

بهینه سازی تولید هیالورونیک اسید توسط استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس ATCC 43079 با روش سطح پاسخ

فاطمه تابنده^{1*}، محدثه صمدی²، مهوش خدابخنده³، سعید امین زاده⁴

- 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

پذیرش: 1400/3/5

دریافت: 1398/7/1

چکیده:

هیالورونیک اسید (HA) پلیمر طبیعی و خطی است که به علت توانایی بالا در حفظ رطوبت و ویسکوالاستیسیته و همچنین غیرایمنی زایی و غیرسمی بودن، کاربردهای بسیاری در زمینه های پزشکی، آرایشی-بهداشتی و غذایی دارد. HA در مقیاس صنعتی توسط گونه های استرپتوکوک تولید شده است. استرپتوکوک ها از انواع باکتری های لاکتیکی با نیازهای غذایی پیچیده هستند و توانایی ساخت برخی از اسید آمینه ها 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- پالمیتویل 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،

43/6 گرم بر لیتر عصاره مخمر و pH 6/6 به دست می آید. در شرایط بهینه، مقدار تولید HA به 15 ± 370 میلی گرم بر لیتر رسید که نسبت به محیط پایه (10 ± 150 میلی گرم بر لیتر)، حدود 150 درصد افزایش نشان داد و مقدار بهره دهی تولید به 56/74 گرم بر لیتر ساعت رسید که دو برابر بهره دهی در نقطه مرکزی بود.

کلید واژگان: کشت ناپیوسته، هیالورونیک اسید، هیالورونیداز، بهینه سازی، روش سطح پاسخ

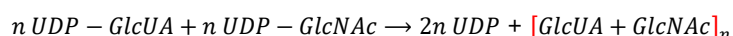
مقدمه

اگزوپلی ساکاریدها، پلیمرهای قندی خارج سلولی هستند که به وسیله میکروارگانیسم ها تولید و به محیط پیرامون ترشح می شوند. استفاده از اگزوپلی ساکاریدهای میکروبی در حوزه پزشکی، در اواسط قرن بیستم و با کاربرد بالینی محلول دکستران به عنوان منبسط کننده پلاسما، گسترش پیدا کرد. دکستران، زانتان، آلژینات، ژلان و هیالورونیک اسید همگی از انواع اگزوپلی ساکاریدها هستند. به رغم ساختار منومری بیشتر اگزوپلی ساکاریدها، این دسته از ترکیبات زیستی دارای تنوع ساختمانی بالا و خواص منحصر به فردی می باشند^[1]. تعداد اندکی از باکتری ها در ساختار کپسول خود واجد هیالورونیک اسید (HA) یا هیالورونان هستند. هیالورونان به طور طبیعی در ساختار کپسول تعدادی از باکتری های بیماری زا از جمله پاستورلا مالتوسید¹ و گروه A و C استرپتوکوک ها یافت می شود^[2]. ساختار HA در همه گونه های جانوری و باکتریایی و بافت ها یکسان است و سامانه ایمنی را تحریک نمی کند^[3]. میکروارگانیسم های تولیدکننده هیالورونیک اسید، از آن به منظور کپسوله کردن خود و فرار از سامانه دفاعی میزبان و همچنین تجهیز خود به منظور اتصال و تکثیر استفاده می کنند. بنابراین سامانه دفاعی میزبان تلاشی برای از بین بردن

این نوع باکتری های بیماری زا نخواهد کرد^[2]. تنها برخی سویه های استرپتوکوک، HA را در مرحله خاصی از چرخه زندگی شان به عنوان متابولیت ثانویه (در شرایط هوازی یا بی هوازی) تولید می کنند^[4, 5]. اولین گزارش در مورد میزان تولید هیالورونیک اسید توسط باکتری استرپتوکوک همولیتیک گروه A، 60 تا 140 میلی گرم در هر لیتر بود^[6]. باید توجه داشت که گروهی از این میکروارگانیسم ها قادر به تولید هیالورونیداز (HAase) نیز هستند. روش های بهبود سویه از جمله جهش زایی شیمیایی با ان- متیل - ان- نیترو- ان- نیتروزوگوانیدین استفاده شده اند و کلنی های بدون فعالیت بتاهمولیتیکی و هیالورونیدازی و با تولید بیشتر هیالورونان ساخته شده است^[7]. در سال 1993 ژن های کدکننده آنزیم هیالورونان سنتاز از استرپتوکوکوس پایورنز² جداسازی شد. پس از آن هیالورونان سنتازهایی از میکروارگانیسم های دیگر شناسایی و تعیین ویژگی شدند^[2]. مسیر کلی ساخت HA از فرمول زیر تبعیت می کند^[2]:

