktu po bakteriálnej fermentácii. Pri tejto metóde tok prúdi tangenciálne cez membránu a kolmo k permeačnému toku. Účinnosť filtrácie závisí na vlastnostiach membrány (veľkosť pórov), produkte a prevádzkových podmienkach (transmembránový tlak, rýchlosť prietoku, koncentračný faktor, čas a pod.). Okrem toho je mikrofiltrácia zvyčajne považovaná za efektívnu za predpokladu, že sa rozpustné látky líšia veľkosťou aspoň 10-krát. Bola vyvinutá aj vysokoúčinná tangenciálna filtrácia, ktorou možno dosiahnuť oddelenie rozpustných látok líšiacich sa veľkosťou menej ako 10-krát. Existujú rôzne stratégie pre maximalizáciu selektivity a kontroly zanášania membrány pri tomto postupe. Používajú sa rôzne prevádzkové podmienky ako vhodné pH, iónová sila, použitie elektricky nabitých membrán a diafiltračný mód, prevádzka za optimálnych hydrodynamických podmienok. [28]

Boli robené štúdiá na izoláciu HA z fermentačnej pôdy, ktorá sa vykonáva dvojstupňovou tangenciálnou mikrofiltráciou (MF) a ultrafiltráciou (UF). Tento proces je založený na koncepcii vysokoúčinnnej tangenciálnej filtrácii. MF membrány by mohli poskytnúť úplne oddelenie buniek a HA a UF membrány zase môžu poskytnúť dobrú separáciu medzi HA a bielkovinami. Z toho dôvodu by tento dvojstupňový proces mohol byť použitý k oddeleniu HA od fermentačnej pôdy. Tento proces s dvoma rôznymi režimami separácie by mohol pri vhodných podmienkach dosiahnuť vyše 77 % celkového výťažku. Filtrácia s tangenciálnym tokom by pritom mohla byť použitá aj vo veľkom meradle. [28]

## 6 POROVNANIE BIOTECHNOLOGICKEJ PRODUKCIE S ĎALŠÍMI MOŽNOSTAMI VÝROBY

V roku 2011 sa celosvetový trh pre HA odhadoval na viac ako jednu miliardu dolárov. So zvyšujúcou sa populáciou trpiacou osteoartritídou sa zvyšuje dopyt po viskosuplementárných produktoch, ktorým je aj HA, takže sa očakáva, že dopyt bude naďalej stúpať. V USA prvá injekcia kyseliny hyalurónovej Synisc-One bola schválená v roku 2009 a bola rýchlo prijatá ako zo strany pacientov, tak aj lekárov. Bolo to vďaka kratšej liečbe a hlavne pre jej pohodlie.

Globálny trh s kožnými výplňami je tiež na vzostupe. V súčasnej dobe existuje už takmer 100 rôznych kožných výplní, z nich asi polovica je založená na kyseline hyalurónovej. Americká spoločnosť pre estetickú a plastickú chirurgiu uvádza, že asi 23 000 dermatológov, plastických chirurgov a kozmetických chirurgov v USA vykonalo viac ako 11,8 miliónov chirurgických a nechirurgických zákrokov v roku 2004, čo predstavuje asi 12,5 biliónov dolárov na poplatkoch. Trh s dermálnymi výplňami sa v USA rozširuje ročne o viac ako 25 % a o 20 % vo zvyšku sveta. Dosiahol tak 1,5 bilióna dolárov v celosvetových predajoch. [2]

### 6.1 Porovnanie

Každá produkčná metóda má svoje výhody aj nevýhody, poprípade nedostatky. Výroba zo sklovca očí rýb by bola racionálna z pohľadu ich využitia, pričom sa predchádza riziku BSE. Extrakcia z kohútích hrebeňov je náročná na pracovnú silu, na financie a na čas. Okrem toho je HA v tkanivách v komplexe s proteoglykanmi a býva často kontaminovaná enzýmami degradujúcimi HA. Je tu tak isto riziko výskytu alergénov. Tiež izolácia v požadovanej čistote a s vyššou molekulovou hmotnosťou je náročná. Preto sa dnes extrakcia z tkanív nahrádza mikrobiálnou výrobou. [20, 16, 5]

