غربالگری لاکتیک اسید باکتری‌های تولید کننده‌ی اسید هیالورونیک و بهینه‌سازی محیط کشت باکتری منتخب با روش تاگوچی

فاطمه فتوحی چاهوکی[۱و۲]، سعید امین زاده[۱*]، وهب جعفریان[۲]، فاطمه تابنده[۱] و مهوش خدابنده[۱]

[۱] **تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی زیست فرآیند**

[۲] **زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی**

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

چکیده

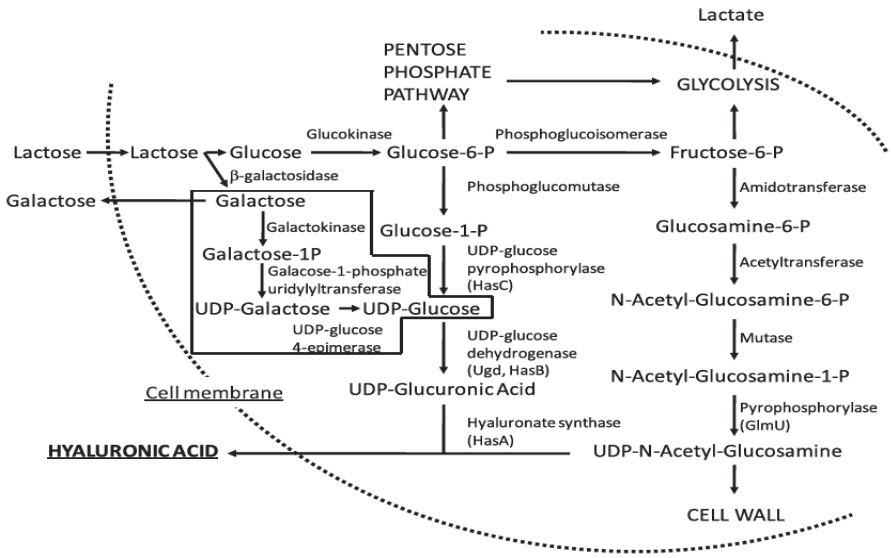
پلی‌ساکارید اسید هیالورونیک(HA)، جزء اصلی ماتریکس خارج سلولی اپیتلیال، عصب و بافت همبند مهره داران و هم چنین کپسول خارج سلولی برخی از میکروارگانیسم‌ها است. این پلی ساکارید به علت ویژگی هایی از قبیل ویسکوزیته‌ی بالا و خاصیت زیست سازگاری، کاربردهای مختلفی در زمینه‌های چشم پزشکی، ارتوپدی، آرایشی و مهندسی بافت دارد. بافت های حیوانی و استرپتوکوک‌ها سهم اصلی را در بدست آوردن اسید هیالورونیک دارند؛ اما به دلیل مشکلاتی از جمله آلودگی با پروتئین و وجود اندوتوکسین توجه ها به سمت باکتری‌های غیر بیماری‌زا برای تولید اسید هیالورونیک جلب شده است. *لاکتوباسیلوس*ها، باکتری‌های پروبیوتیکی هستند که مصارف گوناگونی دارند. تولید ماکرومولکول های زیستی توسط این گروه از باکتری‌ها به دلیل اینکه به عنوان ارگانیسم های ایمن در نظر گرفته می شوند ((Generally Recognized As Safe (GRAS)، در الویت می‌باشد. تولید اسید هیالوونیک برای اولین بار، در این لاکتیک اسید باکتری‌های GRAS شامل *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC۱۶۴۳، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* PTCC۱۶۳۷، *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC۱۶۰۸ و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* PTCC۱۷۳۸ بررسی شد. در مرحله‌ی اول، اسید هیالورونیک بطور روزانه تا ۹۶ ساعت از محیط‌کشت اختصاصی هر سویه جداسازی و توسط رسوب با اتانول بطور نسبی خالص شد. روش کربازول برای سنجش میزان تولید اسید هیالورونیک به کار برده شد. بر طبق نتایج بدست آمده، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* تولید اسید هیالورونیک حدوداً ۰/۴ گرم در لیتر را در ساعت ۹۶ داشت. در مرحله‌ی بعد، افزایش اسید هیالورونیک تولیدی توسط این باکتری با استفاده از بهینه سازی محیط کشت با روش تاگوچی بررسی شد.در این روش، نقاط بهینه‌ی فاکتورهای دما، اوره، لاکتوز و عناصر کمیاب بترتیب در مقادیر ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد، ۵ گرم بر لیتر، ۳۰ گرم بر لیتر و ۱/۵ میلی لیتر بر لیتر مشخص شدند و تولید اسید هیالورونیک به میزان ۱۶۲٪ افزایش یافت.