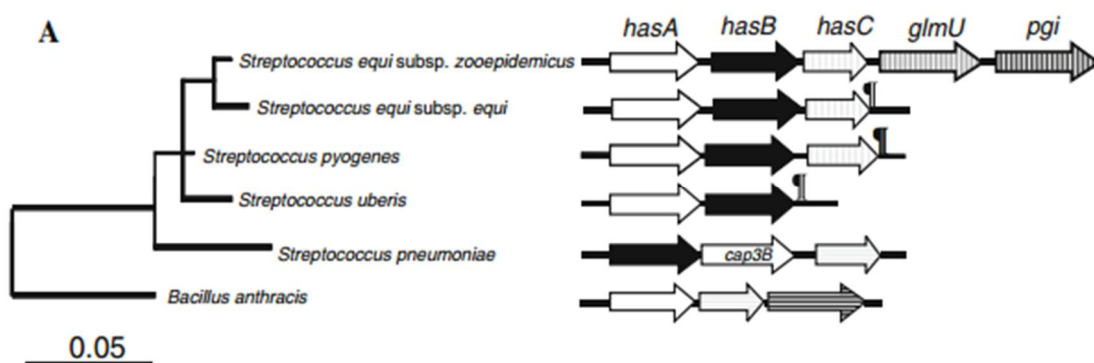
1. *Pasteurella multocida*

2. *Streptococcus pyogenes*



شامل ژن‌های *hasA*, *hasB*, *hasC*, *glmU* و *pgi* است [8, 9].

ساخت HA در باکتری‌ها توسط اپرون *has* انجام می‌شود که آنزیم‌های پیش‌ساز هیالورونیک اسید را کد می‌کند. اپرون *has* در استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس



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

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 به صورت لیوفیلیزه خریداری شد. فعال‌سازی سلول‌ها در محیط BHI انجام شد. پس از رشد سویه و سانتیفیوژ 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 محیط‌های کشت در جدول 1 آمده است.

با شناخت ژن‌های درگیر در بیوسنتز هیالورونیک اسید، تحقیقات متعددی برای توسعه سویه‌های جدید دست‌ورزی 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 می‌باشد [11]. تحقیقات زیادی در مورد بهبود شرایط کشت و استراتژی‌های مختلف بیوراکتور به منظور 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

جدول 1- ترکیبات محیط های کشت برای بررسی رشد، تولید هیالورونیک اسید و آنزیم هیالورونیداز توسط سویه *استرپتوکوکوس*

زوپید میکوس ATCC 43079

مقدار (g L^{-1})	ترکیبات تشکیل دهنده	محیط کشت
50 3 5 1/5 2	نشاسته گلوکز پپتون کازئین MgSO_4 K_2HPO_4	شماره 1 مطابق با رفرنس ^[15]
17/5 10 2 5 2/5	عصاره قلب و مغز گاو آنزیم هضم کننده ژلاتین دکستروز NaCl Na_2HPO_4	شماره 2 (BHI)
30 30 20 0/6 2/5 5	عصاره مخمر گلوکز پپتون کازئین MgCl_2 K_2HPO_4 NaCl	شماره 3

شد (جدول 2). سایر ترکیبات محیط کشت مانند محیط شماره 3 بود و برای مهار فعالیت آنزیم هیالورونیداز، مقدار 54 میلی گرم بر لیتر پالمیتویل آسکوربیک اسید (6-O-Palmitoyl-L-ascorbic acid) به محیط کشت افزوده شد^[16].

طراحی آماری آزمایشها با روش پاسخ سطح: به منظور بهینه سازی محیط کشت باکتری و تولید بیشینه HA در فرمانتور، سه عامل pH، غلظت گلوکز و عصاره مخمر مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمایش $\alpha = 1/14$ در نظر گرفته شد و بر همین اساس سطوح متغیرها مشخص

جدول 2- محدوده متغیرها در بهینه سازی تولید هیالورونیک اسید

سطوح متغیرها					واحد	عامل
$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$		
13/18	20	30	40	46/82	g L^{-1}	غلظت گلوکز
13/18	20	30	40	46/82	g L^{-1}	غلظت عصاره مخمر
6/16	6/5	7	7/5	7/84	-	pH

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 *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* 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 *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* 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 محیط‌های کشت مختلف:

بیشینه تراکم نوری (OD) مربوط به رشد باکتری در محیط کشت 1 برابر با 0/399 و در محیط‌های 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