Pri mikrobiologickej produkcii *S. zooepidemicus* sa vyhneme živočíšnym produktom a alergénom, ale aj tento proces je energeticky a časovo náročný, aj keď menej ako extrakcia. Existujú však už aj modifikované mikroorganizmy ako *B. subtilis*, kde nehrozí tvorba endo alebo exotoxínov, pričom tieto mikroorganizmy nie sú patogénne. *B. subtilis* ako produkčný mikroorganizmus tiež nie je tak náročný na živné médium ako *S. zooepidemicus*, z čoho vyplýva ďalšie pozitívum. Pomocou tohto mikroorganizmu vzniká pozoruhodne energeticky úsporná technológia, v spojení s použitím vodného rozpúšťadla je

k dnešnému dňu najšetrnejším výrobným procesom HA vzhľadom k životnému prostrediu. Vyvinul sa tiež nový druh separácie HA a purifikácie po fermentácii, ktorá je oproti extrakcii jemnejšia. Takto vyrobená HA nie je cytotoxická, alergénna a je nemutagénna. [5]

Aj keď sa neustále dosahujú veľké pokroky pri produkcii HA pomocou *S. zooepidemicus* a modifikovaných produkčných mikroorganizmov, niektoré problémy zostávajú. Vysoké náklady na suroviny oslabuje konkurencie schopnosť, preto je nutné nájsť lacnejšiu náhradu substrátov, a tak znížiť výrobné náklady. Okrem toho sa skúma uskutočniteľnosť výroby HA s lacnými surovinami alebo odpadmi z iných priemyselných procesov. Takto môžu byť výrobné náklady znížené o viac ako 30 %. [2]

Nadalej sa tiež skúmajú kľúčové faktory obmedzujúce syntézu HA. Treba stále skúmať nové stratégie pre zlepšenie výnosu. Metabolická kontrolná analýza (MCA) kvantifikuje vzťah medzi genetickými modifikáciami alebo zmenami životného prostredia a bunkovou odpoveďou. MFA je analýza metabolického toku, ktorá sa používa pre analýzu biochemických reakcií počas procesu. Kombinácia MCA a MFA môže byť použitá na sledovanie metabolickej odozvy HA producentov na zmeny životného prostredia alebo expresiu kľúčových génov spojených s HA syntézou. Podľa nich sa potom dá zostaviť optimálna stratégia a môže sa tak doceliť zlepšenia koncentrácie HA a jej molekulovej hmotnosti. Tento konkrétny aspekt súvisí s biologickou funkciou. Je potrebné získať HA o definovanej jednotnej veľkosti a rozšíriť jej aplikáciu. Pre zníženie polydisperzity musíme poznať regulačné mechanizmy iniciácie a elongácie počas procesu syntézy tohto polyméru. Cez polymerizačný model sa objasnili niektoré kľúčové intracelulárne metabolity, ktoré ovplyvňujú molekulovú hmotnosť, avšak ešte to nie je dostatočné, aby sme pochopili celý mechanizmus regulácie molekulovej hmotnosti HA. Výskum syntézy hyalurónovej kyseliny je podporovaný jej vysokým komerčným dopytom a taktiež vedeckým záujmom. [2, 20]

## ZÁVER

Pod pojmom biotechnologická výroba kyseliny hyalurónovej som uviedla v tejto práci len zlomok poznatkov, ktoré sú známe a neustále sa prehľbujú a skúmajú. Snaha o dokonalé poznanie syntézy HA rôznymi mikroorganizmami a za rôznych podmienok produkcie a následných možných spracovaní vedie k veľkému množstvu rôznych kombinácií. Vyvinutie ekonomicky výhodného procesu výroby by mohlo znížiť cenu kyseliny hyalurónovej. Jej výnimočné vlastnosti, ktoré ju robia tak žiadanú, sa potom budú môcť viac uplatniť v medicíne, ale aj v bežnom živote.

Biotechnologickou výrobou sa v tomto prípade tiež myslí produkcia geneticky modifikovanými mikroorganizmami. Genetická modifikácia je vedomý zásah človeka do genetickej informácie živého tvora. O GMO sa neustále diskutuje. Hoci postoj Európskej únie je voči nim veľmi konzervatívny, USA je, naopak, v tomto smere otvorená. Tieto postoje tiež ovplyvňujú hlavne priemyselnú výrobu a výskum. A tak sa vytvoril Kartagenský protokol, v ktorom sa dohodli pravidlá používania genetických technológií, spôsob manipulácie s GMO a najmä spôsob obchodovania s nimi v rámci členských i nečlenských štátov Dohovoru. Tento protokol nadobudol účinnosť 11. septembra 2003. Medzi štáty dohovoru patrí okrem desiatok iných štátov aj Slovenská a Česká republika.

