



Scan online to view this article

Optimization of pH and glucose concentration of culture media for enhancement of hyaluronic acid production by *Streptococcus equisimilis* group C and G

Fatemeh Khani¹, Malihe Keramati^{2*}, Banafsheh Kazemi¹, Zahra Amini Tehrani², Fereshteh Shahcheraghi³

1. Basic science faculty, Islamic Azad University, Damghan Branch
2. Department of Nano-Biotechnology, Pasteur Institute of Iran
3. Microbiology Department, Pasteur Institute of Iran

Abstract

Aim and background: Hyaluronic acid (HA) is a natural linear polysaccharide with excellent viscoelasticity, high water retention capacity and biocompatibility finding wide-range of application in medicine, drug delivery and cosmetics. Currently, microbial fermentation is used for industrial HA production. The present study reports screening and optimization of HA production by clinical *Streptococcus equisimilis* group C and G (GCS and GGS) isolates from Iranian patients.

Materials and Methods: The 11 *S. equisimilis* strains including 9 GCS and 2 GGS were characterized and primary HA production was quantified by carbazol assay. Accordingly, three strains were selected for further optimization. The effect of pH on HA yields at 12 points ranging from 3.1-7.5 and glucose concentrations ranging from 0.3-15 mg/ml at 11 points at optimized pH were determined for selected strains.

Results: The range of HA concentration among 11 strains was 216.6-729.7 µg/ml. The three higher producer strains including GCS-08, GGS-88 and GGS132 with an average production of 573.0, 579.7 and 729.7 µg/ml, respectively was selected. The HA concentrations at optimized pH of selected strains were (6.5, 744.3 µg/ml), (4.8, 598.9 µg/ml) and (6.8, 1041.8 µg/ml) respectively. Cultivation at 15 mg/ml of glucose led to increasing HA yield by GCS-08:1096.4, GGS-88:1234.3 and GGS-132:1993.6 µg/ml.

Conclusion: The findings showed the significant effect of pH and direct correlation of glucose concentration on HA production that can increase the yield up to 2.73 folds. Identification of high producer strain at pH 4.8 would be an advantage for HA production under unusual condition at industrial scale.

Key Words: Hyaluronic acid, *Streptococcus equisimilis*, fermentation, optimization, glucose, pH

Corresponding author:

Department of Nano-Biotechnology, Pasteur Institute of Iran
Email: keramati.malihe@gmail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

تولید هیالورونیک اسید توسط سویه های *Streptococcus equisimilis* گروه های C و G

فاطمه خانی^۱، ملیحه کرامتی^{۲*}، بنفشه کاظمی^۱، زهرا امینی تهرانی^۲، فرشته شاهچراغی^۳

۱- دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

۲- بخش نانوبیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران

۳- بخش میکروب شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران

چکیده

سابقه و هدف: هیالورونیک اسید بیوپلی مری طبیعی و خطی است که به دلیل خصوصیت ویسکوالاستیک، ظرفیت بالای جذب آب و زیست سازگاری کاربردهای وسیعی در پزشکی، دارورسانی و صنایع آرایشی دارد. امروزه تولید صنعتی آن از طریق فرمنتاسیون سویه های استرپتوکوکی است. تحقیق کنونی گزارشی از غربالگری و بهینه سازی شرایط تولید هیالورونیک اسید توسط سویه های استرپتوکوکی بالینی گروه های C و G جدا شده از بیماران ایرانی است.

مواد و روش ها: یازده سویه استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس (*S. equisimilis*) شامل نه سویه گروه C و دو سویه گروه G شناسایی و تولید اولیه هیالورونیک اسید به روش کمپلوسومتری با کاربازول تعیین شد و بر اساس نتایج سه سویه با بیشترین تولید جهت بهینه سازی انتخاب شدند. جهت تعیین pH بهینه، دوازده نقطه در دامنه ۳/۱-۷/۵ و غلظت گلوکز در یازده نقطه در دامنه ۰/۳ تا ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر و در pH بهینه ارزیابی و بازده هیالورونیک اسید توسط سویه های منتخب تعیین شد.

یافته ها: میانگین غلظت هیالورونیک اسید تولید شده در یازده سویه بالینی بین ۲۱۶/۶ تا ۷۲۹/۷ میکروگرم در میلی لیتر متغیر بود. سه سویه با بیشترین تولید شامل سویه های GCS-08، GGS-88 و GGS-132 و میانگین غلظت هیالورونیک اسید به ترتیب ۵۷۳/۰، ۵۷۹/۷ و ۷۲۹/۷ میکروگرم در میلی لیتر جهت مطالعه های بهینه سازی انتخاب شدند. pH بهینه و مقدار هیالورونیک اسید برای هر سویه به ترتیب ۶/۵ (pH ۷۴۴/۳) و GCS-08، ۴/۸ (pH ۵۹۸/۹) و GGS-88 و ۶/۸ (pH ۱۰۴۱/۸) و GGS-132 بود. کشت در محیط حاوی گلوکز با غلظت ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر باعث افزایش تولید هیالورونیک اسید توسط سویه ها به ترتیب ۱۰۹۶/۶، GCS-08: ۱۲۳۴/۳، GGS-88: ۱۹۹۳/۶ و GGS-13: ۱۹۹۳/۶ میکروگرم در میلی لیتر شد.