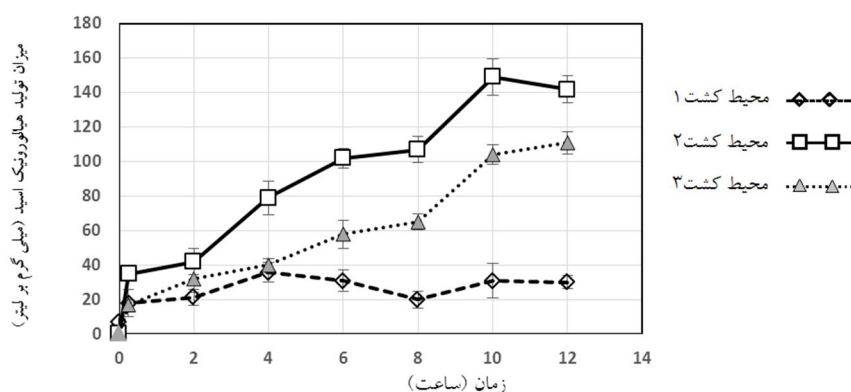
کشت باکتری در فرماتور: به‌منظور کنترل pH و همچنین بررسی چگونگی رشد باکتری و تولید هیالورونیک اسید، آزمایش‌های بهینه‌سازی در فرماتور BIOFLO-3000 (New Brunswick, USA) با حجم کاری 1 لیتر انجام شد. اکسیژن محلول 15%، هوادهی 0/5 vvm و دور همزن 500 rpm در سامانه کشت ناپیوسته در نظر گرفته شد.

سنجش هیالورونیک اسید: یکی از روش‌های رایج به منظور اندازه‌گیری اورونیک‌اسیدها روش کربازول است. در این روش گلیکوزآمینوگلیکان‌ها توسط روش‌های رنگ‌سنجی کروماتوگرافی به صورت کمی 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 الیزا 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 در دمای °C 46 افزوده و به پلیت استریل منتقل شدند. پس از ژله‌ای شدن پلیت‌ها در دمای °C 4، 20 میکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری در مرکز پلیت چکانده شد و به آرامی به انکوباتور °C 37 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،

تولید این آنزیم، استفاده از هیالورونیک اسید در زمان فقر غذایی و به عنوان منبع کربن است^[20].

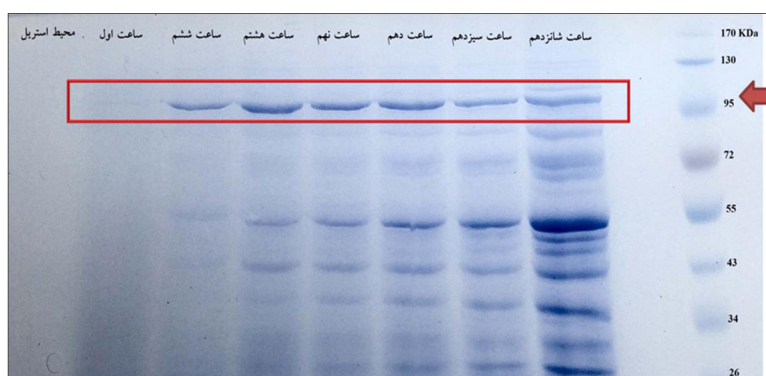
محیط و رسیدن به مواد غذایی، آنزیم هیالورونیداز تولید کند تا کپسول هیالورونیک اسید را که پیشتر ساخته بود، تخریب کند. دلیل دیگر ارائه شده برای



شکل 2- پروفایل تولید هیالورونیک اسید در استریپتوکوکوس زواید میکوس ATCC 43079 در محیط های کشت 1 (◇)، 2 (□) و 3 (▲)

می شود. مشاهده این هاله شفاف در اطراف کلنی ها، وجود آنزیم هیالورونیداز را تأیید کرد (شکل 4).

