بهینه‌سازی تولید هیالورونیک اسید توسط *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* ATCC 43079 با روش سطح پاسخ

فاطمه تابنده[*1]، محدثه صمدی[2]، مهوش خدابنده[3]، سعید امین زاده[4]

1- دانشیار، گروه مهندسی زیست فرایند، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

2- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی زیست فرایند، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

3- دانشیار، گروه مهندسی زیست فرایند، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

4- دانشیار، گروه مهندسی زیست فرایند، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

[*]نویسنده مسئول: taban-f@nigeh.ac.ir

دریافت: 1398/7/1 پذیرش: 1400/3/5

چکیده:

هیالورونیک اسید (HA) پلیمر طبیعی و خطی است که به‌علت توانایی بالا در حفظ رطوبت و ویسکوالاستیسیتی و همچنین غیرایمنی‌زایی و غیرسمی بودن، کاربردهای بسیاری در زمینه های پزشکی، آرایشیـ بهداشتی و غذایی دارد. HA در مقیاس صنعتی توسط گونه‌های استرپتوکوکی تولید شده است. استرپتوکوک‌ها از انواع باکتری‌های لاکتیکی با نیازهای غذایی پیچیده هستند و توانایی ساخت برخی از اسید آمینه‌ها را ندارند. بنابراین، پژوهش بر روی انتخاب محیط کشت صنعتی برای رشد آنها ضروری است. در این مطالعه، تولید هیالورونیک اسید و آنزیم هیالورونیداز در سویه *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* ATCC 43079 در سه محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به تأثیر این آنزیم بر کاهش مقدار هیالورونیک اسید، از ماده 6- پالمیتوییل آسکوربیک اسید برای مهار این آنزیم در طی فرایند تخمیر استفاده شد. طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ (RSM) انجام شد و تأثیر متغیرهای غلظت گلوکز، عصاره مخمر و pH هر کدام در 3 سه سطح بر تولید هیالورونیک اسید بررسی شد. نتایج نشان داد بیشینه تولید هیالورونیک اسید در این باکتری در حضور مقادیر 21/2 گرم بر لیتر گلوکز،

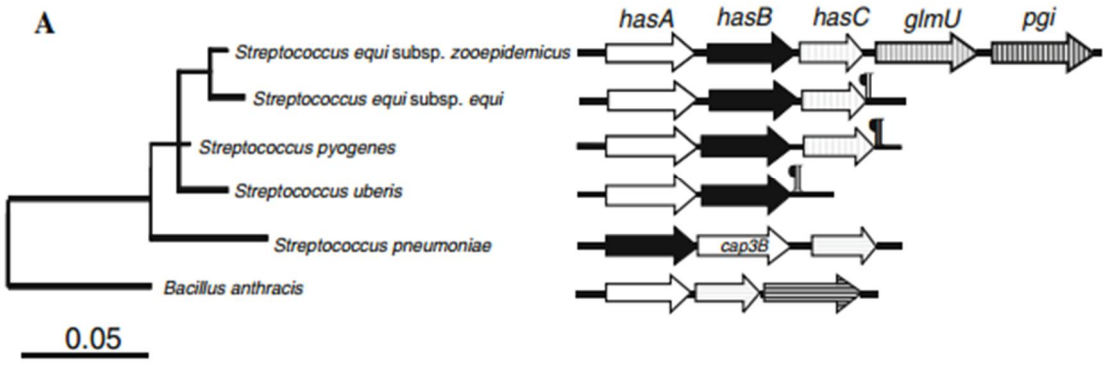
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.3.3]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

$$n\,UDP-GlcUA+n\,UDP-GlcNAc \longrightarrow 2n\,UDP+[GlcUA+GlcNAc]_n$$

ساخت HA در باکتری ها توسط اپرون *has* انجام می‌شود که آنزیم‌های پیش‌ساز هیالورونیک اسید را کد می‌کند. اپرون *has* در *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* شامل ژن‌های *hasA*، *hasB*، *hasC*، *glmU* و *pgi* است[8, 9].