نتیجه گیری: نتایج نشان دهنده اثر معنی دار pH و رابطه مستقیم غلظت گلوکز بر بازده هیالورونیک اسید است که می تواند باعث افزایش تولید تا ۲/۷۳ برابر شود. شناسایی سویه تولید کننده در pH اسیدی ۴/۸ مزیتی برای تولید صنعتی هیالورونیک اسید در شرایط غیر معمول است.

واژه های کلیدی: هیالورونیک اسید، *S. equisimilis*، فرمنتاسیون، بهینه سازی، گلوکز، pH

مقدمه

هیالورونیک اسید بیوپلی مری خطی طبیعی مشتمل بر تکرار واحدهای دی ساکاریدی بتا-۱ و ۴ گلوکورونیک اسید و بتا ۱ و ۳ ان- استیل گلوکزآمین با وزن مولکولی متنوع از ۵۰۰۰ دالتون تا ۲۰ میلیون دالتون است (۱). به دلیل ویسکوزیته عالی،

نویسنده مسئول:

بخش نانوبیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران

پست الکترونیکی: keramati.malihe@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۰۲

سرعت تولید هیالورونیک اسید وابسته به سرعت واکنش‌های مسیر بیوسنتز هیالورونیک اسید در سویه های استرپتوکوکی است. مقایسه بیوسنتز هیالورونیک نشان داده است که سرعت واکنش های آنزیمی هیالورونیک اسید سنتاز در سویه های استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس ۲-۲/۴ برابر بیش تر از سویه های استرپتوکوک پیوژنز و استرپتوکوک زواپیدمیکوس است (۸). هم چنین این سویه ها پروتئین های ترشحي کم تری نسبت به استرپتوکوک پیوژنز دارند که این موضوع موجب کاهش پیچیدگی فرآیندهای تخلیص و در نتیجه افزایش کیفیت و بازده تخلیص بیوپلی مر خواهد شد (۴). در مطالعه کنونی ابتدا با غربالگری سویه های استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس گروه های C(GCS) و G(GGS) جدا شده از بیماران ایرانی مقدار هیالورونیک اسید تولید شده در هر یک از سویه ها تعیین شد و سپس بررسی شرایط بهینه برای سویه های منتخب و تأثیر pH و گلوکز به عنوان دو عامل بسیار مهم در بازده هیالورونیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است هیچ گزارش قبلی در مورد تعیین مقدار و بررسی تولید هیالورونیک اسید در استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس گروه G وجود ندارد. به طور مسلم شناسایی سویه های تولید کننده مؤثر و کم خطر و تعیین شرایط حداقلی جهت حداکثر تولید موجب کاهش هزینه های تولید هیالورونیک اسید در مقیاس صنعتی خواهد شد.

مواد و روش ها:

مشخصات سویه ها، شرایط رشد و نگهداری:

سویه های مورد استفاده در این تحقیق، سویه های استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس گروه C (۹ سویه) و گروه G (۲ سویه) ایزوله های غیر تهاجمی جدا شده از گلو و شناسایی شده در طی تحقیق انجام شده در انستیتو پاستور ایران است (۹). این سویه ها به صورت لیوفیلیزه در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شده اند. با این حال مجدد پس از کشت و رشد در محیط کشت (ایبرسکو، ایران، Brain Heart Infusion (BHI) آزمون های بررسی هاله لیز در محیط کشت بلاد آگار و آزمون های بیوشیمیایی با استفاده از قندهای لاکتوز، سوربیتول، تری هالوز و ریبوز انجام شد (۱۰).

غربالگری اولیه و تعیین مقدار هیالورونیک اسید در سویه های گروه GGS, GCS

غربالگری اولیه سویه ها بر اساس مورفولوژی و مشاهده کلنی های موکوتیدی ناشی از تولید کپسول هیالورونیک اسید و نیز بر اساس قطر هاله همولیز پس از رشد در محیط کشت بلاد آگار انجام گرفت. سپس جهت تعیین مقدار کمی هیالورونیک اسید،

