مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

بهبود تولید هیالورونیک اسید در *Streptococcus zooepidemicus* با استفاده از جهش‌زایی تصادفی و بهینه‌سازی آماری محیط کشت

فاطمه ولایتی پور، سعید امین زاده*

گروه مهندسی زیست فرایند، پژوهشکده‌ی صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

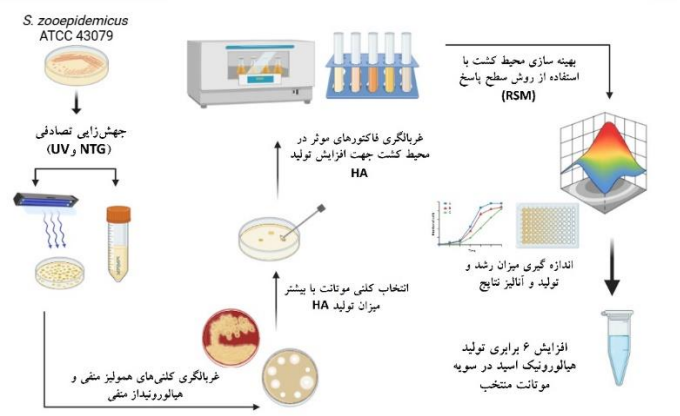
تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۲۷

چکیده

هیالورونیک اسید یکی از پلی‌ساکاریدهای زیستی با ارزش است که کاربردهای گسترده‌ای در صنایع دارویی، پزشکی و آرایشی دارد. در این مطالعه، به منظور افزایش تولید هیالورونیک اسید توسط باکتری *استرپتوکوکوس زوا‌پیدمیکوس*، از روش جهش‌زایی تصادفی با استفاده از NTG و تابش فرابنفش و سپس غربالگری سویه‌های جهش‌یافته استفاده شد. پس از انتخاب موتانت برتر بر اساس کاهش فعالیت همولیتیک و هیالورونیداز و افزایش ویژگی موکوییدی کلنی، اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید هیالورونیک اسید بررسی گردید. نتایج نشان داد محیط حاوی عصاره مخمر بیشترین میزان تولید را در میان منابع نیتروژن مورد بررسی فراهم می‌کند. در ادامه، با استفاده از طراحی آزمایش فاکتوریل و روش سطح پاسخ، اثر متغیرهای محیطی شامل گلوکز، پیرووات، فسفات و منبع نیتروژن بر تولید هیالورونیک اسید بهینه‌سازی شد. در شرایط بهینه پیش‌بینی‌شده توسط مدل، تولید هیالورونیک اسید به حدود ۳۰۴ mg/L رسید و در آزمایش تأییدی مقدار mg/L ۲۹۶ به‌دست آمد که نسبت به سویه وحشی حدود ۶/۳ برابر افزایش را نشان داد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که ترکیب جهش‌زایی تصادفی و بهینه‌سازی محیط کشت می‌تواند رویکردی مؤثر برای بهبود تولید هیالورونیک اسید در مقیاس آزمایشگاهی باشد

واژگان کلیدی: *استرپتوکوکوس زوا‌پیدمیکوس*، جهش‌زایی تصادفی، هیالورونیک اسید، NTG، RSM

*نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: aminzadeh.saeed@yahoo.com



خلاصه تصویری. نمای شماتیک از بهبود تولید هیالورونیک اسید در *Streptococcus zooepidemicus* از طریق جهش‌زایی تصادفی، غربالگری و انتخاب موتانت‌های برتر، و بهینه‌سازی شرایط کشت با استفاده از روش سطح پاسخ.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