Kyselina hyalurónová teda ešte stále zažíva rozmach v priemyselnom svete, pravdepodobne až dotedy, kým nebudú objasnené všetky nezodpovedané otázky cieľavedomých vedcov.



**ZOZNAM POUŽITEJ LITERATURY**

- [1] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinari Medicina*. 2008, roč. 53, č. 8, s. 397-411.
- [2] LIU, Long, Yanfeng LIU, Jinghua LI, Guochen DU a Jian CHEN. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspective. *Microbial cell factories* [online]. Dostupné z: <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/1/99>
- [3] WIDNER, B., R. BEHR, S. VON DOLLEN, M. TANG, T. HEU, A. SLOMA, D. STERNBERG, P. L. DEANGELIS, P. H. WEIGEL a S. BROWN. Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005-07-06, vol. 71, issue 7, s. 3747-3752. DOI: 10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005.
- [4] PATIL, Kanchankumar P., Deepak K. PATIL, Bhushan L. CHAUDHARI a Sudhir B. CHINCHOLKAR. Production of hyaluronic acid from *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 and its wound healing activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011, vol. 111, issue 3, s. 286-288. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.10.012.
- [5] The Science Behind Expression™. ENHANCEMENT MEDICAL. [online]. [cit. 2014-05-19]. Dostupné z: <http://www.enhancementmedical.com/science.html>
- [6] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2006-12-8, vol. 29, issue 1, s. 17-25. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-006-9219-z>
- [7] VLADIMÍR. *Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství*. Brno, 2012. Dostupné z: [http://www.fch.vutbr.cz/media/docs/vr/Velebny\\_teze.pdf](http://www.fch.vutbr.cz/media/docs/vr/Velebny_teze.pdf). Teze habilitační práce. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ.
- [8] CHALUPOVÁ, Zuzana a Ruta MASTEIKOVÁ. Hydratace kůže a kosmetické prostředky. *Praktické lékařství*. 2006, č. 4. Dostupné z: <http://www.praktickelekarenstvi.cz/artkey/lek-200604-0009.php>
- [9] TORVARD, C. Laurent a J. Robert E. FRASER. Hyaluronan. *FASEB J*. 1992, č. 6, s. 2397-2404. Dostupné z: <http://www.fasebj.org/content/6/7/2397.long>
- [10] IZAWA, Naoki, Masaki SERATA, Toshiro SONE, Takeshi OMASA a Hisao OHTAKE. Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011, vol. 111, issue 6, s. 665-670. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.02.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172311000697>

- [11] DELPECH, B., N. GIRARD, P. BERTRAND, M.-N. COUREL, C. CHAUZY a A. DELPECH. Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *Journal of Internal Medicine*. 1997, vol. 242, issue 1, s. 41-48. DOI: 10.1046/j.1365-2796.1997.00172.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2796.1997.00172.x>
- [12] ZHANG, Yanying, AyeAye THANT, Yukiko HIRAIWA, Yuko NAITO, TheThe SEIN, Yasuyoshi SOHARA, Satoru MATSUDA a Michinari HAMAGUCHI. A Role for Focal Adhesion Kinase in Hyaluronan-Dependent MMP-2 Secretion in a Human Small-Cell Lung Carcinoma Cell Line, QG90. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002, vol. 290, issue 3, s. 1123-1127. DOI: 10.1006/bbrc.2001.6321.
- [13] BROWN, MB a SA JONES. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2005, vol. 19, issue 3, s. 308-318. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x>
- [14] MOGOȘANU, George Dan a Alexandru Mihai GRUMEZESCU. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014, vol. 463, issue 2, s. 127-136. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.015.
- [15] KANG, Dong Young, Won-Suk KIM, In Sook HEO, Young Hun PARK a Seungho LEE. Extraction of hyaluronic acid (HA) from rooster comb and characterization using flow field-flow fractionation (FIFFF) coupled with multiangle lights scattering (MALS). *Journal of Separation Science*. 2010, vol. 33, issue 22, s. 3530-3536. DOI: 10.1002/jssc.201000478. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201000478>
- [16] MURADO, M.A., M.I. MONTEMAYOR, M.L. CABO, J.A. VÁZQUEZ a M.P. GONZÁLEZ. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. *Food and Bioprocess Processing*. 2012, vol. 90, issue 3, s. 491-498. DOI: 10.1016/j.fbp.2011.11.002.
- [17] SHAH, Mihir V., Sneha S. BADLE a K.B. RAMACHANDRAN. Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. *Biochemical Engineering Journal*. 2013, vol. 80, s. 53-60. DOI: 10.1016/j.bej.2013.09.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X13002544>
- [18] Streptococcus bacteria, artwork. In: [online]. Dostupné z: <http://www.sciencephoto.com/media/429194/view>
- [19] AKDAMAR, H. Açelya, Nalan Yılmaz SARIÖZLÜ, Ayça Atılır ÖZCAN, Arzu ERSÖZ, Adil DENİZLİ a Rıdvan SAY. Separation and purification of hyaluronic acid by glucuronic acid im-