ظرفیت جذب آب فوق العاده بالا، غیرایمونوزن و زیست سازگاری کاربرد بیولوژیک، داروسازی و مهندسی بافت، ترمیم زخم، جراحی چشم و مفاصل و جراحی های زیبایی پیدا کرده است (۲). روش های اولیه تولید صنعتی آن استخراج از چشم گاو و تاج خروس است که به دلیل کیفیت متغیر و پتانسیل آلودگی با ویروس ها امروزه با روش های تخلیص از باکتری های تولید کننده کپسول هیالورونیک اسید از جمله استرپتوکوک ها جایگزین شده است (۳). مهم ترین سویه های گسترده ای در پیشگیری و درمان بیماری ها، تحقیقات پزشکی و به کار برده شده به این منظور شامل استرپتوکوک پیوژنز (*S. pyogenes*) استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس (*S. equisimilis*) و استرپتوکوک زواپیدمیکوس (*S. zooepidemicus*) هستند. تحقیقات نشان داده است که تولید هیالورونیک اسید در استرپتوکوک ها با مکانیسم یکسان و با پلی مریزاسیون پیش سازهای مونوساکاریدی توسط آنزیم هیالورونیک اسید سنتاز انجام می شود (۴). استفاده از سویه های میکروبی به دلیل امکان کنترل شرایط رشد، کنترل روش های فرمنتاسیون، استخراج و خالص سازی منجر به بهبود فرآیند و بازده تولید و کیفیت فرآورده شده است. در فرآیندهای فرمنتاسیون مهم ترین عوامل تأثیرگذار در بازده فرآیند انتخاب سویه مناسب، بهینه سازی شرایط کشت و تولید و استفاده از روش های بهینه خالص سازی است. مطالعه ها نشان می دهد که بهینه سازی شرایط کشت از قبیل دما، pH، میزان هوادهی، سرعت هم زدن، میزان اکسیژن حل شده، میزان استرس ناشی از pH و نوع راکتور زیستی به طور قابل توجهی تولید هیالورونیک اسید را تحت تأثیر قرار می دهند (۵). بیوسنتز هیالورونیک اسید فرآیند چند مرحله ای است. که با رشد سلول و ساخت دیواره باکتریایی در پیش سازی از قبیل گلوکز ۱- فسفات، UDP- گلوکز و UDP- N- استیل گلوکز آمین مشترک است و رقابت بین بیوسنتز هیالورونیک اسید و رشد سلول برای مصرف این پیش سازها وجود دارد، بنابراین کنترل منابع کربنی و شرایط رشد در کاهش میزان تشکیل توده سلولی و افزایش میزان هیالورونیک اسید مؤثر است (۶). در بررسی منابع کربنی، گلوکز مؤثرترین ماده شناسایی شده است با این حال افزایش غلظت آن گاهی تأثیر چندانی در تولید هیالورونیک اسید نداشته و افزایش به نفع رشد و افزایش توده سلولی است. میزان اسیدیته محیط تولید به طور قابل توجهی در بازده تولید مؤثر است کاهش pH از حد بهینه آن منجر به کاهش رشد باکتری و در نتیجه کاهش تولید هیالورونیک اسید می شود (۷).

چند کلنی از هر یک از سویه ها از محیط بلاد آگار به ۵ میلی-لیتر محیط کشت BHI انتقال داده شد پس از یک شبانه روز کشت و تعیین مقدار دانسیته نوری در ۶۰۰ نانومتر، هر یک از سویه ها به نسبت V/V ۱۰٪ در دانسیته نوری ۰/۵ پس از سانتریفیوژ و شستشو با ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات به محیط تولید شامل اجزا ذکر شده در جدول ۱ در pH حدود ۷/۰، تلقیح شد. رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۶ ساعت برای کلیه سویه ها انجام شد.

جدول ۱- مواد و مقادیر لازم جهت تهیه محیط تولید هیالورونیک اسید pH حدود ۷/۰

مواد	غلظت (mg/ml)
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	۱/۵
KH ₂ PO ₄	۰/۵
Mg ₂ SO ₄ .7H ₂ O	۰/۵
Yeast Extract	۱۰
Glucose	۵

استخراج هیالورونیک اسید

جهت آزاد شدن کپسول هیالورونیک اسید، معادل حجم اولیه محیط تولید، نرمال سالین حاوی (w/v) ۰/۱٪ SDS اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی مخلوط شد. سپس با سانتریفیوژ ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه توده سلولی جداسازی شد. به منظور حذف پروتئین های موجود در سوپرناتانت محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰۰٪ با نسبت ۱:۴ اضافه و انکوباسیون شبانه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از حذف پروتئین با رسوب دهی، جهت جداسازی هیالورونیک اسید چهار برابر حجم محلول باقی مانده، اتانول مطلق اضافه شد با سانتریفیوژ ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه رسوب هیالورونات سدیم جمع آوری شده و در نهایت رسوب در ۲۰۰ میکرولیتر آب حل شد (۱۱)

بررسی میزان تولید هیالورونیک اسید با استفاده از واکنش کاربازول و رسم منحنی استاندارد گلوکورونیک-اسید

به منظور تعیین غلظت هیالورونیک اسید استخراج شده، از گلوکورونیک اسید با غلظت های متغیر ۵۰-۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (۴۰۰ و ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰) به میزان ۵۰ میکرولیتر و ۵۰ میکرولیتر از نمونه استخراج شده و رقیق شده با آب با نسبت های ۱:۳۲ و ۱:۱۶ به چاهک های پلیت ۹۶ خانه- ای اضافه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم بورات حل شده در سولفوریک اسید با غلظت ۲۵ میلی مولار به نمونه ها و استانداردها اضافه شده و سپس در ۸۰ درجه سانتی گراد به-

مدت ۲۰ دقیقه در آون انکوبه شد. بعد از سرد شدن تا حد دمای اتاق کاربازول ۰/۱۲۵٪ (۵۰ میکرولیتر) حل شده در اتانول مطلق با دقت افزوده شد و مجدد در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه دیگر انکوبه شد. پس از سرد شدن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، جذب نوری در ۵۵۰ نانومتر قرائت شده و پس از رسم منحنی استاندارد، غلظت بیوپلی مر تعیین شد. کلیه غلظت های مربوطه منحنی استاندارد و نمونه ها در تکرارهای سه تایی انجام شد و میزان انحراف از استاندارد، انحراف نسبی و ضریب هم بستگی خط در هر بار آزمون مورد ارزیابی قرار گرفت تا از صحت، تکرارپذیری و خطی بودن منحنی استاندارد و شرایط صحیح آزمون اطمینان حاصل شود. دقت تعیین مقدار در روش کمپلکسومتری با کاربازول در مورد پلی-ساکاریدهای دارای واحدهای گلوکورونیک اسید مانند هیالورونیک اسید در حد یک میکروگرم در میلی لیتر است (۱۲).