مقدمه

هیالورونیک اسید[1] (HA) یکی از مهم‌ترین گلیکوزآمینوگلیکان‌های طبیعی است که بصورت پلیمرهای خطی، آنیونی و محلول در آب از تکرار واحدهای دی‌ساکاریدی اسید گلوکورونیک و N-استیل‌گلوکزآمین تشکیل شده است که به وسیله پیوندهای گلیکوزیدی β(1→3) و β(1→4) به یکدیگر متصل هستند (۳-۱). این ترکیب به دلیل خواص زیستی منحصر به‌فرد خود کاربردهای گسترده‌ای در صنایع دارویی، پزشکی و آرایشی–بهداشتی پیدا کرده است (۴). باکتری *استرپتوکوکوس زوایپیدمیکوس*[2] که یک کوکسی گرم مثبت متعلق به گروه Lancefield C است، یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های مورد استفاده برای تولید تجاری HA محسوب می‌شود (۵-۷). این باکتری پاتوژنیک، بی هوازی اختیاری و با فعالیت β-همولیز است که کپسول پلی‌ساکاریدی حاوی HA را به طور طبیعی و بعنوان یک مکانیسم دفاعی برای فرار از پاسخ ایمنی میزبان تولید می‌کند (۸-۱۰). با توجه به اهمیت صنعتی این باکتری، مطالعات متعددی در ایران و در سطح بین المللی با هدف افزایش تولید HA از طریق مهندسی سویه و دستکاری مسیرهای متابولیکی مرتبط با سنتز HAانجام شده است. در این مطالعات، تغییر بیان ژن‌های اصلی مسیر، از جمله ژن‌های درگیر در سنتز HAو تأمین پیش‌سازهای آن، و همچنین حذف یا کاهش فعالیت مسیرهای رقیب، به منظور افزایش تولید مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال، مطالعات نشان داده‌اند که تغییر بیان ژن‌های *hasA*، *hasB* و *hasC* و نیز تنظیم متابولیسم پیش‌سازها می‌تواند تولید HA را در سویه‌های مهندسی‌شده *استرپتوکوکوس زوایپیدمیکوس* افزایش دهد (۱۱, ۱۲).

در بین روش های مهندسی سویه، جهش‌زایی تصادفی همچنان به عنوان روشی ساده، کم‌هزینه و مؤثر برای بهبود ویژگی‌های تولیدی میکروارگانیسم‌ها شناخته می‌شود. عوامل جهش‌زا از جمله تابش فرابنفش (ایجاد کننده دایمرهای پیریمیدینی) و ترکیبات شیمیایی آلکیله‌کننده مانند(NTG) N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine می‌توانند با ایجاد تغییرات در DNAمنجر به ایجاد سویه‌هایی با توانایی متابولیکی بالاتر شوند (۱۳-۱۵). NTG با با آلکیله‌کردن O^6 گوانین یا O^4 تیمین عمدتاً موجب جهش‌های transition از نوع GC→AT می‌شود. این تغییرات باعث آسیب واضحی در مارپیچ دوتایی DNA نمی‌شوند درنتیجه شناسایی آن‌ها برای سیستم ترمیم DNA mismatch دشوار خواهد بود (۱۶, ۱۷). اگرچه فرایند جهش‌زایی و غربالگری با این ماده شیمیایی دشوار است اما تاریخ طولانی و موفقیت آمیزی در تولید سویه‌های بهبود یافته‌ی آزمایشگاهی و صنعتی داشته است (۱۵, ۱۸-۲۲).

علاوه بر ویژگی‌های ژنتیکی سویه، ترکیب و غلظت اجزای محیط کشت نیز نقش مهمی در رشد باکتری و میزان سنتز HA دارند .در مطالعات انجام‌شده برروی این باکتری، عواملی مانند منبع و غلظت کربن و نیتروژن، فسفات، pH، دمای محیط، هوادهی و مدت زمان انکوباسیون بر رشد سلولی و تولید HA اثرگذار بوده‌اند (۲۳-۲۶). تا کنون منابع کربنی و نیتروژنی جایگزین متنوعی مانند ساکارز، لاکتوز، ضایعات کارخانه‌ها، آب پنیر و هیدرولیزهای پروتئینی متنوع در مطالعات مختلف با درنظر گرفتن کاهش هزینه‌های تولید مورد

[1] Hyaluronic acid

[2] *Streptococcus zooepidemicus*

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

بررسی قرار گرفته‌اند (۲۴-۲۶). در این راستا، از روش‌های آماری مانند روش سطح پاسخ[3] (RSM) به عنوان ابزاری کارآمد برای تعیین شرایط بهینه تولید بهره گرفته می‌شود (۲۷).

با وجود مطالعات متعدد در زمینه مهندسی ژنتیک و بهینه‌سازی فرایند تولیدHA ، مطالعاتی که به طور هم‌زمان ظرفیت بهبود سویه از طریق جهش‌زایی تصادفی و اثر متقابل آن با شرایط محیط کشت را در این باکتری بررسی کنند، محدود هستند. بنابراین هدف از این مطالعه بهبود تولید HA در باکتری *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* از طریق ایجاد جهش‌زایی تصادفی و بهینه‌سازی شرایط محیط کشت با روش RSM بوده است. نتایج این پژوهش می‌تواند در جهت افزایش بازده تولید میکروبی هیالورونیک اسید و فراهم کردن مبنایی برای مطالعات بیشتر در زمینه بهینه‌سازی فرایندهای تخمیری و ارزیابی اثر ترکیب جهش‌زایی و بهینه‌سازی محیط کشت، مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

سویه‌ی *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس*[4] ۴۳۰۷۹ ATCC بصورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی آمریکا[5] و ماده جهش‌زا NTG از شرکت Tokyo Chemical Industry (TCI) ژاپنی خریداری شدند. محیط‌های کشت BHI[6] مایع و جامد و بلاد آگار از شرکت Ibresco و سایر مواد شیمیایی از شرکت Merck تهیه گردیدند.