شکل 1- اپرون *has* در *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* و برخی گونه‌های دیگر

با شناخت ژن های درگیر در بیوسنتز هیالورونیک اسید، تحقیقات متعددی برای توسعه سویه‌های جدید دست ورزی شده برای تولید بالای آن انجام شده است[10]. رشد سلول و ساخت HA از نظر مصرف کربن و انرژی با یکدیگر رقابت می‌کنند و این مورد یکی از عوامل محدودکننده در بیوسنتز هیالورونیک اسید می باشد[11]. تحقیقات زیادی در مورد بهبود شرایط کشت و استراتژی‌های مختلف بیوراکتور به‌منظور افزایش غلظت و وزن مولکولی HA انجام گرفته است. به این منظور مطالعات گسترده‌ای بر روی عواملی چون pH، منبع کربن، منبع نیتروژن، غلظت نمک‌ها، دور همزن، هوادهی و اثر آمینواسیدهای ضروری صورت گرفته است [12-14].

در این مطالعه، ابتدا کشت سویه *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* ATCC 43079 در محیط‌های کشت مختلف انجام شد تا پروفایل تولید هیالورونیک اسید و آنزیم هیالورونیداز بررسی شود. سپس بهینه‌سازی تولید HA در فرمانتور با روش طراحی آماری سطح پاسخ برای دستیابی به مقادیر بالاتر هیالورونان انجام شد.

مواد و روش‌ها

سویه باکتری: *استرپتوکوکوس اکویی زیرگونه زواپیدمیکوس* ATCC 43079 از مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی به‌صورت لیوفیلیزه خریداری شد. فعال‌سازی سلول ها در محیط BHI انجام شد. پس از رشد سویه و سانتریفیوژ کشت، رسوب باکتری به محلول حاوی گلیسرول 30% استریل و محیط کشت BHI با نسبت 1:1 افزوده شد و در فریزر 70- نگهداری شد.

محیط کشت: باکتری *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* در فلاسک‌های در حال چرخش دارای 3 نوع محیط کشت مختلف کشت داده شد. ترکیبات تشکیل دهنده محیط های کشت در جدول 1 آمده است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.3.3]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

کشت باکتری در فرمانتور: به‌منظور کنترل pH و همچنین بررسی چگونگی رشد باکتری و تولید هیالورونیک اسید، آزمایش های بهینه‌سازی در فرمانتور BIOFLO-3000 (New Brunswick, USA) با حجم کاری 1 لیتر انجام شد. اکسیژن محلول 15%، هوادهی 0/5 vvm و دور همزن 500 rpm در سامانه کشت ناپیوسته در نظر گرفته شد.

سنجش هیالورونیک اسید: یکی از روش‌های رایج به منظور اندازه‌گیری اورونیک‌اسیدها روش کربازول است. در این روش گلیکوزآمینوگلیکان‌ها توسط روش‌های رنگ‌سنجی کروماتوگرافی به صورت کمّی سنجش می‌شوند[17]. با استفاده از این روش، ابتدا دو محلول A و B طبق دستورالعمل ساخته شدند و پس از تهیه نمونه‌ها در پلیت 96 خانه، کدورت نمونه‌ها به‌صورت خودکار توسط دستگاه خوانش الایزا اندازه‌گیری شد. از نمونه HA استاندارد (سیگما، وزن مولکولی 1/2 میلیون دالتون) برای تهیه منحنی کالیبراسیون استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم هیالورونیداز به روش Rapid-plate و ژل الکتروفورز: محلول 2mg/ml هیالورونیک اسید استاندارد و 5% BSA تهیه و با فیلتر 0/22 میکرون به‌صورت جداگانه فیلتر شدند. سپس محلول‌های فیلتر شده به محیط کشت BHI آگار دردمای 46 °C افزوده و به پلیت استریل منتقل شدند. پس از ژله‌ای شدن پلیت ها در دمای 4 °C، 20 میکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری در مرکز پلیت چکانده شد و به آرامی به انکوباتور 37 °C انتقال پیدا کرد. پس از حدود 48 ساعت، پلیت بیرون آورده شد و سطح آن با اسیداستیک 0/2 مولار پوشانیده شد. پس از خشک شدن سطح پلیت، میزان شفافیت در اطراف قطره چکانده شده بررسی و در زیر استریوسکوپ مشاهده شد. علاوه‌بر روش Rapid plate، حضور آنزیم هیالورونیداز بر روی ژل 13% SDS-PAGE نیز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