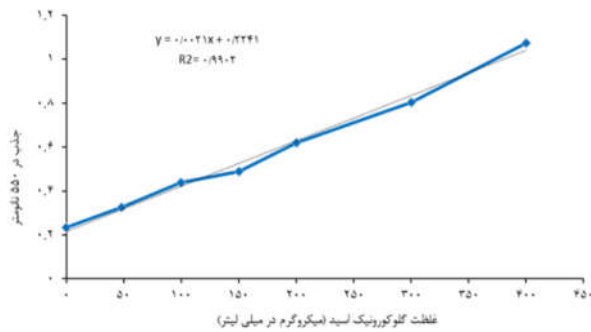
بررسی اثرهای pH و میزان گلوکز در بازده هیالورونیک-اسید

پس از تعیین مقدار کمی تولید هیالورونیک اسید در هر یک از سویه ها، اثرهای pH و غلظت گلوکز در میزان تولید در مورد سه سویه منتخب (GGS-132, GGS-88, GCS-08) بررسی شد. بدین منظور ابتدا محیط کشت مطابق جدول ۱ و با غلظت گلوکز ۵ میلی گرم در میلی لیتر تهیه شد با این تفاوت که pH با افزودن اسید فسفریک و یا هیدروکسید سدیم در ۱۲ نقطه تعیین شده مطابق جدول ۲ تنظیم شد. تولید، استخراج و تعیین مقدار هیالورونیک اسید برای هر یک از سویه های منتخب همانند روشی که توضیح داده شد انجام شد پس از تعیین شرایط بهینه pH برای هر یک از سویه ها محیط تولید شامل مقادیر مختلف گلوکز مطابق جدول ۲ تهیه و مجدد تعیین مقدار هیالورونیک اسید برای سه سویه، GGS-132 GGS-88, GCS-08 انجام شد.

جدول ۲- دامنه pH و غلظت- های مختلف گلوکز

pH					
۳/۱	۳/۵	۳/۸	۴/۱	۴/۵	۴/۸
۵/۵	۵/۸	۶/۰	۶/۵	۶/۸	۷/۵
غلظت گلوکز (میلی گرم در میلی لیتر)					
-	۰/۳	۰/۹	۱/۵	۲/۴	۳/۰
۴/۶	۶/۰	۷/۵	۹/۰	۱۰/۵	۱۵/۰

آنالیز آماری



شکل ۲- شکل بالا: منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف گلوکوزونیک‌اسید و جذب کمپلس در ۵۵۰ نانومتر، شکل پایین: میکروپلیت در مرحله نهایی تشکیل کمپلس بنفش رنگ یورونیک‌اسید و کاربازول که غلظت‌های متغییر مربوط به منحنی استاندارد در تکرارهای سه‌تایی در سمت راست میکروپلیت قابل مشاهده است و سایر چاهک‌ها مربوط به هیالورونیک استخراج شده از سویه‌های باکتریایی در رقت‌های ۱:۱۶ و ۱:۳۲ و تکرارهای سه‌تایی است.

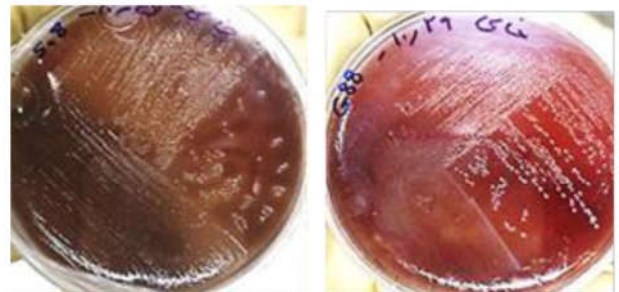
همان‌طور که در جدول ۳ آمده است میزان هیالورونیک‌اسید یازده سویه از ۲۱۶/۶ تا ۷۲۹/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر متغییر است. مقدار هیالورونیک‌اسید در هر دو سویه متعلق به گروه G: GGS-88, GGS-132 به ترتیب $579/2 \pm 7/8$ و $729/6 \pm 6/6$ میکروگرم در میلی‌لیتر است که نسبت به سویه‌های گروه C مقدار بیش‌تری است بنابراین هر دو سویه جهت بررسی‌های بیش‌تر انتخاب شدند. از بین سویه‌های گروه C سویه GCS-08 با مقدار تولیدی $573/5 \pm 0/7$ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان سویه منتخب در این گروه شناسایی شد که در جدول ۳ پررنگ تر از سایر سویه‌ها مشخص شده است.