printed microbeads. *Materials Science and Engineering: C*. 2009, vol. 29, issue 4, s. 1404-1408. DOI: 10.1016/j.msec.2008.10.038.

[20] HIRALDI, Chiara, Annalisa LA a Mario DE. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. *Biopolymers*. Sciyo, 2010-09-28. DOI: 10.5772/10271. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biopolymers/biotechnological-production-characterization-and-application-of-hyaluronan>

[21] KING, R a Mike W ROBINS. *Cancerbiology*. 3rd ed. New York: Pearson/Prentice Hall, 2006, s. 1-31. ISBN 0131294547.

[22] LAPČÍK, L. Jr., BOHDANECKÝ, M., LAPČÍK, L., BAKOŠ, D. Kyselina hyaluronová – příprava, struktúra, vlastnosti, aplikácia. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 1991, roč. 85, č. 3. , str. 281-299. DOI: 0009-2770.

[23] BOERIU, Carmen G., Jan SPRINGER, Floor K. KOOY, Lambertus A. M. VAN DEN BROEK a Gerrit EGGINK. Productio nMethods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2013, vol. 2013, s. 1-14. DOI: 10.1155/2013/624967. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ijcc/2013/624967/>

[24] BALAZS, E. A. The physical properties of synovial fluid and the specific role of hyaluronic acid. *In disorders of theknee* [online]. 1974, Dostupné z: <http://67.20.125.65/wp-content/uploads/2012/04/synovial-fluid.pdf>

[25] LITVIK, R., VANTUCHOVÁ, Y. Hypertrofické a keloidní jizvy pohledem dermatologa. *New EU Magazine of Medicine*[online]. 2011, 1–2, s. 15-17

[26] ATALA, A., LANZA, R., NEREM, R., THOMSON, J. A. *Principles of regenerati-ve medicine*. Boston: Elsevier Academic Press, 2011, 1472 s. ISBN 978-0-12-369410-2.

[27] ÜNLÜER, Özlem Biçen, Arzu ERSÖZ, Adil DENIZLI, Rasime DEMIREL a Rıdvan SAY. Separation and purification of hyaluronic acid by embedded glucuronic acid imprinted polymers into cryogel. *Journal of Chromatography B*. 2013, vol. 934, s. 46-52. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.06.022.

[28] ZHOU, Haidong, Jinren NI, Wen HUANG a Jiandong ZHANG. Separation of hyaluronic acid from fermentation broth by tangential flow microfiltration and ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*. 2006, vol. 52, issue 1, s. 29-38. DOI: 10.1016/j.seppur.2006.03.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586606000967>

[29] RANGASWAMY, Vidhya a Dharmendra JAIN. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Biotechnology Letters*.

2008, vol. 30, issue 3, s. 493-496. DOI: 10.1007/s10529-007-9562-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-007-9562-8>

[30] GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, s. 41-50. ISBN 80-967064-9-7.

[31] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008, s. 265-273. ISBN 9788020017031.

[32] CHONG, Jenny. Streptococcus zooepidemicus. [online]. Dostupné z: [http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus\\_zooepidemicus](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_zooepidemicus)

[33] IZAWA, Naoki, Tomoko HANAMIZU, Ryoko IIZUKA, Toshiro SONE, Harumi MIZUKOSHI, Kazumasa KIMURA a Katsuyoshi CHIBA. Streptococcus thermophilus produces exopolysaccharides including hyaluronic acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009, vol. 107, issue 2, s. 119-123. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2008.11.007.

[34] UCAR, Margo a M GLOGOWSKI. *Bacillus subtilis* [online]. Dostupné z: [http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus\\_subtilis](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_subtilis)

[35] CHO, Y.-S., J.-W. LEE, J.-S. LEE, J. H. LEE, T. R. YOON, Y. KUROYANAGI, M. H. PARK a H. J. KIM. Hyaluronic acid and silver sulfadiazine-impregnated polyurethane foams for wound dressing application. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. vol. 13, issue 9, s. 861-865. DOI: 10.1023/A:1016500429225.