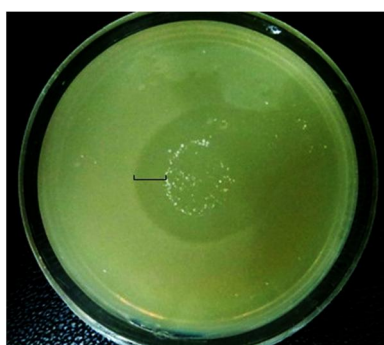
بررسی تولید آنزیم هیالورونیداز: آنزیم
هیالورونیداز موجود در باکتری ها، پروتئینی با 861 اسید آمینه و وزن مولکولی حدود 97205 دالتون است. تا آنجایی که می دانیم تا اکنون فعالیت آنزیم هیالورونیداز در باکتری استریپتوکوکوس زواید میکوس ATCC 43079 همراه با مراحل مختلف رشد باکتری و تولید هیالورونیک اسید در فرایند تخمیر بررسی نشده بود. چنانچه در شکل 3 مشاهده می شود، وجود باند پروتئینی در بازه 97 کیلو دالتون می تواند مربوط به آنزیم هیالورونیداز باشد. حضور آنزیم هیالورونیداز با روش پلیت سریع¹ نیز بررسی شد. اساس این روش، تشکیل کمپلکس بین مولکول های BSA و HA است که محیط کشت را کدر می کند. اگر آنزیم هیالورونیداز در زمان رشد باکتری ها تولید شود، به داخل BHI آگار نفوذ می کند و پس از افزودن استیک اسید، محدوده فعالیت آنزیم هیالورونیداز در اطراف کلنی ها شفاف



شکل 3- نمونه محلول رویی حاصل از ساعات مختلف کشت *استرپتوکوکوس زو/پیدمیکوس* ATCC 43079 باند احتمالی مربوط به هیالورونیداز بر روی ژل SDS-PAGE با پیکان نشان داده شده است.

دست می‌رود. چنانچه در مطالعه‌ای که در سال 2013 انجام گرفت، مقدار بیشینه تولید اسید هیالورونیک در باکتری *استرپتوکوکوس زو/پیدمیکوس* ATCC 43079 تنها 42/38 میلی گرم بر لیتر گزارش شده بود^[21]. به همین دلیل در این تحقیق، پالمیتویل آسکوربیک اسید به محیط کشت افزوده شد تا فعالیت آنزیم هیالورونیداز را مهار کند.

به علت 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 به منظور استخراج، در مدت چند ساعت کیفیت هیالورونیک اسید که به علت فعالیت آنزیم هیالورونیداز شکسته شده، به شدت کاهش می‌یابد و قطعات کوچک پلی ساکاریدی طی مراحل شستشو از



شکل 4- فعالیت آنزیم هیالورونیداز *استرپتوکوکوس زو/پیدمیکوس* باعث ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها شده است.

های کشت طراحی شده، از مهار کننده شیمیایی آنزیم هیالورونیداز استفاده شد. مقدار بیشینه HA تولید شده به عنوان 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.

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

جدول 3- 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 معنی دار نبودند.

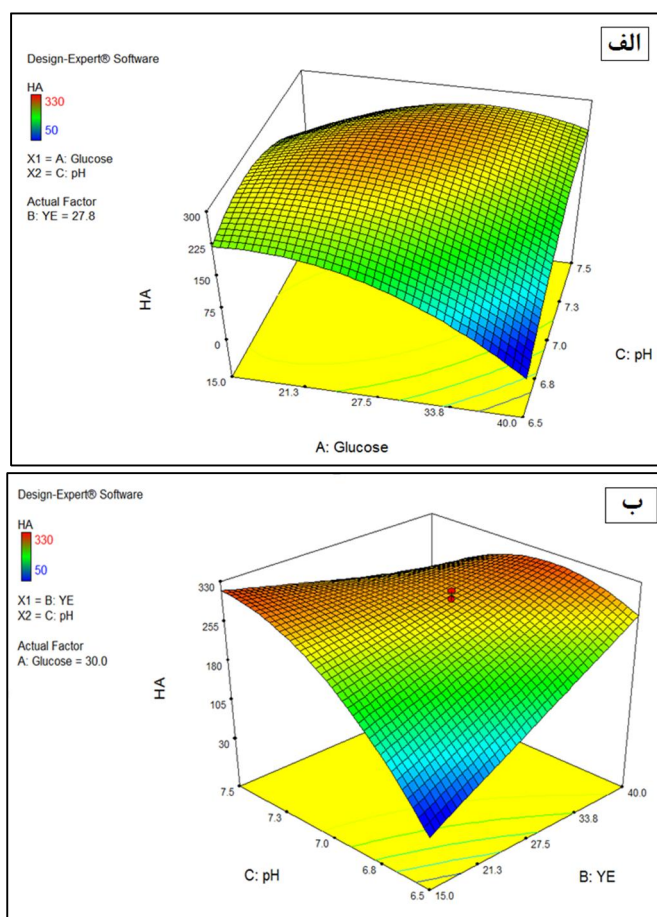
عبارت	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F-value	p-value
مدل	113900	7	16271/14	12/66	0/0017
گلوکز (A)	28138/64	1	28134/61	21/90	0/0023
عصاره مخمر (B)	9113/00	1	9113/00	7/09	0/0323
pH (C)	18931/17	1	18931/17	14/73	0/0064
AC	23462/88	1	23462/88	18/26	0/0037
BC	27913/47	1	27913/47	21/72	0/0023
A ²	20337/67	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 اسید هیالورونیک بر اساس مقادیر کد شده به شکل زیر مدل شد:

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

علاوه بر فاکتورهای اصلی و برخی برهمکنش‌های 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 می‌دهد.