جهت مقایسه بازده هیالورونیک‌اسید در سویه‌های منتخب GGS-88, GGS-132 و GCS-08 و نیز تعیین اثرهای عوامل pH و غلظت گلوکز بر بازده، اساس آزمون t-test با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 انجام شد و ارزش p کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

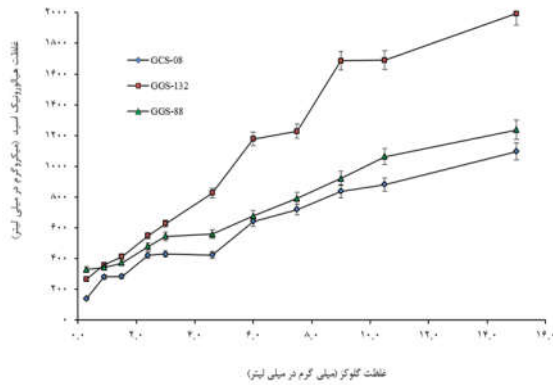
شناسایی سویه‌های استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس و تعیین اولیه مقدار هیالورونیک‌اسید

مورفولوژی و هاله لیز و تخمیر قندها یازده سویه استرپتوکوک شامل نه سویه متعلق به گروه C و دو سویه متعلق به گروه G مورد ارزیابی قرار گرفت. نتیجه کشت دو سویه منتخب GGS-88, GCS-08 که نشان دهنده کلنی‌های بزرگ خاکستری رنگ موکوئیدی است در شکل شماره ۱ آمده است.



شکل ۱- نتایج همولیز GGS-88, GCS-08 در محیط کشت بلاد آگار که همولیز گاما و تشکیل کلنی‌ها بزرگ خاکستری رنگ و موکوئیدی-GGS-88 و همولیز بتا و کلنی‌های سفید رنگ GCS-08 قابل مشاهده است.

پس از تأیید کلیه سویه‌ها، تعیین مقدار هیالورونیک‌اسید کشت-های باکتریایی در تکرارهای سه‌تایی برای هر سویه و براساس منحنی استاندارد انجام شد. منحنی استاندارد (شکل ۲) با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکوزونیک‌اسید در برابر جذب نوری و ضریب هم‌بستگی $0/9902$ نشان‌دهنده ارتباط خطی بین مقدار گلوکوزونیک‌اسید و جذب نوری است. در روش سنجش مقدار هیالورونیک‌اسید با کاربازول افزودن اسیدسولفوریک در دمای بالا موجب تجزیه هیالورونیک‌اسید به مونومرهای تشکیل‌دهنده آن یعنی گلوکوزونیک‌اسید و ان-استیل‌گالاکتوز آمین و تبدیل گلوکوزونیک‌اسید به یورونیک-اسید می‌شود که با کاربازول کمپلکس پایدار بنفش رنگ پایدار را تشکیل خواهد داد (شکل ۲).



نام سویه	غلظت هیالورونیک اسید *	نام سویه	غلظت هیالورونیک-اسید *
GGS-88	۵۷۹/۲±۷/۸	GGS-132	۷۲۹/۶±۶/۶
GCS-04	۲۱۶/۲±۶/۷	GCS-05	۴۶۹/۴±۱/۸
GCS-08	۵۷۳/۵±۰/۷	GCS-17	۳۵۳/۲±۲/۹
GCS-19	۵۱۷/۲±۰/۵	GCS-87	۲۳۱/۵±۳/۵
GCS-91	۴۰۶/۴±۳/۴	GCS-131	۴۱۴/۹±۴/۱
GCS-9542	۵۲۰/۶±۳/۱		

جدول ۳- میزان هیالورونیک اسید تولید شده توسط سویه های بالینی *غلظت های محاسبه شده میانگین سه بار تکرار است.

شکل ۴- غلظت هیالورونیک اسید در سویه های GGS-88, GGS-132 و GCS-08 در برابر غلظت های متفاوت گلوکز

همان طور که در شکل ۴ و جدول ۴ آمده است مقدار هیالورونیک اسید تولید شده GCS-08 و GGS-88 و GGS-132 در مقدار ۱۵ میلی گرم در میلی لیتر گلوکز توسط هر یک از آنها به ترتیب ۱۰۹۶/۴±۴/۳ و ۱۲۳۴/۳±۶/۹ و ۱۹۹۳/۵±۶/۶ میکروگرم در میلی لیتر بود که نسبت به مقدار اولیه به ترتیب ۱/۹۱ و ۲/۱۳ و ۲/۷۳ برابر افزایش را نشان داد.

جدول ۴- میزان اولیه و پس از بهینه سازی pH و گلوکز هیالورونیک اسید در سویه های GGS-88, GGS-132, GCS-08

نام سویه	غلظت اولیه	pH بهینه	غلظت در pH بهینه	غلظت در pH و گلوکز بهینه
GCS-08	۵۷۳/۵±۰/۷	۶/۵	۷۴۴/۸±۳/۳	۱۰۹۶/۴±۴/۳
GCS-88	۵۷۹/۲±۷/۸	۴/۸	۵۹۸/۵±۹/۹	۱۲۳۴/۳±۶/۹
GGS-132	۷۲۹/۶±۶/۶	۶/۸	۱۰۴۱/۹±۸/۱	۱۹۹۳/۵±۶/۶

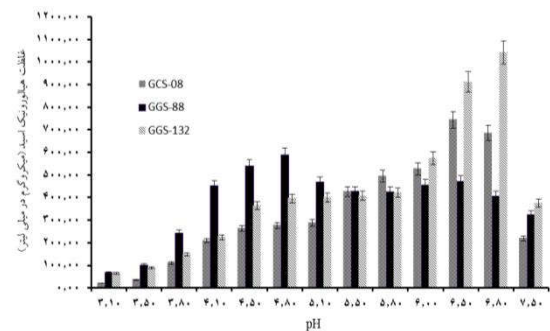
*غلظت های محاسبه شده میانگین سه بار تکرار است.

