NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.10/39 , 2020

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 Khani[1], Malihe Keramati[2]*, Banafsheh Kazemi[1], Zahra Amini Tehrani[2], Fereshteh Shahcheraghi [3]

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.1.8]

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۰ - شماره -۳۹ تابستان ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

تولید هیالورونیک‌اسید توسط سویه‌های *Streptococcus equisimilis* گروه‌های 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، انستیتوپاستور ایران، تهران

چکیده

سابقه و هدف: هیالورونیک‌اسید بیوپلی‌مری طبیعی و خطی است که به‌دلیل خصوصیت ویسکوالاستیک، ظرفیت بالای جذب آب و زیست‌سازگاری کاربردهای وسیعی در پزشکی، داروسازی و صنایع آرایشی دارد. امروزه تولید صنعتی آن از طریق فرمنتاسیون سویه‌های استرپتوکوکی است. تحقیق کنونی گزارشی از غربالگری و بهینه‌سازی شرایط تولید هیالورونیک‌اسید توسط سویه‌های استرپتوکوکی بالینی گرو ه‌های C و G جدا شده از بیماران ایرانی است.

مواد و روش‌ها: یازده سویه استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس (*S.equisimilis*) شامل نه سویه گروه C و دو سویه گروه G شناسایی و تولید اولیه هیالورونیک‌اسید به‌روش کمپلسومتری با کاربازول تعیین شد و بر اساس نتایج سه سویه با بیش‌ترین تولید جهت بهینه‌سازی انتخاب شدند. جهت تعیین pH بهینه، دوازده نقطه در دامنه ۳/۱-۷/۵ و غلظت گلوکز در یازده نقطه در دامنه ۰/۳تا ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و در pH بهینه ارزیابی و بازده هیالورونیک‌اسید توسط سویه‌های منتخب تعیین شد.

یافته‌ها: میانگین غلظت هیالورونیک‌اسید تولید شده در یازده سویه بالینی بین۲۱۶/۶ تا ۷۲۹/۷میکروگرم در میلی‌لیتر متغییر بود. سه سویه با بیش‌ترین تولید شامل سویه‌های GCS-08، GGS-88وGGS-132 و میانگین غلظت هیالورونیک‌اسید به‌ترتیب ۵۷۳/۰، ۵۷۹/۷ و ۷۲۹/۷میکروگرم در میلی‌لیتر جهت مطالعه‌های بهینه‌سازی انتخاب شدند. pH بهینه و مقدار هیالورونیک‌اسید برای هر سویه به‌ترتیب (pH ۶/۵ و ۷۴۴/۳) GCS-08، (pH ۴/۸ و ۵۹۸/۹) GGS-88 و (pH ۶/۸ و ۱۰۴۱/۸) GGS-132 بود. کشت در محیط حاوی گلوکز با غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث افزایش تولید هیالورونیک‌اسید توسط سویه‌ها به‌ترتیب GCS-08: ۱۰۹۶/۶، GGS-88:۱۲۳۴/۳ و ۶/ GGS-13:۱۹۹۳ میکروگرم در میلی‌لیتر شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دهنده اثر معنی‌دار pH و رابطه مستقیم غلظت گلوکز بر بازده هیالورونیک‌اسید است که می‌تواند باعث افزایش تولید تا ۲/۷۳برابر شود. شناسایی سویه تولید کننده در pH اسیدی ۴/۸ مزیتی برای تولید صنعتی هیالورونیک‌اسید در شرایط غیر معمول است.

واژه‌های کلیدی: هیالورونیک‌اسید، *S.equisimilis*، فرمنتاسیون، بهینه‌سازی، گلوکز، pH

مقدمه

هیالورونیک‌اسید بیوپلی‌مر خطی طبیعی مشتمل بر تکرار واحدهای دی ساکاریدی بتا-۱و۴ گلوکورونیک‌اسید و بتا ۱و۳ ان- استیل گلوکزامین با وزن مولکولی متنوع از ۵۰۰۰ دالتون تا ۲۰ میلیون دالتون است (۱). به‌دلیل 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.1.8]