[36] DRAELOS, Zoe Kececioglu. *Cosmetic dermatology: products and procedures*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell Pub., 2010, xvi, 532 p. ISBN 14-051-8635-6.

[37] SWANN, David A. Studies on hyaluronic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1968, vol. 156, issue 1, s. 17-30. DOI: 10.1016/0304-4165(68)90099-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304416568900998>

[38] DE LUCA, Claudio, Manfred LANSING, Irene MARTINI, Fabiana CRESCENZI, Gwo-Jenn SHEN, Michael O'REGAN a Chi-Huey WONG. Enzymic Synthesis of Hyaluronic Acid with Regeneration of Sugar Nucleotides. *Journal of the American Chemical Society*. 1995, vol. 117, issue 21, s. 5869-5870. DOI: 10.1021/ja00126a034.

[39] HASEGAWA S, Nagatsuru M, Shibutani M: Productivity of concentrated hyaluronic acid using maxblend fermentor. *J Biosci Bioeng* 1999, 88:68-71.

- [40] MAO, Zichao, Hyun-Dong SHIN, Rachel CHEN, Guocheng DU a Jian CHEN. A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis: current state, challenges, and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, vol. 84, issue 1, s. 63-69. DOI: 10.1007/s00253-009-1963-2. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-1963-2>
- [41] PRASAD SB, JAYARAMAN G, RAMACHANDRAN KB: Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, 86:273-283.
- [42] *Fermentačná část* [online]. [cit. 2014-05-21]. Dostupné z: [http://webcast.skola-profession.cz/Contexts/profession/Documents/SMB\\_Fermentace.pdf](http://webcast.skola-profession.cz/Contexts/profession/Documents/SMB_Fermentace.pdf)

**ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK**

HA	kyselina hyalurónová
GAGs	glykozaminoglykán
NMF	látky prirodzeného hydratačného faktoru
Da	dalton
CPC	cetylpyridinium chlorid
UDP	uridintdifosfát
UTP	uridintrifosfát
ATP	adenozintrifosfát
PmHAS	HA syntáza pochádzajúca z <i>P. multocida</i>
GlcUA	glukurónová kyselina
GlcNAc	N-acetyl glukózamin
<i>hasA</i>	gén hyaluronan syntáza
<i>hasB</i>	gén UDP-glukóza dehydrogenáza
<i>hasC</i>	gén UDP-glukóza pyrofosforyláza
<i>hasD</i>	gén glmU paralóg kódujúci funkciu enzýmov acetylstrasferáza a pyrofosforyláza
<i>hasE</i>	gén fosfoglukoizomeráza
<i>tuaD</i>	gén kódujúci homológ k <i>hasB</i>
<i>gtaB</i>	gén kódujúci homológ k <i>hasC</i>
<i>gcaD</i>	gén kódujúci homológ k <i>hasD</i>
Pa.s	jednotka dynamickej viskozity
QPS	qualified presumption of safety
GRAS	generally recognized as safe
v/v	objemová koncentrácia
w/v	hmotnostná koncentrácia

BSE	bovinná spongioformná encefalopatia
TFF	tangenciálna mikrofiltrácia
HATFF	vysoko účinná tangenciálna mikrofiltrácia
DNA	deoxyribonukleová kyselina
MCA	metabolická kontrolná analýza
MFA	analýza metabolického toku
GMO	geneticky modifikované mikroorganizmy

**ZOZNAM OBRÁZKOV**

<i>Obr. 1. Základná štruktúra kyseliny hyalurónovej [6].</i>	12
<i>Obr. 2. Používané formy HA [20].</i>	16
<i>Obr. 3. Rozdelenie produkčných metód [20].</i>	19
<i>Obr. 4. Všeobecná stavba streptokokov [18].</i>	32
<i>Obr. 5. B. subtilis produkujúci HA snímaný rastovacím elektrónovým mikroskopom [5].</i>	35



## ZOZNAM TABULIEK

<i>Tab. 1. Koncentrácia HA z rôznych zdrojov [16].....</i>	18
--	----

## ZOZNAM PRÍLOH

*Príloha I. Schéma produkcie HA S. zooepidemicus [2].*

PRÍLOHA 1: SCHÉMA PRODUKCIE HAS. ZOOEPIDEMICUS [2].