واژه های کلیدی: اسید هیالورونیک، باکتری‌های GRAS، روش تاگوچی، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*

* نویسنده مسئول، تلفن ۰۲۱-۴۴۷۸۷۴۱۲ پست الکترونیکی: aminzade@nigeb.ac.ir

مقدمه

اسید هیالورونیک (هیالورونان (Hyaluronan)، HA (Hyaluronic acid)) نوعی گلیکوزآمینو گلیکان است که حاوی واحدهای یک در میان D- گلوکورونیک اسید (UDP-GlcUA) و N- استیل‌گلوکزآمین (UDP-GlcNAc) است. وزن مولکولی اسید هیالورونیک، که از بیش از ۵۰ هزار واحد دی‌ساکارید تکراری تشکیل شده است؛ به چندین میلیون دالتون می‌رسد (۶). شکل ۱ مسیر تولید اسید هیالورونیک را نشان می دهد.



شکل ۱- مسیر تولید اسید هیالورونیک(۹)

در انسان‌ها اسید هیالورونیک به فراوانی در بافت‌هایی از قبیل مایع سینوویال، غضروف و غشاء میانی پوست یافت می‌شود که بطور مشخص نقش ساختاری مهمی را بسته به ویژگی‌های هیدرودینامیک و نحوه‌ی ارتباط آن با دیگر اجزای ماتریکس خارج سلولی بازی می‌کند. از طرف دیگر اسید هیالورونیک نقش مهمی در انتقال سیگنال سلول‌ها در طی فرایندهای داینامیک سلولی از قبیل ریخت‌زایی (Morphogenesis)، التهاب، ترمیم زخم دارد و هم‌چنین سرطان، که در آن میانکنش هیالورونان-گیرنده فعال می-شود و در هدایت مسیرهای انتقال سیگنال تقسیم بیشمار سلولی همکاری می‌کند (۱۵). همچنین اسید هیالورونیک در مهندسی بافت پوست برای تولید داربست یکی از موادی است که علاوه بر کلاژن، کیتوسان، ژلاتین، پلی کاپرولاکتون، پلی لاکتیک اسید استفاده شده است (۱)

تولید اسید هیالورونیک از تخمیر باکتریایی از دهه ۶۰ شروع شد، زمانی که فهمیدند اسید هیالورونیک جدا شده از منابع حیوانی دارای پروتئین‌های ناخواسته‌ای هستند که باعث پاسخ های التهابی آلرژیک می‌شوند. چون اسید هیالورونیک تولید شده در حیوانات و باکتری‌ها یکسان است و اسید هیالورونیک باکتریایی ایمونوژنیک نیست؛ بنابراین باکتری یک منبع خوب برای تولید اسید هیالورونیک با مصارف پزشکی است. جداسازی اسید هیالورونیک از محیط کشت مایع تخمیر میکروبی با محصول بالا فرایند نسبتاً ساده‌ای است. یک مزیت مهم و اضافی تولید اسید هیالورونیک میکروبی این است که سلول‌های میکروبی می‌توانند بصورت فیزیولوژیکی و یا متابولیکی برای تولید اسید هیالورونیک بیشتر با وزن مولکولی بالاتر سازگار شوند. بنابراین تولید اسید هیالورونیک میکروبی چه با استفاده از استرپتوکوک پاتوژنیک و چه با استفاده از میزبان‌های نوترکیب امن که حاوی اسید هیالورونیک سنتاز ضروری هستند، امروزه بیشتر ترجیح داده می‌شود. برای جلوگیری از خطر آلودگی با اگزوتوکسین باکتری‌های بیماریزای استرپتوکوک در محصولات هیالورونیک‌اسید، ارگانیسم‌های امنی با مهندسی ژنتیک به وسیله‌ی وارد کردن ژن‌های هیالورونیک سنتاز از سویه‌های *استرپتوکوک* یا *پاستورلا مولتوسیدا*، توانایی تولید اسید هیالورونیک را پیدا می‌کنند. با استفاده از این روش سویه‌های تولید کننده‌ی اسید هیالورونیک شامل *انتروکوکوس فکالیس*، *E.coli*، *باسیلوس سوبتیلیس*،

آگروباکتریوم، *لاکتوباسیلوس لاکتیس* بدست آمده و برای تولید اسید هیالورونیک به کار می‌روند (۴).

پروبیوتیک‌ها یک مکمل خوراکی میکروبی زنده هستند که بدلیل ایجاد تعادل میکروبی و تعادل غذایی در روده انسان مفید می باشند. گونه های باکتریایی که به عنوان پروبیوتیک استفاده می شوند باکتریهای اسید لاکتیک اند که بیشتر از جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتر می باشند (۲). باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) که معمولاً ارگانیسم های ایمن در نظر گرفته می شوند (GRAS) ؛ بطور گسترده‌ای در محصولات غذایی تخمیری مورد استفاده قرار می گیرند و مشخص شده که دارای ویژگی‌های پروبیوتیک هستند. بسیاری از این باکتری‌ها دارای خاصیت تولید اگزوپلی‌ساکاریدها هستند؛ که در بخش‌های سلامت و پزشکی حائز اهمیت می‌باشد و همچنین دارای کاربردهای صنعتی می باشند (۳).