بحث

هیالورونیک اسید در استرپتوکوک ها متابولیت ثانویه محسوب می شود و تولید آن به فاکتورهای مختلفی از جمله عوامل ژنتیکی و محیط رشد و مواد مغذی به طور کامل وابسته است (۱۳). بنابراین اولین مرحله در فرآیندهای تولید هیالورونیک-اسید، انتخاب سویه مناسب جهت تولید است. در مطالعه حاضر با غربالگری سویه های استرپتوکوکی گروه های C و G سویه-های مؤثر در تولید بیوپلی مر هیالورونیک اسید شناسایی شدند و نشان داده شد که گلوکز و pH به عنوان دو عامل مؤثر بر میزان تولید هیالورونیک اسید در سویه های استرپتوکوکی نقش دارند. در این مطالعه مشخص شد که سویه استرپتوکوکی متعلق به گروه G تنها با بهینه سازی شرایط محیط کشت قادر به تولید ۱۹۹۳/۵±۶/۶ میکروگرم در میلی لیتر هیالورونیک اسید است

اثرهای pH در میزان بازده هیالورونیک اسید

جهت بررسی اثر pH، غلظت گلوکز در محیط تولید به مقدار ۵ میلی گرم در میلی لیتر ثابت در نظر گرفته شد (جدول ۱) و pH محیط در دامنه ۳/۱-۷/۵ در دوازده نقطه مطابق با جدول ۲ تهیه و پس از تولید و استخراج و تخلیص تعیین مقدار هیالورونیک اسید (شکل ۳) انجام شد. همان طور که شکل ۳ و جدول ۴ نشان می دهد حداکثر بازده هیالورونیک اسید در سویه GCS-08 در pH ۶/۵ (۷۴۴/۸±۳/۳ میکروگرم در میلی لیتر)، GGS-132 در pH ۶/۸ (۱۰۴۱/۹±۸/۱ میکروگرم در میلی-لیتر) و GGS-88 در pH ۴/۸ (۵۹۸/۵±۹/۹) میکروگرم در میلی لیتر) بوده است.



شکل ۳- تأثیر pH بر بازده هیالورونیک اسید در سویه های GGS-88, GGS-132 و GCS-08

تأثیر غلظت گلوکز در بازده هیالورونیک اسید در pH بهینه

در مطالعه حاضر، pH بهینه برای هر یک از سویه های GGS-132, GCS-08 و GGS-88 متفاوت است، اما در مقابل، غلظت گلوکز اثر مستقیم بر بازده تولید هیالورونیک اسید داشته است (شکل ۴).

ورود متابولیت‌های ناشی از رشد به محیط کشت افزایش یافته و در نهایت سبب کاهش pH می‌شود. در این شرایط در مورد فرآورده‌ای مانند هیالورونیک‌اسید افزودن قلیا جهت حفظ بهینه pH الزامی است که در مقیاس صنعتی هزینه‌ها و پیچیدگی کنترل pH را به دنبال خواهد داشت. از طرفی با انتخاب سویه مناسب و دارای قابلیت رشد و تولید هیالورونیک‌اسید در pH اسیدی، امکان استفاده از بسیاری از خروجی‌های صنایع غذایی مانند ملاس نیشکر و آب پنیر به‌عنوان محیط کشت فراهم می‌شود که در نهایت منجر به کاهش هزینه‌های تولید فرآورده خواهد شد (۲۱).

بررسی تأثیر غلظت گلوکز حاکی از اثر مستقیم غلظت در تولید هیالورونیک‌اسید است. به این ترتیب که با افزایش گلوکز تا غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، میزان بازده هیالورونیک‌اسید، نیز افزایش یافت که مطابق با یافته‌های پیشین است. (۲۰).

بررسی اثرهای منابع کربنی مانند گلوکز، گالاکتوز، سوکروز، مالتوز، فروکتوز و منابع نیتروژنی مانند عصاره مخمر، پپتون، عصاره گوشت و انفوزیون مغزی-قلبی در تولید هیالورونیک‌اسید توسط استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس نشان داده است که از بین منابع کربنی و نیتروژنی به‌ترتیب گلوکز و عصاره مخمر بهترین گزینه‌ها در تولید هیالورونیک‌اسید در سویه‌های استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس گروه C هستند و در شرایط بهینه غلظت هر یک از این منابع (به‌ترتیب ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و pH حدود ۷/۸ بیش‌ترین مقدار تعیین شده ۱۷۶/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (۲۰). با این حال در مطالعه کنونی در pH بهینه و در حداکثر گلوکز بررسی شده ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر میانگین غلظت هیالورونیک‌اسید بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر در سویه‌های منتخب (۱۰۹۶/۴) GCS-08، (۱۲۳۴/۳) GGS-88 و (۱۹۹۳/۶) GGS-132 بود که حتی در کم‌ترین مقدار حدود ۶/۲ برابر مقدار گزارش شده قبلی است. یکی از دلایل مهم کارایی بیش‌تر گلوکز در مقایسه با سایر منابع کربنی جذب مستقیم آن توسط مکانیسم‌های برداشت باکتری است که به‌سرعت توسط آنزیم‌های حدواسط به پیش‌سازهای اولیه تبدیل می‌شود. اما در مورد سایر منابع کربنی، واکنش‌های حدواسط و شکسته شدن قند اولیه و تبدیل به گلوکز الزامی است که در شرایط کاهش انرژی می‌تواند به‌عنوان عامل محدودکننده واکنش‌های مسیر بیوسنتز هیالورونیک‌اسید عمل نماید (۲۰، ۲۲).