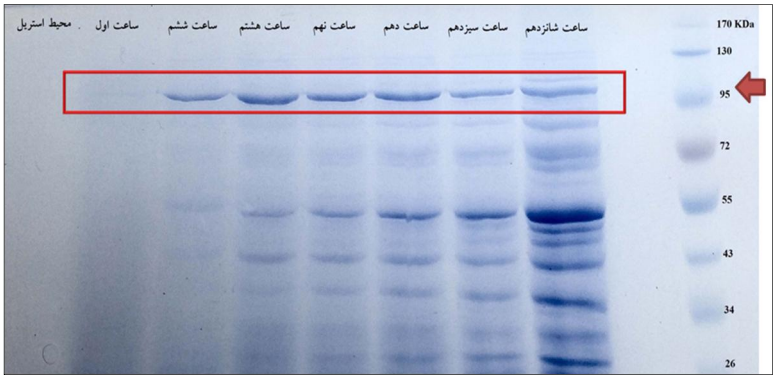
با وجود مطالعاتی که بر روی انواع سویه های *استرپتوکوکوس‌زواپیدمیکوس* خصوصا ATCC 39920 انجام گرفته است[18]، به نظر می‌رسد سویه‌های مختلف این باکتری ظرفیت‌های متفاوتی در تولید HA داشته باشند[19]. به این منظور تحقیق بر روی سویه‌هایی از *استرپتوکوکوس‌زواپیدمیکوس* که تحقیقاتی بر روی آن انجام نشده است، ضرورت پیدا می‌کند. در این تحقیق، شرایط تولید HA در سویه ATCC 43079 بررسی شد.

مقایسه تولید HA در محیط های کشت مختلف: بیشینه تراکم نوری (OD) **مربوط به** رشد باکتری در محیط کشت 1 برابر با 0/399 و در محیط های کشت 2 و 3 به ترتیب برابر 1/9 و 1/2 به دست آمد. در شکل 1 تولید HA در این سه محیط کشت مشاهده می‌شود. بیشینه تولید HA در محیط کشت 2 به دست آمد. با این حال، BHI یک محیط کشت آزمایشگاهی گران قیمت به شمار می‌رود و استفاده از آن برای تولید یک محصول صنعتی به صرفه و منطقی نیست. بنابراین از محیط کشت 3 به دلیل مقدار نسبتاً مناسب رشد باکتری و تولید HA برای ادامه آزمایش‌ها استفاده شد. بررسی پروفایل تولید HA نشان داد که مقدار هیالورونیک اسید تا حدود ساعت دهم افزایش پیدا می‌کند و پس از آن شدت تولید و مقدار آن رو به کاهش می‌گذارد. مشاهده این رخداد، احتمال وجود آنزیم‌های تخریب‌کننده HA را تقویت کرد. به این منظور سنجش آنزیم هیالورونیداز در محیط کشت انجام شد. هیدرولیز هیالورونیک اسید توسط هیالورونیداز، ویسکوزیته را کاهش می‌دهد. این احتمال وجود دارد که باکتری برای افزایش سرعت حرکت در

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-07]

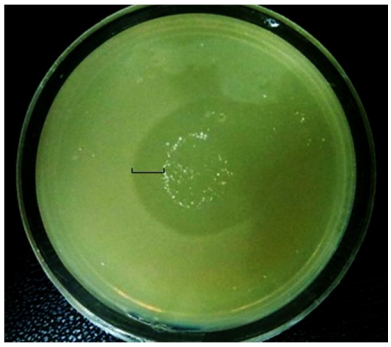
[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.3.3]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ



شکل3- نمونه محلول رویی حاصل از ساعات مختلف کشت *استرپتوکوکوس‌زواپیدمیکوس* ATCC 43079 باند احتمالی مربوط به هیالورونیداز بر روی ژل SDS-PAGE با پیکان نشان داده شده است.

به‌علت فعالیت آنزیم هیالورونیداز در این باکتری لازم است در زمانی که باکتری بیشینه تولید HA را دارد، استخراج آن انجام شود. این در حالی است که در صورت عدم انتخاب زمان مناسب به‌منظور استخراج، در مدت چند ساعت کیفیت هیالورونیک اسید که به‌علت فعالیت آنزیم هیالورونیداز شکسته شده، به شدت کاهش می‌یابد و قطعات کوچک پلی‌ساکاریدی طی مراحل شستشو از دست می‌رود. چنانچه در مطالعه‌ای که در سال 2013 انجام گرفت، مقدار بیشینه تولید اسیدهیالورونیک در باکتری *استرپتوکوکوس‌زواپیدمیکوس* ATCC 43079 تنها 42/38 میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده بود[21]. به همین دلیل در این تحقیق، پالمیتوییل آسکوربیک اسید به محیط کشت افزوده شد تا فعالیت آنزیم هیالورونیداز را مهار کند.