طراحی آزمایشات تاگوچی یکی از روش های مورد استفاده در مبحث طراحی آزمایشات است که اجرای آن در صنایع مختلف با موفقیت های زیادی همراه بوده است. با ترکیب مربعات لاتین ارتوگونال با یک روش ثابت، تاگوچی سری جدیدی از آرایه های ارتوگونال استاندارد را فراهم کرد که برای تعدادی از موقعیت های آزمایشی استفاده می شوند. آرایه های ارتوگونال، فرایند طراحی آزمایشات را سهولت می بخشند. طراحی یک آزمایش شامل انتخاب مناسب ترین آرایه ارتوگونال، تعیین فاکتورها با ستونهای متناسب و نهایتاً توضیح ترکیباتی از آزمایشات مجزا موسوم به شرایط آزمایش می باشد (۱۶).

در این مطالعه ما به دنبال یافتن منبع جدیدی از اسید هیالورونیک هستیم که مشکلات نامبرده را نداشته باشد و همچنین تولید محصول بیشتری داشته باشد. اولین کار پیدا کردن سویه‌ی مناسب است که با توجه به اینکه تولید مقداری اسید هیالورونیک در برخی لاکتوباسیلوس‌ها گزارش شده است؛ سنجش اسید هیالورونیک را روی این باکتری‌ها و همچنین *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* به عنوان یک باکتری GRAS همچون لاکتوباسیلوس‌ها انجام می‌دهیم. در نهایت محیط کشت باکتری منتخب به روش طراحی آزمایش تاگوچی بهینه سازی خواهد شد تا بتوان به حداکثر تولید دست یافت.

مواد و روشها

سویه‌ها: باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ATCC4356، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ATCC7469، *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC39392 و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* ATCC19258 از مرکز کلکسیون میکروبی مرکز ذخایر ژنتیکی ایران بصورت لیوفیلیزه تهیه شد.

مواد و دستگاه: محیط کشت MRS برای کشت سویه‌های *لاکتوباسیل* و محیط Medium 117 برای کشت باکتری *استرپتوکوکوس*(Merck Millipore)، اسید هیالورونیک استاندارد(Sigma-Aldrich)، آگارز، کربازول(Merck Millipore)، دی‌سدیم‌تترابورات، لاکتوز(Merck Millipore)، دستگاه میکروپلیت ریدر(Labsystem multiskan MS).

آنالیز آماری: نرم افزار Minitab 18.0 بمنظور انجام روش تاگوچی و نرم افزار Qualitek-4 برای یافتن سطوح بهینه ی فاکتورها مورد استفاده قرار گرفت.

غربالگری لاکتیک اسید باکتری های منتخب بمنظور انتخاب سویه مورد نظر: ۴ سویه‌ی مورد نظر انتخاب شدند. پس از کشت در روزهای متوالی و جداسازی اسید هیالورونیک از محیط کشت، خالص سازی نسبی با استفاده از رسوب با اتانول انجام شد. سپس تولید اسید هیالورونیک با استفاده از روش کربازول سنجیده شد تا بهترین سویه از نظر تولید HA انتخاب شود.

روش کربازول بمنظور سنجش هیالورونیک اسید: یکی از روش‌های رایج بمنظور اندازه‌گیری اورونیک اسیدها

روش متداول کربازول است که توسط بیتر و موییر در سال ۱۹۶۲ ابداع شد (۱۴). در این روش گلوکزآمینوگلیکان‌ها توسط روش‌های رنگ سنجی بصورت کمّی سنجش می-شود(۱۲).

در این روش از دو محلول A و B استفاده می‌شود. مقادیر این محلول‌ها طبق دستورالعمل بیتر و موییر ساخته شد(۱۴).طرز تهیه‌ی محلول A : ۰/۱۲۵ گرم از کربازول در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول مطلق حل شد. بمنظور حل شدن کامل کربازول در اتانول، بشر به مدت ۳۰ دقیقه بر روی همزن قرار گرفته شد. طرز تهیه‌ی محلول B : ۵۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک خالص در زیر هود شیمیایی به بشر انتقال یافته و سپس ۴/۷۷ گرم دی‌سدیم‌ترابورات به آرامی به آن افزوده شد.