ظرفیت جذب آب فوق‌العاده بالا، غیرایمونوژن و زیست‌سازگاری کاربرد بیولوژیک، داروسازی و مهندسی بافت، ترمیم زخم، جراحی چشم و مفاصل و جراحی‌های زیبایی پیدا کرده است (۲). روش‌های اولیه تولید صنعتی آن استخراج از چشم گاو و تاج خروس است که به‌دلیل کیفیت متغییر و پتانسیل آلودگی با ویروس‌ها امروزه با روش‌های تخلیص از باکتری‌های تولیدکننده کپسول هیالورونیک‌اسید از جمله استرپتوکوک‌ها جایگزین شده است (۳). مهم‌ترین سویه‌های گسترده‌ای در پیشگیری و درمان بیماری‌ها، تحقیقات پزشکی و به‌کار 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 هیالورونیک‌اسید در استرپتوکوک‌ها با مکانیسم یکسان و با پلی‌مریزاسیون پیش‌سازهای مونوساکاریدی توسط آنزیم هیالورونیک‌اسید سنتاز انجام می‌شود (۴). استفاده از سویه‌های میکروبی به‌دلیل امکان کنترل شرایط رشد، کنترل روش‌های فرمنتاسیون، استخراج و خالص‌سازی منجر به بهبود فرآیند و بازده تولید و کیفیت فرآورده شده است. در فرآیندهای فرمنتاسیون مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار در بازده فرآیند انتخاب سویه مناسب، بهینه‌سازی شرایط کشت و تولید و استفاده از روش‌های بهینه خالص‌سازی است. مطالعه‌ها نشان می‌دهد که بهینه‌سازی شرایط کشت از قبیل دما، pH، میزان هوادهی، سرعت هم‌زدن، میزان اکسیژن حل شده، میزان استرس ناشی از pH و نوع راکتور زیستی به‌طور قابل توجهی تولید هیالورونیک‌اسید را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۵). بیوسنتز هیالورونیک‌اسید فرآیند چند مرحله‌ای است. که با رشد سلول و ساخت دیواره باکتریایی در پیش‌سازهایی از قبیل گلوکز ۱- فسفات، UDP- گلوکز و UDP-N- استیل گلوکز آمین مشترک است و رقابت بین بیوسنتز هیالورونیک‌اسید و رشد سلول برای مصرف این پیش‌سازها وجود دارد، بنابراین کنترل منابع کربنی و شرایط رشد در کاهش میزان تشکیل توده سلولی و افزایش میزان هیالورونیک‌اسید مؤثر است (۶). در بررسی منابع کربنی، گلوکز مؤثرترین ماده شناسایی شده است با این حال افزایش غلظت آن گاهی تأثیر چندانی در تولید هیالورونیک‌اسید نداشته و افزایش به نفع رشد و افزایش توده سلولی است. میزان اسیدیته محیط تولید به‌طور قابل توجهی در بازده تولید مؤثر است کاهش pH از حد بهینه آن منجر به کاهش رشد باکتری و در نتیجه کاهش تولید هیالورونیک‌اسید می‌شود (۷).

سرعت تولید هیالورونیک‌اسید وابسته‌به سرعت واکنش‌های مسیر بیوسنتز هیالورونیک‌اسید در سویه های استرپتوکوکی است. مقایسه بیوسنتز هیالورونیک نشان داده است که سرعت واکنش های آنزیمی هیالورونیک‌اسید سنتاز در سویه‌های استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس ۲-۲/۴ برابر بیش‌تر از سویه‌های استرپتوکوک پیوژنز و استرپتوکوک زواپیدمیکوس است (۸). هم‌چنین این سویه‌ها پروتئین‌های ترشحی کم‌تری نسبت‌به استرپتوکوک پیوژنز دارند که این موضوع موجب کاهش پیچیدگی فرآیندهای تخلیص و در نتیجه افزایش کیفیت و بازده تخلیص بیوپلی‌مر خواهد شد (۴). در مطالعه کنونی ابتدا با غربالگری سویه‌های استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس گروه‌های C(GCS) و G(GGS) جدا شده از بیماران ایرانی مقدار هیالورونیک‌اسید تولید شده در هر یک از سویه‌ها تعیین شد و سپس بررسی شرایط بهینه برای سویه‌های منتخب و تأثیر pH و گلوکز به‌عنوان دو عامل بسیار مهم در بازده هیالورونیک‌اسید مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم‌به ذکر است هیچ گزارش قبلی در مورد تعیین مقدار و بررسی تولید هیالورونیک‌اسید در استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس گروه G وجود ندارد. به‌طور مسلم شناسایی سویه‌های تولید کننده مؤثر و کم خطر و تعیین شرایط حداقلی جهت حداکثر تولید موجب کاهش هزینه‌های تولید هیالورونیک‌اسید در مقیاس صنعتی خواهد شد.