بیوسنتز هیالورونیک‌اسید در استرپتوکوک‌ها نیازمند انرژی فراوان و در رقابت با رشد باکتری جهت مصرف گلوکز به‌عنوان

که در مقایسه با مطالعه‌های قبلی سویه‌های طبیعی و غیر موتانت مقدار تولید قابل توجهی است (۱۷-۱۴). از طرفی نشان داده شد که سویه دیگری از همین گروه (GGs-88) دارای پتانسیل تولید در pH اسیدی و پایین‌تر از حد معمول است. باید به این موضوع توجه داشت که کاهش بازده هیالورونیک-اسید در اثر افزایش pH بیش از ۷/۵ و کاهش کم‌تر از ۶/۰ در سویه‌های متعلق به گروه C گزارش شده است (۱۳). کاهش بازده هیالورونیک‌اسید به‌دلیل کاهش pH محیط کشت ناشی از مصرف زیاد منابع کربنی است که منجر به تولید اسید لاکتیک و اسید استیک و در نهایت کاهش pH محیط کشت می‌شود (۱۴). مطالعه‌های قبلی نشان دادند که اغلب سویه‌های استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس و استرپتوکوک زواید میکوس گروه C بیش‌ترین بازده تولید در pH دامنه ۶/۵-۷/۵ دارند (۱۸، ۱۳).

Aroskar و همکاران نشان دادند سویه استرپتوکوک زواید میکوس قادر به رشد و تولید هیالورونیک‌اسید در pH اسیدی ۵/۵ نیز است (۱۹). هم‌چنین نتایج مطالعه‌های اثر pH در بازده تولید هیالورونیک‌اسید توسط استرپتوکوک زواید میکوس و یا سویه استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس نشان داد که اثر pH به لحاظ آماری به‌طور مشخصی معنی‌دار بوده و در سویه‌های مورد مطالعه کاهش pH موجب کاهش بازده هیالورونیک‌اسید می‌شود (۲۰، ۷).

تاکنون اطلاعاتی در مورد مقدار بهینه pH در سویه‌های استرپتوکوکی گروه G گزارش نشده است و مطالعه کنونی برای اولین بار نشان داد که در pH اسیدی ۴/۸ سویه GGS-88 به‌طور مؤثر و معنی‌داری $p < 0.05$ دارای بازده قابل توجه هیالورونیک‌اسید است. به‌نظر می‌رسد مهم‌ترین عامل تولید هیالورونیک‌اسید در pH اسیدی وجود فعالیت آنزیمی هیالورونیک‌اسید سنتاز است و تفاوت pH بهینه فعالیت این آنزیم به‌احتمال وابسته به ساختار و توالی‌های آمینو اسیدی آن است که شناسایی ساختارهای آنزیمی در مهندسی سویه‌های استرپتوکوکی بسیار مؤثر خواهد بود.

سویه GGS-132 دیگر سویه متعلق به GGS رفتار و خصوصیتی مشابه سویه‌های گروه C را نشان داد و pH بهینه برای این سویه نزدیک به نقطه خنثی و مشابه گزارش‌های قبلی است (۱۳، ۱۸). رشد و تولید در pH اسیدی می‌تواند به‌عنوان مزیت قابل توجهی برای سویه GGS-88 در نظر گرفته شود چرا که در محیط‌های کشت استرپتوکوکی هم‌زمان با رشد و تکثیر که لازمه افزایش تعداد باکتری‌های تولیدکننده است،

سپاسگزاری

منابع مالی تحقیق از محل طرح پژوهشی به شماره ۷۸۱ مصوب شورای پژوهشی انستیتو پاستور ایران تامین شده است.

تأمین کننده انرژی یا بیوسنتز قندهای مونومری پیش‌ساز اولیه بتا-۴و۱ گلوکورونیک‌اسید و بتا ۳و۱-ان- استیل گلوکزآمین است. در واقع در صورت عدم محدودیت گلوکز حداکثر رشد و تکثیر باکتری رخ خواهد داد. در حالی که بالاترین بازده هیالورونیک‌اسید و وزن مولکولی مطلوب در شرایط رشد کم‌تر از حد بهینه، به‌دست خواهد آمد زمانی که باکتری‌ها به آهستگی در حال رشد هستند و منابع انرژی و کربن برای سایر فرآیندها در دسترس است (۳).

بررسی انجام شده در مورد تدثیر غلظت گلوکز بر میزان تولید هیالورونیک‌اسید در سویه استرپتوکوک پیوژنز در دامنه غلظتی ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان داد که بیش‌ترین مقدار هیالورونیک‌اسید (۹۰/۰۷ میکروگرم در میلی-لیتر) در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمده است این یافته نشان داد که رابطه میزان غلظت گلوکز بر بازده هیالورونیک‌اسید دارای محدودیت است و همواره افزایشی نخواهد بود (۱۴).