در ابتدا مقدار ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسید هیالورونیک در هر چاهک ریخته شد. حداقل ۳ چاهک به هر نمونه اختصاص داده شد. از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد. سپس پلیت الایزا به مدت ۵ دقیقه در فریزر۲۰- قرار داده شد. سپس در چاهک‌هایی که واجد نمونه بود به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول B (سولفوریک‌اسید- دی‌سدیم‌ترابورات) ۰/۲۵ میلی‌مولار افزوده شد و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. چاهک ها ۲ بار در حال جوش به وسیله سمپلر میکروفیوژ شدند تا امتزاج کامل نمونه ها و محلول B صورت پذیرد. پس از این زمان پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت و سپس به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از محلول A (کربازول+اتانول) افزوده شد. سپس پلیت برای بار دوم به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. در این بازه زمانی محلول درون چاهک ها یک بار دیگر توسط سمپلر مخلوط شدند. سپس پلیت الایزا در مدت ۲۰ دقیقه توسط دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

انتخاب فاکتورهای موثر برای افزایش تولید اسید هیالورونیک با استفاده از طراحی تاگوچی: پس از انتخاب سویه‌ی کاندید (*لاکتوباسیلوس رامنوسوس*) که طبق بررسی اولیه، تولید اسید هیالورونیک بیشتری نسبت به سایر سویه‌های مورد بررسی دارد؛ ۴ فاکتور انتخاب شد که در سه سطح بمنظور رسیدن به تولید بیشینه‌ی اسید هیالورونیک بررسی گردید (جدول۱).

جدول ۱- فاکتورها و سطوح مورد بررسی در طراحی تاگوچی

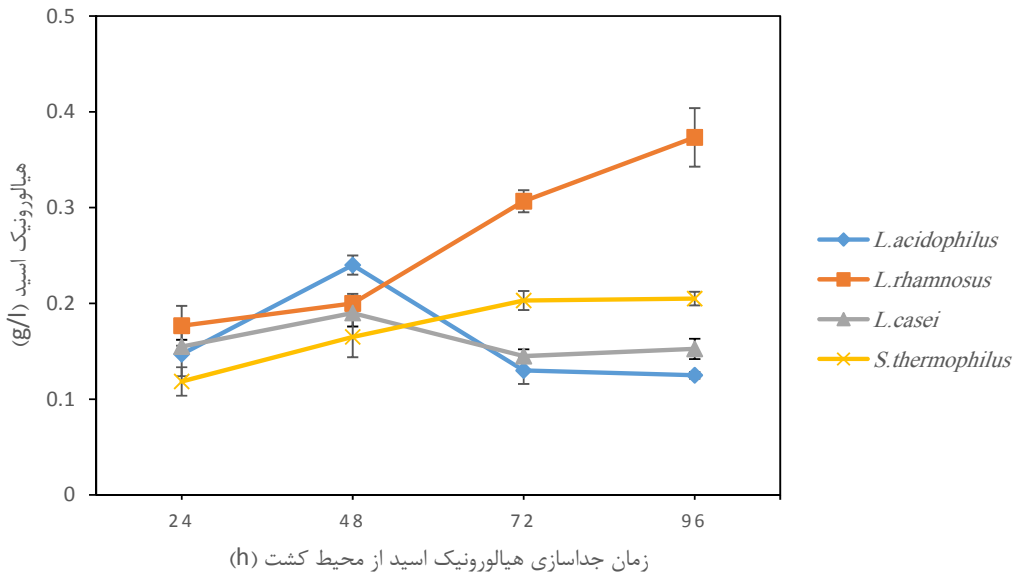
		سطوح مورد بررسی		
فاکتورها	واحد	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
دما	ºC	۳۰	۳۳	۳۷
اوره	g/l	۳	۵	۷
لاکتوز	g/l	۲۰	۲۵	۳۰
عناصر کمیاب*	ml/l	۰/۵	۱	۱/۵

*$MgSO_4$ 250mg/l, $FeSO_4.7H_2O$ 16.4g/l, $CuSO_4$ 200mg/l, $MnSO_4.H_2O$ 100mg/l, $ZnSO_4.7H_2O$ 1g/l, $NiSO_4.6H_2O$ 20mg/l.

نتایج و بحث

مقایسه‌ی تولید اسید هیالورونیک در ۴ سویه‌ی مورد مطالعه: برای انتخاب کاندید اصلی تولید اسید هیالورونیک لازم است تولید این ماده را در ۴ سویه‌ی مورد مطالعه مقایسه کنیم تا بهترین سویه را برای ادامه‌ی کار و افزایش تولید انتخاب کنیم. شکل ۲ تولید اسید هیالورونیک را تا ۹۶ ساعت توسط ۴ سویه برای مقایسه نشان می‌دهد.

طبق نتایج بدست آمده *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در ساعت ۹۶ بیشترین تولید اسید هیالورونیک یعنی ۰/۲±۰/۰۳۷گرم بر لیتر را دارد. همچنین *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نیز در ساعت ۴۸ بیشترین مقدار تولید یعنی حدود ۰/۲۵ گرم بر لیتر اسید هیالورونیک را داشت. *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به عنوان یک باکتریGRAS با تولید بالای اسید هیالورونیک بطور ذاتی و بدون دستکاری ژنتیکی می تواند گزینه‌ی مناسبی برای افزایش تولید باشد.