مواد و روش‌ها:

مشخصات سویه‌ها، شرایط رشد و نگهداری:

سویه‌های مورد استفاده در این تحقیق، سویه‌های 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 سویه‌ها به‌صورت لیوفیلیزه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده اند. با این حال مجدد پس از کشت و رشد در محیط کشت (ایبرسکو، ایران,Brain Heart Infusion (BHI آزمون‌های بررسی هاله لیز در محیط کشت بلاد آگار و آزمون‌های بیوشیمیایی با استفاده از قندهای لاکتوز، سوربیتول، تره هالوز و ریبوز انجام شد (۱۰).

غربالگری اولیه و تعیین مقدار هیالورونیک‌اسید در سویه‌های گروه GGS, GCS

غربالگری اولیه سویه‌ها بر اساس مورفولوژی و مشاهده کلنی‌های موکوئیدی ناشی از تولید کپسول هیالورونیک‌اسید و نیز بر اساس قطر هاله همولیز پس از رشد در محیط کشت بلاد آگار انجام گرفت. سپس جهت تعیین مقدار کمی هیالورونیک‌اسید،

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.1.8]

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 سویه‌ها به‌نسبت ۱۰٪ V/V در دانسیته نوری ۰/۵ پس از سانتریفیوژ و شستشو با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات به محیط تولید شامل اجزا ذکر شده در جدول ۱ در pH حدود ۷/۰، تلقیح شد. رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۶ ساعت برای کلیه سویه‌ها انجام شد.

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

مواد	غلظت(mg/ml)
$Na_2HPO_4.12H2O$	۱/۵
KH_2PO_4	۰/۵
$Mg_2SO_4.7H2O$	۰/۵
Yeast Extract	۱۰
Glucose	۵

استخراج هیالورونیک‌اسید

جهت آزاد شدن کپسول هیالورونیک‌اسید، 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 به‌مدت ۵ دقیقه توده سلولی جداسازی شد. به‌منظور حذف پروتئین‌های موجود در سوپرناتانت محلول تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰۰٪ با نسبت ۱:۴ اضافه و انکوباسیون شبانه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از حذف پروتئین با رسوب‌دهی، جهت جداسازی هیالورونیک‌اسید چهار برابر حجم محلول باقی مانده، اتانول مطلق اضافه شد با سانتریفیوژ ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه رسوب هیالورونات‌سدیم جمع‌آوری شده و در نهایت رسوب در ۲۰۰ میکرولیتر آب حل شد(۱۱)

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

به‌منظور تعیین غلظت هیالورونیک‌اسید استخراج شده، از گلوکورونیک‌اسید با غلظت‌های متغییر۵۰-۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۴۰۰ و ۳۰۰،۲۰۰،۱۵۰،۱۰۰،۵۰) به‌میزان ۵۰ میکرولیتر و ۵۰ میکرولیتر از نمونه استخراج شده و رقیق شده با آب با نسبت‌های ۱:۳۲ و ۱:۱۶ به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه-ای اضافه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم بورات حل شده در سولفوریک‌اسید با غلظت ۲۵ میلی‌مولار به نمونه‌ها و استانداردها اضافه شده و سپس در ۸۰ درجه سانتی‌گراد به-مدت۲۰ 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 سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه دیگر انکوبه شد. پس از سرد شدن به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، جذب نوری در ۵۵۰ نانومتر قرائت شده و پس از رسم منحنی استاندارد، غلظت بیوپلی‌مر تعیین شد. کلیه غلظت‌های مربوطبه منحنی استاندارد و نمونه‌ها در تکرارهای سه‌تایی انجام شد و میزان انحراف از استاندارد، انحراف نسبی و ضریب هم‌بستگی 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 گلوکورونیک‌اسید مانند هیالورونیک‌اسید در حد یک میکروگرم در میلی‌لیتر است (۱۲).