جهش زایی شیمیایی و نوری

به منظور ایجاد جهش‌های تصادفی از تیمار کشت باکتریایی با غلظت‌های مختلف ماده جهش‌زای NTG (۵۰ تا ۵۰۰ µg/ml) و در زمان‌های مختلف (۲۰ دقیقه تا ۲ ساعت) استفاده شد. همچنین، برخی از جمعیت‌های حاصل از تیمار NTG به‌منظور افزایش تنوع ژنتیکی، در معرض تابش UV-C (۲۵۴ nm) با استفاده از لامپ UV تعبیه‌شده در هود لامینار در فاصله‌ی حدود ۳۰ سانتیمتری از منبع تابش برای ۱۰ تا ۴۰ ثانیه قرار گرفتند. پس از تیمار، پلیت‌ها در تاریکی انکوبه شدند تا از ترمیم نوری جلوگیری شود. سپس همگی بصورت شبانه در ۳۷ درجه‌ی سیلیسیوس بصورت ثابت انکوبه شدند. جزئیات روش در پیوست ۱ آورده شد. در روند جهش‌زایی تصادفی به‌دلیل ماهیت اکتشافی-غربالگری این مرحله، در طراحی آزمایش ترکیبات متعددی از این پارامترها به‌طور تجربی ارزیابی شدند. به‌منظور انتخاب شرایط مناسب، میزان زنده‌مانی به‌صورت نسبی و مقایسه کیفی تراکم کلنی‌های حاصل در مقایسه با نمونه شاهد (بدون تیمار) مد نظر قرار گرفت. شرایطی که موجب کاهش شدید تعداد کلنی‌ها یا عدم رشد شدند، کنار گذاشته شدند. (پیوست-جدول۱). موتانت‌های منتخب از شرایط مختلف جهش‌زایی به دست آمدند.

غربالگری اولیه موتانت‌ها بر اساس الگوی همولیز و مورفولوژی کلنی

غربالگری اولیه در چندین نوبت آزمایشی و با بررسی تعداد زیادی کلنی حاصل از شرایط مختلف جهش‌زایی انجام شد. کلنی‌ها بر اساس تغییرات ظاهری نسبت به سویه وحشی به‌صورت اولیه بررسی شده و کلنی‌های دارای تغییرات فنوتیپی بارز برای بررسی‌های تکمیلی انتخاب شدند. با توجه به ارتباط بین تولید فاکتورهای ویرولانس و فعالیت همولیتیک در استرپتوکوک‌ها، کلنی‌هایی که به‌صورت کیفی و بر اساس مشاهده چشمی دارای کاهش شدت همولیز (کاهش قطر هاله شفاف اطراف کلنی نسبت به سویه وحشی) بودند به عنوان کاندیدای اولیه انتخاب شدند. همزمان، کلنی‌های

[3] Response Surface Methodology
[4] *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 43079
[5] American Type Culture Collection (ATCC)
[6] Brain Heart Infusion

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

بزرگ‌تر با ظاهر موکوییدی‌تر، به عنوان شاخص غیرمستقیم و اولیه مرتبط با احتمال افزایش تولید کپسول هیالورونیک اسید در نظر گرفته شدند. سپس برای تعداد محدودی از کلنی‌های منتخب، قطر هاله همولیز با استفاده از نرم‌افزار ImageJ به‌صورت نیمه‌کمی اندازه‌گیری و با سویه وحشی مقایسه گردید. در نهایت، ۱۳ کلنی با بیشترین تفاوت فنوتیپی نسبت به سویه وحشی برای بررسی‌های دقیق‌تر انتخاب شدند.

ارزیابی فعالیت هیالورونیداز

به منظور بررسی فعالیت آنزیم هیالورونیداز در سویه‌های منتخب، آزمون کیفی پلیت با اندکی تغییرات با استفاده از دیسک‌های استریل کاغذ صافی بر سطح محیط BHI آگار حاوی هیالورونیک اسید با غلظت نهایی ۰/۴ mg/ml (معادل ۰/۰۴ درصد وزنی/حجمی)انجام شد (پیوست۲) (۲۸).