شکل ۲- مقایسه‌ی میزان تولید اسید هیالورونیک در ۴ سویه‌ی مورد. همانطور که در شکل مشخص است میزان تولید اسید هیالورونیک در باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در روز چهارم و در باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در روز دوم بیشترین مقدار را دارد.

مقایسه تولید اسید هیالورونیک در سویه‌های مورد بررسی با سویه‌های بررسی شده‌ی مشابه: میزان تولید اسید هیالورونیک توسط ۴ سویه‌ی لاکتوباسیلوس مورد بررسی با سویه‌های مشابه مقایسه شد. این مطالعه نشان می‌دهد که سویه‌های مورد بررسی در این تحقیق تولید نسبتاً بالاتری حتی تا دو برابر نسبت به سویه‌های مشابه داشته‌اند.

نقش فاکتورهای انتخاب شده برای افزایش تولید اسید هیالورونیک با استفاده از روش تاگوچی

نقش دما در تولید هیالورونیک اسید: در اکثر مقالات دمای بهینه برای تولید هیالورونیک اسید، دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس گفته شده است. اما با توجه به برخی مطالعات دمای پایین‌تر از دمای بهینه می‌تواند باعث افزایش سوق پیش‌سازها برای ساخت اسید هیالورونیک نسبت به مسیر گلیکولیز شود؛ که این امر باعث افزایش تولید اسید هیالورونیک خواهد شد (۱۰). در مقاله‌ای دیگر به این نکته اشاره شده است که با کاهش دمای بهینه و در واقع کاهش رشد سلولی می‌توان تولید اسید هیالورونیک را افزایش داد؛ بدین علت که در طی رشد سلولی، تولید اسید هیالورونیک کاهش یافته و بیشتر پیش‌سازها به سمت تولید پپتید و گلیکان می روند (۱۱).

نقش منبع نیتروژن در تولید هیالورونیک اسید: از آنجایی که *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جزء باکتری‌های سخت رشد است و این باکتری‌ها برای رشد نیاز به منبع قوی نیتروژن دارند؛ این منبع طبق مقالات مختلف منبع مهمی برای رشد باکتری و تولید اسید هیالورونیک به شمار می‌آید. در مطالعات دیگر منابع مختلفی برای تامین نیتروژن استفاده شده است. اما چند منبع مهم استفاده شده شامل: عصاره مخمر، گلوتامین، اوره و آمونیوم سولفات است که جزء موثرترین منابع نیتروژن برای افزایش تولید اسید هیالورونیک به شمار می‌روند (۱۰, ۷).

نقش لاکتوز در تولید هیالورونیک اسید: در موارد مختلف به این نکته اشاره شده که افزایش گلوکز اولیه باعث افزایش در تیتر تولید اسید هیالورونیک می‌شود (۱۰, ۱۳). چرا که گلوکز جزء پیش سازهای اولیه‌ی تولید اسید

هیالورونیک می‌باشد. از طرف دیگر لاکتوز هم دی ساکاریدی است که می تواند با تبدیل به گلوکز و گالاکتوز، تولید اسید هیالورونیک را افزایش دهد. گالاکتوز هم از مسیر دیگری می تواند به UDP-گلوکز تبدیل شود و در نتیجه در افزایش تولید اسید هیالورونیک موثر باشد (۹).

نقش عناصر کمیاب در تولید هیالورونیک اسید: در مطالعات مختلف به نقش Mg^{2+} به عنوان کوفاکتور آنزیم هیالورونان سنتاز اشاره شده است. در بررسی که در سال ۲۰۱۴ بر روی *لاکتوباسیلوس*ها با استفاده از داکینگ مولکولی انجام شد؛ به نقش Cu^{2+} و Fe^{2+} اشاره شده است (۵). طبق این مقاله، حضور یون Cu^{2+} باعث بهبود تمایل اتصال UDP-گلوکز دهیدروژناز(HasB) به UDP-گلوکز و حضور یون Fe^{2+} باعث بهبود تمایل اتصال UDP-پیروفسفوریلاز(HasC) به گلوکز ۱-فسفات می‌شود. در مقاله دیگر هم به یون‌های دیگر اشاره شده و همه‌ی این یون‌ها به شکل عناصر کمیاب استفاده شده‌اند (۷).

نتایج طراحی آزمایش به روش تاگوچی بمنظور افزایش تولید هیالورونیک اسید: برای شناسایی فاکتورهای موثر در افزایش تولید اسید هیالورونیک ، ۹ آزمایش بطور تصادفی توسط روش تاگوچی طراحی شد. پس از وارد کردن نتایج بدست آمده، خروجی نرم افزار اثرگذارترین سطوح هر کدام از فاکتورها را بر فرایند تولید اسید هیالورونیک معرفی نمود.