بررسی اثرهای pH و میزان گلوکز در بازده هیالورونیک-اسید

پس از تعیین مقدار کمی تولید هیالورونیک‌اسید در هر یک از سویه‌ها، 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 میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد با این تفاوت که pH با افزودن اسید فسفریک و یا هیدروکسیدسدیم در ۱۲ نقطه تعیین شده مطابق جدول ۲ تنظیم شد. تولید، استخراج و تعیین مقدار هیالورونیک‌اسید برای هر یک از سویه‌های منتخب همانند روشی که توضیح داده شد انجام شد پس از تعیین شرایط بهینه pH برای هر یک از سویه‌ها محیط تولید شامل مقادیر مختلف گلوکز مطابق جدول ۲ تهیه و مجدد تعیین مقدار هیالورونیک‌اسید برای سه سویه GGS-132 GGS-88, GCS-08 انجام شد.

جدول ۲- دامنه pH و غلظت- های مختلف گلوکز

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

آنالیز آماری

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

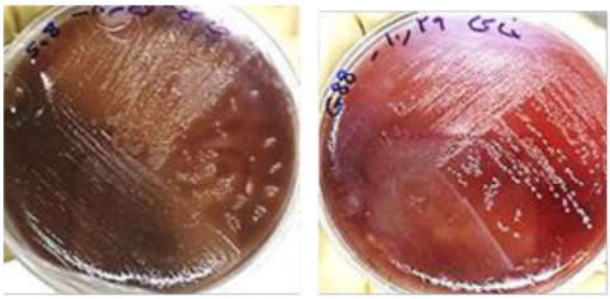
[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.1.8]

جهت مقایسه بازده هیالورونیک‌اسید در سویه‌های منتخب GCS-08، GGS-88 و GGS-132 و نیز تعیین اثرهای عوامل pH و غلظت گلوگز 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

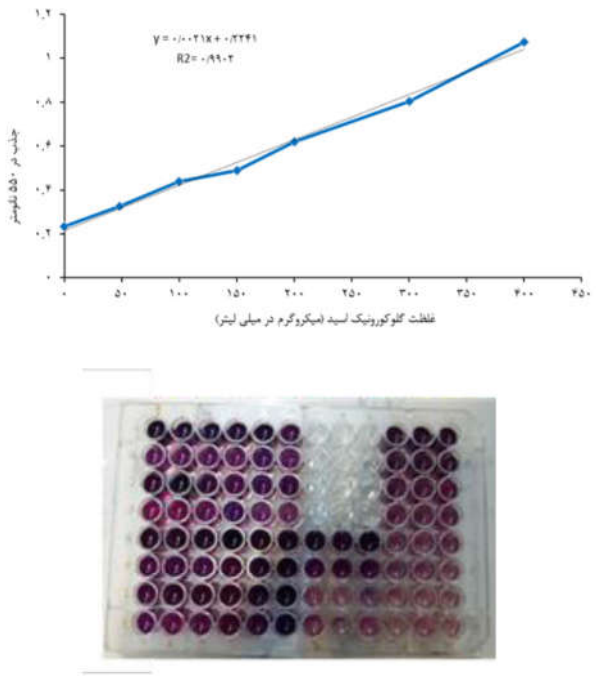
شناسایی سویه‌های استرپتوکوک اکوئیسیمیلیس و تعیین اولیه مقدار هیالورونیک‌اسید

مورفولوژی و هاله لیز و تخمیر قندها یازده سویه استرپتوکوکی شامل نه سویه متعلق‌به گروه C و دو سویه متعلق‌به 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 GCS-08, GGS-88 در محیط کشت بلاد آگار که همولیز گاما و تشکیل کلونی‌ها بزرگ خاکستری رنگ و موکوئیدی GGS-88و همولیز بتا و کلنی‌های سفید رنگ GCS-08 قابل مشاهده است.