در مطالعه کنونی با غربالگری اولیه و شناسایی سویه‌های تولیدکننده مؤثر و سپس بررسی دو عامل اصلی و تأثیرگذار در تولید هیالورونیک‌اسید در مقیاس آزمایشگاهی مقادیر ۱-۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (جدول ۴) در سویه‌های منتخب به‌دست آمد. از طرفی باید به این نکته توجه شود که در تولید هیالورونیک‌اسید به‌جز pH و غلظت گلوکز سایر عوامل محیطی مانند سرعت هم‌زدن و حجم هوادهی، دما و افزودن عوامل محرک مسیرهای بیوسنتز هیالورونیک‌اسید و هم‌چنین مراحل پایین دستی شامل جداسازی و تخلیص نقش مهم و تأثیرگذاری در میزان بازده نهایی دارند که در ادامه این مطالعه با نقش هر یک از این عوامل به‌تنهایی و یا در مجموع برای هر یک از سویه‌های منتخب مورد بررسی و مطالعه قرار خواهد گرفت.

نتیجه‌گیری

در تولید هیالورونیک‌اسید بر اساس فرمنتاسیون، اولین مرحله انتخاب سویه‌های مؤثر و سپس بهینه‌سازی عوامل تأثیرگذار در فرآیند تولید است. با بررسی عوامل گلوکز و pH محیط در سویه‌های استرپتوکوک‌ی گروه C و برای اولین بار G مشخص شد که بازده تا ۲/۷۳ برابر قابل افزایش است. هم‌چنین شناسایی سویه تولیدکننده در pH اسیدی مزیتی جهت تولید صنعتی هیالورونیک‌اسید در شرایط غیرمعمول است. بنابراین سویه شناسایی شده در شرایط معین بهینه رشد جهت تولید در مقیاس نیمه صنعتی و صنعتی قابل استفاده است.

1. DeAngelis PL. Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: today and tomorrow. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012;94(2):295-305.
2. Schiraldi C, La Gatta A, De Rosa M. *Biotechnological production and application of hyaluronan*: INTECH Open Access Publisher; 2010.
3. Boeriu CG, Springer J, Kooy FK, van den Broek LA, Eggink G. Production methods for hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2013;2013.
4. Liu L, Liu Y, Li J, Du G, Chen J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microb Cell Fact*. 2011;10(1):1-9.
5. Reddy KJ, Karunakaran K. Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain 3523-7. *Journal of BioScience & Biotechnology*. 2013;2(3).
6. O'Regan M, Martini I, Crescenzi F, De Luca C, Lansing M. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1994;16(6):283-6.
7. Johns MR, Goh L-T, Oeggerli A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biotechnology letters*. 1994;16(5):507-12.
8. Kumari K, Weigel PH. Molecular cloning, expression, and characterization of the authentic hyaluronan synthase from group C *Streptococcus equisimilis*. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(51):32539-46.
9. Keramati M, Roohvand F, Aslani MM, Khatami S, Aghasadeghi M, Sadat M, et al. Screening, Cloning and Expression of Active Streptokinase from an Iranian Isolate of *S. equisimilis* Group C in *E. coli*. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2013;16(4):620.
10. Garrity GM, Bell J, Lilburn T, Bergey's M. *Systematic Bacteriology. The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*, Bergey's Manual Trust, Department of Microbiology and Molecular Genetics. 2004;2.
11. Cavalcanti AD, Melo BA, Oliveira RC, Santana MH. Recovery and Purity of High Molar Mass Bio-hyaluronic Acid Via Precipitation Strategies Modulated by pH and Sodium Chloride. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2018:1-13.
12. Cesaretti M, Luppi E, Maccari F, Volpi N. A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydrate Polymers*. 2003;54(1):59-61.
13. Saranraj P, Sivakumar S, Sivasubramanian J, Geetha M. Production, optimization and spectroscopic studies of hyaluronic acid extracted from *Streptococcus pyogenes*. *Int J Pharm Biol Arch*. 2011;2(3).
14. Al-Saadiaa KA, Naji HF, Al-Saadi AH. Production and optimisation of hyaluronic acid extracted from *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Contemporary Medical Sciences*. 2016;1(4):13-5.
15. Pires AMB, Santana MHA. Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2010;162(6):1751-61.
16. Blank LM, McLaughlin RL, Nielsen LK. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. *Biotechnology and bioengineering*. 2005;90(6):685-93.

17. Huang W-C, Chen S-J, Chen T-L. Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. *Biochemical engineering journal*. 2008;40(3):460-4.
18. Patil KP, Kamalja KK, Chaudhari BL. Optimization of medium components for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 using a statistical approach. *Carbohydrate Polymers*. 2011;86(4):1573-7.
19. Aroskar V, Kamat S, Kamat D. Effect of various physical parameters and statistical medium optimization on production of hyaluronic acid using *S. equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920. *IIOAB Letters*. 2012;2(1).
20. Chen Y-H, Li J, Liu L, Liu H-Z, Wang Q. Optimization of flask culture medium and conditions for hyaluronic acid production by a *streptococcus equisimilis* mutant nc2168. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012;43(4):1553-61.
21. Pires AM, Macedo AC, Eguchi SY, Santana MH. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource technology*. 2010;101(16):6506-9.
22. Chen WY, Marcellin E, Steen JA, Nielsen LK. The role of hyaluronic acid precursor concentrations in molecular weight control in *Streptococcus zooepidemicus*. *Molecular biotechnology*. 2014;56(2):147-56.
23. Krahulec J, Krahulcová J. Increase in hyaluronic acid production by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* strain deficient in β -glucuronidase in laboratory conditions. *Applied microbiology and biotechnology*. 2006;71(4):415-22.