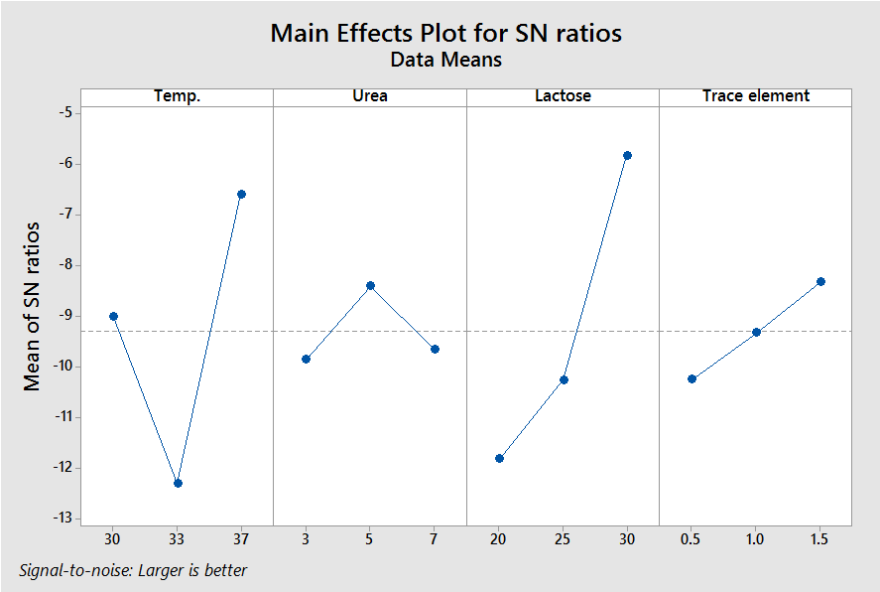
جدول ۲- مقایسه‌ی تولید اسید هیالورونیک در سویه‌های مورد بررسی و سویه‌های مشابه

منبع	تولید اسید هیالورونیک(g/l)	باکتری
این تحقیق	~۰/۲۵	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (ساعت ۴۸) PTCC 1643
(۵)	~۰/۱۲۴	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* FTDC 0291
(۵)	~۰/۰۷۶	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* FTDC 1733
این تحقیق	~۰/۴	*لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (ساعت ۹۶) PTCC 1637
(۵)	~۰/۲۳۶	*لاکتوباسیلوس رامنوسوس* FTDC 8313
این تحقیق	~۰/۲	*لاکتوباسیلوس کازئی* (ساعت ۴۸) PTCC 1608
(۵)	~۰/۲۵	*لاکتوباسیلوس کازئی* BT 2113
(۵)	~۰/۰۴۷	*لاکتوباسیلوس کازئی* BT 1311
(۵)	~۰/۲۶	*لاکتوباسیلوس کازئی* BT 1268
(۵)	~۰/۲۵۷	*لاکتوباسیلوس کازئی* BT 8633
(۵)	~۰/۲۵۸	*لاکتوباسیلوس کازئی* FTDC 8033
(۵)	~۰/۰۵۰	*لاکتوباسیلوس کازئی* BT 314
این تحقیق	~۰/۲	*استرپتوکوکوس ترموفیلوس* (ساعت ۹۶) PTCC1738
(۸)	~۰/۲۳	*استرپتوکوکوس ترموفیلوس* YIT 2084

جدول ۳- طراحی آزمایشات توسط روش تاگوچی

تولید اسید هیالورونیک (g/l)	عناصر کمیاب (ml/l)	لاکتوز (g/l)	اوره (g/l)	دما (ºC)	
۰/۲۲۳	۰/۵	۲۰	۳	۳۰	۱
۰/۳۵۱	۱	۲۵	۵	۳۰	۲
۰/۵۶۸	۱/۵	۳۰	۷	۳۰	۳
۰/۲۲۸	۱/۵	۲۵	۳	۳۳	۴
۰/۳۶۰	۰/۵	۳۰	۵	۳۳	۵
۰/۱۷۴	۱	۲۰	۷	۳۳	۶
۰/۶۵۳	۱	۳۰	۳	۳۷	۷
۰/۴۳۴	۱/۵	۲۰	۵	۳۷	۸
۰/۳۶۱	۰/۵	۲۵	۷	۳۷	۹

آنالیز اثر سطوح مختلف هر فاکتور بر پاسخ بدست آمده بر اساس طراحی تاگوچی: با بدست آوردن همه‌ی پاسخ‌ها و قرار دادن آن‌ها در نرم افزار Minitab سطوح مورد استفاده‌ی هر فاکتور هم بر اساس میانگین پاسخ و هم بر اساس نسبت Signal/Noise بدست آمد (شکل ۳). بر اساس این شکل‌ها فاکتورهای دما، لاکتوز و عناصر کمیاب در سطح بالای خود و فاکتور اوره در سطح ۲ دارای بیشترین پاسخ هستند.



شکل ۳- اثر سطوح هر فاکتور بر نسبت S/N. همانطور که در شکل مشخص است؛ فاکتورهای دما، لاکتوز و عناصر کمیاب در سطح بالای خود و فاکتور اوره در سطح ۲ دارای بیشترین پاسخ هستند.