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 می‌باشد.



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.

کتاب، مقاله و غیره استفاده شده است، رعایت کامل امانت انجام شده و مطابق مقررات، به تمامی آنها در فهرست منابع و مأخذ مقاله اشاره شده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

منابع:

1. Moscovici, M. (2015) Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides, *Front Microbiol.* 6, 1012.
2. Boeriu, C. G., Springer, J., Kooy, F. K., van den Broek, L. A. and Eggink, G. (2013) Production methods for hyaluronan, *Int. J. Carbohydrate Chem.* 2013, 1-14.
3. Matarasso, S. L. (2004) Understanding and using hyaluronic acid, *Aesthetic Surgery J.* 24(4), 361-364.
4. Chen, W. Y., Marcellin, E., Hung, J. and Nielsen, L. K. (2009) Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*, *J. Biol. Chem.* 284 (27), 18007-14.
5. Jagannath, S. and Ramachandran, K. (2010) Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*, *Biochem. Eng. J.* 48(2), 148-158.
6. Kendall, F. E., Heidelberger, M. and Dawson, M. H. (1937) A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic streptococcus, *J. Biol. Chem.* 118(1), 61-69.
7. Kim, J.-H., Yoo, S.-J., Oh, D.-K., Kweon, Y.-G., Park, D.-W., Lee, C.-H. and Gil, G.-H. (1996) Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid, *Enzyme Microb. Technol.* 19(6), 440-445.
8. Widner, B., Behr, R., Von Dollen, S., Tang, M., Heu, T., Sloma, A., Sternberg, D., DeAngelis, P. L., Weigel, P. H. and Brown, S. (2005)

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، برای دستیابی به شرایط بهینه از روش آماری سطح پاسخ برای طراحی آزمایش‌های بهینه‌سازی بهره گرفته شد. در این روش، علاوه بر نقاط فاکتوریل، با تکرار آزمایش در نقطه مرکزی و در دست داشتن داده‌های آزمایشی در چند نقطه محوری، از تمام جهات می‌توان ارزیابی صحیحی از فضای نمونه‌ای داشته و براساس داده‌های آزمایشی در این نقاط، به معادله رگرسیون مناسب دست یافته و شرایط بهینه را پیشگویی کرد. نتایج حاصل از این طراحی آزمایش نشان داد با مهار آنزیم هیالورونیداز در زمان کشت سویه /استرپتوکوکوس زو/پیدمیکوس ATCC 43079 و شرایط ثابت نگهداشتن pH و تأمین غلظت مناسب از منابع کربن و نیتروژن در محیط کشت، تولید هیالورونیک اسید حدود 2/5 برابر افزایش پیدا کرد. بنابراین، روش‌های طراحی آماری آزمایش‌ها در صورتی که عوامل مؤثر پاسخی به درستی انتخاب شده باشند و در بازه مناسبی مورد آزمایش قرار گیرند، امکان دستیابی به شرایط بهینه فرایند را فراهم می‌کنند. همچنین در این تحقیق از 6- پالمیتویل آسکوربیک اسید به‌عنوان مهارکننده آنزیم هیالورونیداز استفاده شد که در حضور آن امکان تولید هیالورونیک اسید فراهم شد. استفاده از این ماده شیمیایی، راحت‌تر از دست‌ورزی‌های ژنتیکی است که پیچیده، زمان‌بر و هزینه بر هستند و به‌عنوان راهکاری مناسب برای تولید این محصول در سویه‌های هیالورونیداز مثبت پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی: منابع مالی این تحقیق در قالب طرح پژوهشی شماره 588 توسط پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تأمین شده است و بدین وسیله سپاسگزاری می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: نتایج مندرج در این مقاله از صحت و اصالت علمی برخوردار است و در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران اعم از پایان نامه،

15. Zhang, J., Hao, N. and Chen, 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., Jedrzejewski, 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 zooepidemicus* ATCC 43079. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 3, 12-15.
- 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.

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@nigeb.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)