شکل 4- فعالیت آنزیم هیالورونیداز *استرپتوکوکوس‌زواپیدمیکوس* باعث ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها شده است.

طراحی آزمایش به روش RSM و تحلیل آماری داده‌ها: با روش طرح ترکیب مرکزی، 16 آزمایش برای بررسی سه عامل هر کدام در دو سطح شامل 8 آزمایش کامل دو سطحی، 6 آزمایش نقاط محوری و دو آزمایش نقطه مرکزی طراحی شد (جدول 3). انتخاب این متغیرها بر اساس درجه اهمیت و آنچه در مطالعات پیشین عنوان شده بود انجام شد[18-20]. شایان ذکر است در تمام محیط های کشت طراحی شده، از مهار کننده شیمیایی آنزیم هیالورونیداز استفاده شد. مقدار بیشینه HA تولید شده به‌عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد و مقدار بهره‌دهی تولید هم محاسبه شد. آزمایش‌ها با دو تکرار انجام شدند. تحلیل واریانس پاسخ (مقدار تولید HA) در جدول 4 ارائه شده است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.3.3]

جدول3- طراحی آزمایش سطح پاسخ با روش ترکیب مرکزی و نتایج مشاهده شده

شماره آزمایش	گلوکز ($g\ L^{-1}$)	عصاره مخمر ($g\ L^{-1}$)	pH	هیالورونیک اسید ($mg\ L^{-1}$)	بهره دهی ($mg\ L^{-1}\ h^{-1}$)	میزان رشد (OD)
1	20	20	6/50	155/2	18/37	3/2
2	40	20	6/50	201/8	17/45	1/3
3	20	40	6/50	325/3	29/17	2/7
4	40	40	6/50	97/0	6/46	3/5
5	20	20	7/50	281/0	22/84	4/1
6	40	20	7/50	288/7	18/87	5/5
7	20	40	7/50	175/3	14/61	6/8
8	40	40	7/50	200/6	12/54	5/1
9	13/18	30	7/00	220/9	18/41	6/6
10	46/82	30	7/00	75/3	4/71	2/7
11	30	13/18	7/00	190/4	23/81	3/0
12	30	46/82	7/00	330/0	54/22	3/0
13	30	30	6/16	50/4	5/91	0/8
14	30	30	7/84	113/7	10/34	4/3
15	30	30	7/00	284/5	28/45	3/7
16	30	30	7/00	300/2	28/84	3/7

جدول 4- تحلیل واریانس نتایج تولید هیالورونیک اسید در مدل رگرسیون ساده شده پس از حذف برخی جملات مدل که معنی‌دار نبودند.

عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F-value	p-value
مدل	113900	7	16271/14	12/66	0/0017
گلوکز**(A)**	28138/64	1	28134/61	21/90	0/0023
عصاره مخمر**(B)**	9113/00	1	9113/00	7/09	0/0323
(C) pH	18931/17	1	18931/17	14/73	0/0064
AC	23462/88	1	23462/88	18/26	0/0037
BC	27913/47	1	27913/47	21/72	0/0023
A^2	20337/67	1	20337/67	15/86	0/0053
C^2	48906/89	1	48906/89	38/06	0/0005
Residual	8994/36	7	1284/91	-	-
عدم برازش	8874/70	6	1479/12	12/36	0/2144

تولید اسیدهیالورونیک بر اساس مقادیر کد شده به شکل زیر مدل شد:

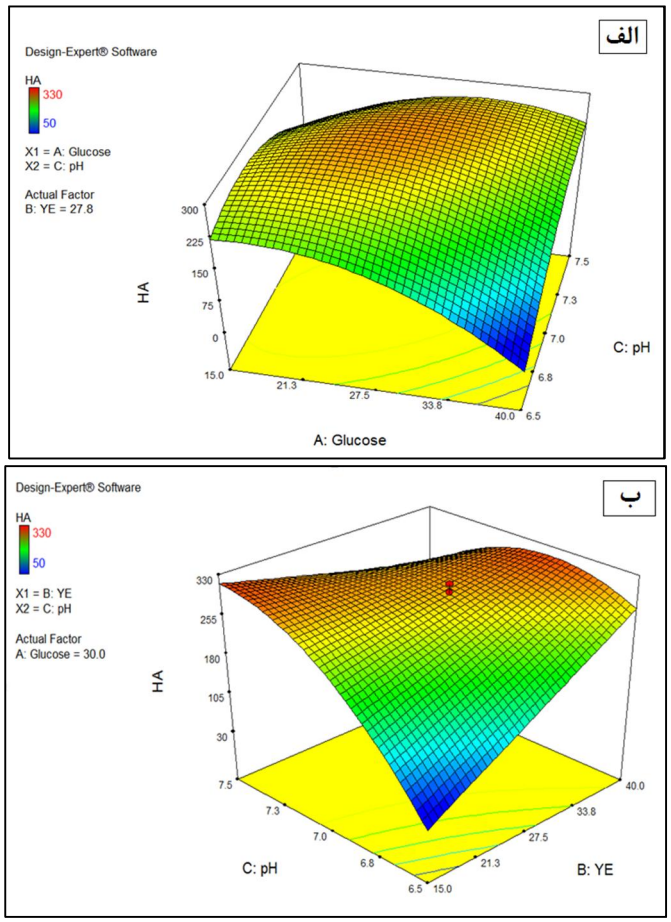
$$HA= 281.43- 48.85\ A+27.80\ B+40.07\ C+61.03\ AC-66.57\ BC-42.69\ A^2-66.13\ C^2$$

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.3.3]

علاوه بر فاکتورهای اصلی و برخی برهمکنش های آنها که در جملات AC و BC آمده است، جملات درجه دوم A^2 و B^2 نیز در معادله رگرسیون که از نوع درجه دوم است نیز مشاهده می‌شود. در این حالت معنی‌داری مدل و معنی‌دار نبودن عدم برازش (Lack of fit)، نشان‌دهنده آن است که مدل پیشنهادی برای رگرسیون فضای نمونه‌ای مناسب است. مدل ارائه شده دارای ضریب تبیین **(R^2)** برابر با **0/96 بوده** که انطباق داده‌های تجربی را با مدل حاصل از رگرسیون با دقت بالا نشان می دهد.

همان‌طور که مشاهده می‌شود اثرات متقابل AC و BC بر پاسخ معنی‌دار هستند. شکل 5-الف نشان می‌دهد در غلظت 27/8 گرم بر لیتر از عصاره مخمر، در غلظت حدود 25 گرم بر لیتر گلوکز و حدود pH خنثی، مقدار تولید هیالورونیک اسید افزایش می‌یابد. در غلظت 30 گرم بر لیتر گلوکز، دو ناحیه مطلوب برای تولید HA دیده می‌شود (شکل 5-ب) که شامل شرایط pH حدود 7/4 و غلظت عصاره مخمر حدود 20 گرم بر لیتر و همچنین کاهش pH تا حدود 6/8 و بیشینه مقدار عصاره مخمر می باشد.



شکل 5- نمایش سه‌بعدی اثر pH و گلوکز (الف) و pH و عصاره مخمر (ب) بر تولید هیالورونیک اسید

نرم افزار، شرایط بهینه برای تولید هیالورونیک اسید به میزان 426 میلی گرم بر لیتر را در شرایط pH 6/6، غلظت گلوکز 21/2 و غلظت عصاره مخمر 43/6 گرم بر لیتر پیش‌بینی کرد. آزمون تأیید انجام شد و مقدار 370±15 میلی‌گرم بر لیتر HA با بهره‌دهی 56/74 گرم بر لیتر ساعت به‌دست آمد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.3.3]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــــــ

Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 71(7), 3747-3752.

9. Saranraj, P. and Naidu M. A. (2013) Hyaluronic Acid Production and its Applications - A Review, *Int. J. Pharmaceutical Biol. Archive*, 4(5), 853-859.

10. Gallo, N., Nasser, H., Salvatore, L., Natali, M., L., Campa, L., Mahmoud, M., Capobianco, L., Sannino, A., and M. Madaghiele (2019) Hyaluronic acid for advanced therapies: Promises and challenges, *Eur. Polymer J.* 117, 134-147.

11. Gao, H.-J., Du, G.-C. and Chen, J. (2006) Analysis of metabolic fluxes for hyaluronic acid (HA) production by *Streptococcus zooepidemicus*, *World J. Microbiol. Biotech.*, 22(4), 399-408.