جدول ۵- جدول آنالیز واریانس (تاثیر هر فاکتور در ستون آخر آورده شده است.)

فاکتورها	درجه‌ی آزادی (DOF)	مجموع مربعات (S)	واریانس (V)	Pure sum (S')	درصد P (%)
دما	۲	۰/۰۷۸	۰/۰۳۹	۰/۰۷۸	۳۸/۵۶۵
اوره	۲	۰	۰	۰	۰/۱۸۷
لاکتوز	۲	۰/۱۰۹	۰/۰۵۴	۰/۱۰۹	۵۳/۶۱۹
عناصر کمیاب	۲	۰/۰۱۵	۰/۰۰۷	۰/۰۱۵	۷/۵۷۸
Error	۰	-	-	-	-
جمع کل	۸	۰/۲۰۴			٪۱۰۰

میزان میانکنش بین فاکتورها در جدول ۴ نشان داده شده است. میزان شدت تداخلات یا برهمکنش با معیاری به نام SI (Severity index) یا شاخص شدت نمایش داده شده است. میانکنش عناصر کمیاب در سطح ۱ و اوره در سطح ۲ دارای بیشترین شدت برهمکنش می باشد.

آنالیز واریانس فاکتورهای مورد استفاده در جدول ۵ آورده شده است. درصد مشارکت هر کدام از فاکتورها در آخرین ستون جدول زیر دیده می شود. این جدول لاکتوز را مهمترین فاکتور در تولید اسید هیالورونیک معرفی می کند.

سطوح بهینه‌ی پیشنهاد شده توسط نرم افزار و پاسخ پیش‌بینی شده برای تولید اسید هیالورونیک: طبق نتایج و نمودارهای بدست آمده، نرم افزار پاسخی را بر اساس بهترین سطوح هر فاکتور پیش بینی کرد (جدول۶).

جدول ۴- تخمین میانکنش بین فاکتورها

میانکنش بین فاکتورها	ستون‌ها	SI (%)[a]	Opt.[b]
اوره × عناصر کمیاب	۲×۴	۴۵/۸۲	(۱،۲)
دما × عناصر کمیاب	۱×۴	۳۲/۷۷	(۳،۲)
لاکتوز × اوره	۲×۳	۹/۱۸	(۱،۳)
لاکتوز × دما	۱×۳	۷/۷۲	(۳،۳)
لاکتوز × عناصر کمیاب	۳×۴	۴/۰۷	(۳،۲)
اوره × دما	۱×۲	۰/۴۱	(۳،۱)

a. شاخص شدت. میزان شدت میانکنش‌ها را نشان می‌دهد. b. نشان دهنده‌ی سطوح موثر فاکتورها برای شرایط بهینه است.

در شرایط بهینه مقدار تولید اسید هیالورونیک از ۰/۴ گرم بر لیتر به ۰/۶۵ گرم بر لیتر افزایش یافت. این مقدار نسبت به مقدار اولیه‌ی تولید اسید هیالورونیک توسط باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به میزان ۱۶۲٪ افزایش داشته است. این بدین معناست که در شرایط بهینه و با افزودن فاکتورهای موثر بررسی شده به محیط کشت، باکتری قادر خواهد بود ۱۶۲٪ بیشتر اسید هیالورونیک تولید کند که گزارش تولید ذاتی این مقدار اسید هیالورونیک برای اولین بار توسط این باکتری با توجه به اینکه یک باکتری GRAS و غیر بیماریزا است؛ اهمیت ویژه ای دارد.

جدول ۶- شرایط بهینه و پاسخ پیش بینی شده

فاکتورها	سطح تعریف شده	شماره سطح	میزان مشارکت
دما	۳۷	۳	۰/۱۱
اوره	۵	۲	۰/۰۰۹
لاکتوز	۳۰	۳	۰/۱۵۴
عناصر کمیاب	۱/۵	۳	۰/۰۳۷
Total contribution from all factors...			۰/۳۰۹
Current grand average performance			۰/۳۰۷
Expected result at optimum condition…			**۰/۶۸۲**

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بدلیل فراهم آوردن امکانات پژوهش و تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می گردد.

منابع

۱) خادمی، س. شکراللهی، پ. زندی، م و ایرانی، ش. (۲۰۱۶). "پوشش‌دهی ژلاتین-کیتوسان روی داربست پلی کاپرولاکتون سوپرا مولکولی و بررسی تاثیر آن بر رفتار سلول‌های فیبروبلاست موشی." مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ۲۸(۴): ۵۰۰-۵۱۲.

۲) محمودی اصل زاده،ح. فاضلی،م. عیدی، ا. صمدی،ن. جمالی فر، ح و پارساسرشت،ل. (۲۰۱۳). "بررسی اثر پروبیوتیکی Bifidobacterium bifidum بر روی رده سلولهای سرطانی CacoII." مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ۲۶(۳): ۳۷۸-۳۸۵.