پس از تأیید کلیه سویه‌ها، تعیین مقدار هیالورنیک‌اسید کشت‌های باکتریایی در تکرارهای سه‌تایی برای هر سویه و براساس منحنی استاندارد انجام شد. منحنی استاندارد (شکل۲) با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکورونیک‌اسید در برابر جذب نوری و ضریب هم‌بستگی ۰/۹۹۰۲ نشان‌دهنده ارتباط خطی بین مقدار گلوکورونیک‌اسید و جذب نوری است. در روش سنجش مقدار هیالورونیک‌اسید با کاربازول افزودن اسیدسولفوریک در دمای بالا موجب تجزیه هیالورونیک‌اسید به مونومرهای تشکیل‌دهنده آن یعنی گلوکورونیک‌اسید و ان‌استیل‌گالاکتوز آمین و تبدیل گلوکورونیک‌اسید به یورونیک‌اسید می‌شود که با کاربازول کمپلکس پایدار بنفش رنگ پایداری را تشکیل خواهد داد (شکل ۲).



شکل ۲- شکل بالا: منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف گلوکورونیک‌اسید 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 هیالورنیک 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 متعلق‌به گروه G: GGS-88, GGS-132 به‌ترتیب ۷/۸±۵۷۹/۲ و ۶/۶±۷۲۹/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر است که نسبت‌به سویه‌های گروه C مقدار بیش‌تری است بنابراین هر دو سویه جهت بررسی‌های بیش‌تر انتخاب شدند. از بین سویه‌های گروه C سویهGCS-08 با مقدار تولیدی۰/۷±۵۷۳/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان سویه منتخب در این گروه شناسایی شد که در جدول ۳ پررنگ تر از سایر سویه‌ها مشخص شده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

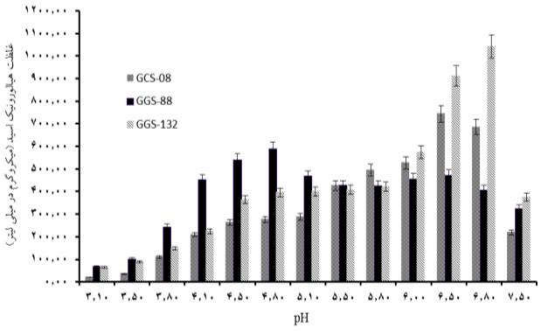
[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.1.8]

نام سویه	غلظت هیالورونیک‌اسید *	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 هیالورونیک‌اسید تولید شده توسط سویه‌های بالینی
*غلظت‌های محاسبه شده میانگین سه بار تکرار است.

اثرهای pH در میزان بازده هیالورونیک‌اسید

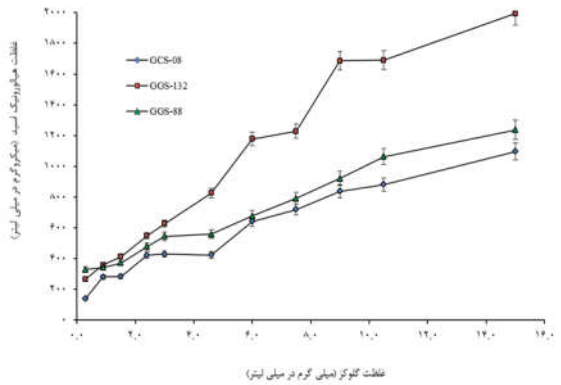
جهت بررسی اثر pH، غلظت گلوکز در محیط تولید به‌مقدار ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ثابت در نظر گرفته شد (جدول ۱) و pH محیط در دامنه ۳/۱-۷/۵ در دوازده نقطه مطابق با جدول ۲ تهیه و پس از تولید و استخراج و تخلیص تعیین مقدار هیالورونیک‌اسید (شکل۳) انجام شد. همان‌طورکه شکل۳ و جدول ۴ نشان می‌دهد حداکثر بازده هیالورونیک‌اسید در سویه GCS-08 در pH ۶/۵ (۷۴۴/۸±۳/۳میکروگرم در میلی‌لیتر)، GGS-132 در pH ۶/۸ (۱۰۴۱/۹±۸/۱میکروگرم در میلی-لیتر) و GGS-88 در pH به‌نسبت اسیدی ۴/۸(۵۹۸/۹±۵/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر) بوده است.