12. Lee, G.-Y., Ha, S.-J., Jung, J.-H., Seo, D.-H., Park, J.-Y., Kim, S.-R., Park, N.-W., Kweon, D.-K., Park, S-.H. and Park, C.-S. (2009) Effect of non-animal-derived nitrogen sources on the production of hyaluronic acid by *Streptococcus sp.* KL0188, *J.Korean Society Appl. Biol. Chem.* 52(3), 283-289.

13. Pan, N. C., Vignoli, J. A., Baldo, C., Pereira, H. C. B., Silva, R. S. d. S. F. and Celligoi, M. A .P. C. (2015) Effect of fermentation conditions on the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, *Acta Scientiarum. Biol. Sci.* 37(4), 411-417.

14. Armstrong, D., Cooney, M. and Johns, M. (1997) Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47(3), 309-312.

15. Zhang, J., Hao, N. andChen, G.-Q. (2006) Effect of expressing polyhydroxybutyrate synthesis genes (phbCAB) in *Streptococcus zooepidemicus* on production of lactic acid and hyaluronic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71(2), 222-227.

16. Botzki, A., Rigden, D. J., Braun, S., Nukui, M., Salmen, S., Hoechstetter, J., Bernhardt, G., Dove, S., Jedrzejas, M. J. and Buschauer, A. (2004) l-Ascorbic Acid 6-Hexadecanoate, a Potent Hyaluronidase Inhibitor X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes. *J. Biol. Chem.* 279(44), 45990-45997.

17. Song, J.-M., Im, J.-H., Kang, J.-H. and Kang, D.-J. (2009) A simple method for hyaluronic acid quantification in culture broth, *Carbohydrate polymers*, 78(3), 633-634.

18. Aroskar, V., Kamat, S. and Kamat, D. (2012) Effect of various nutritional supplements on hyaluronic acid production, *IIOAB Letters*, 2, 16-24.

19. Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G. and Chen, J. (2011) Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspective, *Microb. Cell Fact*, 10(1), 1-9.

20. Shih, W.-Y., Lai, H.-H., Chen, N.-Y., Shih, L., Huang, Y.-C., Lin, T.-S. and Wu, J.-Y. (2013) Effect of Environmental factors on production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*, *Int. J. Sci. Eng.* 3(4), 5-21.

21. Khue, N. T. H., VO, P. T. M. (2013) Study of complex nutrients, temperature and salts on hyaluronic acid production in *Streptococcus zooepidermicus* ATCC 43079. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 3, 12-15.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.3.3]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Optimization of hyaluronic acid by Streptococcus zooepidemicus ATCC 43070 by response surface methodology

Tabandeh F.*[1], Samadi M.[2], Khodabandeh M.[3], Aminzadeh S.[4]

1- Associate Professor, Bioprocess Group, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, 14965/161, Tehran, Iran, taban_f@nigeb.ac.ir

2- M.Sc Student, Bioprocess Group, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Bioprocess Group, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Bioprocess Group, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

*corresponding author: taban-f@nigeh.ac.ir

Received: 2019/9/23 Accepted: 2021/5/26

Abstract:
Hyaluronic acid (HA) is a natural and linear polymer that finds a wide-range of applications in medicine, cosmetics, and nutraceuticals because of excellent viscoelasticity, high moisture retention capacity, high biocompatibility and non-toxicity. HA has been recently produced in industrial scale by Streptococcal species. Streptococci are nutritionally fastidious lactic acid bacteria and cannot synthesize some amino acids. Therefore, it is necessary to study and select some commercial culture media for their growth. In this study, HA production and hyaluronidase activity of *S. zooepidemicus* ATCC 43079 in three culture media were investigated. Regarding the detrimental effect of this enzyme on HA amount, 6-O-Palmitoyl-L-ascorbic acid as hyaluronidase inhibitor was added to culture medium during fermentation. The effect of three variables consisted of glucose concentration, yeast extract concentration and medium pH each at 3 levels were considered and (response surface methodology (RSM) was used for statistical design of experiments to study the HA production by this strain. The results showed that maximum HA production was obtained when glucose concentration, yeast extract concentration and pH were 21.2 g L^{-1}, 43.6 g L^{-1} and 6.6, respectively. Under optimum conditions, HA was produced as 370±15 mg L^{-1} which was ~150% more than of HA concentration in basal medium (150±10 mg L^{-1}) and productivity reached 56.74 g L^{-1} h^{-1} that was increased 2 fold compared to central point.

Keywords: Batch culture; Hyaluronic acid; Hyaluronidase; Optimization; Response surface methodology (RSM)

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-11-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.3.3.3]