3) Ahmed, Z. and A. Ahmad (2017). Biopolymer Produced by the Lactic Acid Bacteria : Production and Practical Application. Microbial Production of Food Ingredients and Additives, Elsevier: 217-257.

4) Boeriu, C. G., J. Springer, F. K. Kooy, L. A. van den Broek and G. Eggink (2013). "Production methods for hyaluronan." International Journal of Carbohydrate Chemistry.

5) Choi, S.-B., L.-C. Lew, K.-C. Hor and M.-T. Liong (2014). "Fe2+ and Cu2+ increase the production of hyaluronic acid by Lactobacilli via affecting different stages of the pentose phosphate pathway." Applied biochemistry and biotechnology 173(1): 129-142.

6) Cox, M. M. and D. L. Nelson (2008). Lehninger Principles of Biochemistry, WH Freeman.

7) Hoffmann, J. and J. Altenbuchner (2014). "Hyaluronic acid production with

Corynebacterium glutamicum: effect of media composition on yield and molecular weight." Journal of applied microbiology 117(3): 663-678.

8) Izawa, N., T. Hanamizu, T. Sone and K. Chiba (2010). "Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by Streptococcus thermophilus strain YIT 2084 in milk." Journal of bioscience and bioengineering 109(4): 356-360.

9) Izawa, N., M. Serata, T. Sone, T. Omasa and H. Ohtake (2011). "Hyaluronic acid production by recombinant Streptococcus thermophilus." Journal of bioscience and bioengineering 111(6): 665-670.

10) Jagannath, S. and K. Ramachandran (2010). "Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by Streptococcus zooepidemicus." Biochemical Engineering Journal 48(2): 148-158.

11) Jeong, E., W .Y. Shim and J. H. Kim (2014). "Metabolic engineering of Pichia pastoris for production of hyaluronic acid with high molecular weight." Journal of biotechnology 185: 28-36.

12) Jung-Min Song, J.-H. I., Jae-Hoon Kang, Dae-Jung Kang "A simple method for hyaluronic acid quantification in culture broth." Carbohydrate Polymers 78 (2009) 633–634.

13) Long Liu, Y. L., Jianghua Li, Guocheng Du and Jian Chen (2011). "Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives." Liu et al. Microbial Cell Factories 10:99.

14) Muir, T. B. A. H. M.(1962) "A Modified Uranic Acid Carbazole Reaction." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 4, 330-334.

15) Toole, B. P. (2009). "Hyaluronan-CD44 interactions in cancer: paradoxes and possibilities." Clinical Cancer Research 15:7642-7648

16) Zarei, M., S. Aminzadeh, H. Zolgharnein, A. Safahieh, A. Ghoroghi, A. Motallebi, M. Daliri and A. S. Lotfi (2010). "Serratia marcescens B4A chitinase product optimization using Taguchi approach." Iranian journal of Biotechnology 8(4): 252-262.

Screening of HA-producing lactic acid bacteria and culture condition optimization of selected bacterium by Taguchi method

Fotouhi Chahuki F.[1,2], Aminzadeh A.[1], Jafarian V.[2], Tabandeh F.[1] and Khodabandeh M.[1]

[1] Bioprocess Engineering Group, Institute of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

[2] Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran

Abstract

Hyaluronic acid (HA) is a major component of the extracellular epithelial, neural and connective tissue of vertebrates, as well as of extracellular microorganisms. This polysaccharide has specific applications in ophthalmology, orthopedic, cosmetics and tissue engineering due to features such as high viscosity and biocompatibility. Animal tissues and streptococci have a major role in producing hyaluronic acid, but because of problems such as protein contamination and the presence of endotoxin, attention has been drawn to the generally recognized as safe (GRAS) bacteria for producing hyaluronic acid. Lactobacilli are probiotic bacteria that have diverse uses. The production of biochemical macromolecules by this group of bacteria is a priority because they are GRAS. Hyaluronic acid production for the first time in these GRAS bacteria including *Lactobacillus acidophilus* PTCC1643, *Lactobacillus rhamnosus* PTCC1637, *Lactobacillus casei* PTCC1608 and *Streptococcus thermophilus* PTCC1738 were investigated. In the first step, Hyaluronic acid was isolated from the specific culture medium and partially purified by ethanol precipitation daily for 96 hours. Carbazole method was used to measure the production of hyaluronic acid. Based on results, *Lactobacillus rhamnosus* produced about 0.4 g/l of hyaluronic acid at 96 hours. The increase of HA was also investigated using optimization culture medium by Taguchi design. In this method, optimal points of temperature, urea, lactose and trace elements were determined at 37 ° C, 5 g / l, 30 g / l and 1.5 ml / liter, respectively, and production of hyaluronic acid was increased by 162 %.

Key words: GRAS bacteria, Hyaluronic acid, *Lactobacillus rhamnosus*, Taguchi method