شکل ۳- تأثیرpH بر بازده هیالورونیک‌اسید در سویه‌های GGS-88،GGS-132و GCS-08

تأثیر غلظت گلوکز در بازده هیالورونیک‌اسید در pH بهینه

در مطالعه حاضر، pH بهینه برای هر یک از سویه‌های GGS-132، GCS-08وGGS-88 متفاوت است، اما در مقابل، غلظت گلوکز اثر مستقیم بر بازده تولید هیالورونیک‌اسید داشته است (شکل ۴).



شکل ۴- غلظت هیالورونیک‌اسید در سویه‌های GGS-88، GGS-132 و GCS-08 در برابر غلظت‌های متفاوت گلوکز

همان‌طورکه در شکل۴ و جدول ۴ آمده است مقدار هیالورونیک‌اسید تولید شده GCS-08 و GGS-88 و GGS-132 در مقدار ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گلوکز توسط هر یک از آن‌ها به‌ترتیب ۱۰۹۶/۴±۴/۳ و ۱۲۳۴/۳±۶/۹ و ۱۹۹۳/۵±۶/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که نسبت‌به مقدار اولیه به‌ترتیب ۱/۹۱و ۲/۱۳ و ۲/۷۳ برابر افزایش را نشان داد.

جدول ۴- میزان اولیه و پس از بهینه‌سازی pH و گلوکز هیالورونیک‌اسید در سویه‌های 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	۱۲۳۴/۶±۳/۹
GGS-132	۷۲۹/۶±۶/۶	۶/۸	۱۰۴۱/۹±۸/۱	۱۹۹۳/۵±۶/۶

*غلظت‌های محاسبه شده میانگین سه بار تکرار است.

بحث

هیالورونیک‌اسید در استرپتوکوک‌ها متابولیت ثانویه محسوب می‌شود و تولید آن به فاکتورهای مختلفی از جمله عوامل ژنتیکی و محیط رشد و مواد مغذی به‌طور کامل وابسته است (۱۳). بنابراین اولین مرحله در فرآیندهای تولید هیالورونیک-اسید، انتخاب سویه مناسب جهت تولید است. در مطالعه حاضر با غربالگری سویه‌های استرپتوکوکی گروه‌های C و G سویه-های مؤثر در تولید بیوپلی‌مر هیالورونیک‌اسید شناسایی شدند و نشان داده شد که گلوکز و pH به‌عنوان دو عامل مؤثر بر میزان تولید هیالورونیک‌اسید در سویه‌های استرپتوکوکی نقش دارند. در این مطالعه مشخص شد که سویه استرپتوکوکی متعلق‌به گروه G تنها با بهینه‌سازی شرایط محیط کشت قادر به تولید ۱۹۹۳/۵±۶/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر هیالورونیک‌اسید است

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.1.8]

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 متعلق‌به 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 زواپیدمیکوس گروه C بیش‌ترین بازده تولید در pH دامنه ۶/۵-۷/۵ دارند (۱۸،۱۳).

Aroskar و همکاران نشان دادند سویه استرپتوکوک زواپیدمیکوس 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 زواپیدمیکوس 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 (۷،۲۰).

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 به طور مؤثر و معنی‌داری $p < ۰/۰۵$ 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 وابسته‌به ساختار و توالی‌های آمینو اسیدی آن است که شناسایی ساختارهای آنزیمی در مهندسی سویه‌های استرپتوکوکی بسیار مؤثر خواهد بود.

سویه GGS-132 دیگر سویه متعلق‌به 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، 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 می شود 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 این‌حال 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 به-عنوان 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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.1.8]

تأمین کننده انرژی یا بیوسنتز قندهای مونومری پیش‌ساز اولیه بتا-۱و۴ گلوکورونیک‌اسید و بتا ۱و۳ ان- استیل گلوکزامین است. در واقع در صورت عدم محدودیت گلوکز حداکثر رشد و تکثیر باکتری رخ خواهد داد. در حالی‌که بالاترین بازده هیالورونیک‌اسید و وزن مولکولی مطلوب در شرایط رشد کم‌تر از حد بهینه، به‌دست خواهد آمد زمانی‌که 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 ۲۰،۴۰،۶۰،۸۰ 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 به‌جزء 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 هیالورنیک‌اسید 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.

سپاسگزاری

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.1.8]

منابع

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 byStreptococcus 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.1.8]

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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1399.10.39.1.8]