ارزیابی تولید هیالورونیک اسید و رشد سلولی

موتانت‌های منتخب و سویه وحشی در محیط BHI تحت شرایط استاندارد کشت داده شدند. نمونه‌برداری در فواصل زمانی مشخص (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت) انجام شد و رشد با اندازه‌گیری جذب نوری (OD_{600nm}) هر ۲۴ ساعت یکبار تعیین گردید. میزان تولید هیالورونیک اسید در سوپرناتانت کشت با استفاده از روش CTAB اندازه‌گیری شد (۲۹). برای استخراج و اندازه‌گیری هیالورونیک اسید(HA) ، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از کشت برداشته شده و جهت لیز سلولی، به آن SDS ۱۰ درصد (به میزان ۵۰ میکرولیتر) اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت جمع‌آوری گردید. در ادامه، برای رسوب‌دهی HA، تری‌کلرواستیک اسید (TCA) به سوپرناتانت افزوده شده و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شدند. پس از سانتریفیوژ، رسوب حاصل با اتانول مطلق شسته شده و در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس به مدت شبانه انکوبه شد. این مرحله شستشو با اتانول مجدداً تکرار گردید. در نهایت، رسوب در آب مقطر حل شده و مقدار HA با استفاده از روش کدورت‌سنجی CTAB در طول موج ۵۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای کمی‌سازی، از منحنی استاندارد هیالورونیک اسید در محدوده غلظتی ۱-۰ mg/ml با استفاده از ۶ نقطه استاندارد استفاده شد (پیوست-شکل ۱). کلیه اندازه‌گیری‌ها در برابر کنترل مناسب (محیط کشت بدون HA) انجام شدند. داده‌ها در محدوده خطی منحنی استاندارد تحلیل شده و نتایج به صورت mg/L گزارش شدند. برای مقایسه بین سویه وحشی و موتانت منتخب، از آزمون t-test مستقل دوطرفه با تصحیح Welch استفاده شد. اختلافات در سطح $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از سه تکرار مستقل گزارش شدند.

بررسی اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید هیالورونیک اسید

به منظور ارزیابی تأثیر نوع منبع نیتروژن بر رشد و تولید هیالورونیک اسید توسط موتانت منتخب، کشت‌ها در هشت محیط مختلف در حجم کشت ۱۰ میلی‌لیتر در فالکون‌های استریل انجام شد. محیط BHI به عنوان کنترل مرجع در نظر گرفته شد. هفت محیط دیگر دارای ترکیب پایه یکسان شامل گلوکز (۳۰ g/L)، منیزیم سولفات (۱ g/L)، دی‌پتاسیم فسفات (۲/۵ g/L) و سدیم کلراید (۱/۵ g/L) بود و pH آن پیش از استریل‌سازی روی ۶/۸ تنظیم شد. تفاوت میان این هفت محیط در نوع منبع نیتروژن مورد استفاده بود که به این شرح جایگزین گردید: آرد لوبیا سفید، سبوس برنج، پودر سویا، گلوتن گندم، گلوتن ذرت، مخلوط گلوتن گندم و گلوتن ذرت (به نسبت مساوی) و عصاره مخمر و پپتون (نحوه آماده سازی در پیوست ۴). کشت‌ها شرایط یکسان انکوبه

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

شدند، سپس میزان تولید هیالورونیک اسید اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه گردیدند.

غربالگری فاکتورهای موثر بر تولید هیالورونیک اسید

به منظور غربالگری عوامل مؤثر بر تولید هیالورونیک اسید، از طراحی فاکتوریل کسری دو سطحی(Two-level fractional factorial design) با استفاده از نرم‌افزارDesign-Expert (نسخه ۱۳) بهره گرفته شد. فاکتورها بر اساس گزارش‌های مطالعات پیشین در زمینه تولید HA در باکتری مورد نظر و همچنین نتایج آزمایش‌های اولیه این مطالعه انتخاب شدند. در انتخاب فاکتورها، نقش آن‌ها در تأمین پیش‌سازهای سنتزHA ، رشد و متابولیسم باکتری و اثر گزارش‌شده‌ی آن‌ها بر تولید HA در نظر گرفته شد. بر این اساس ، اثر فاکتورهای گلوکز(A) ، پیرووات(B) ، بیوتین(C) ، $MgSO_4$ (D)، $NaCl$ (E)، K_2HPO_4 (F)، pH (G)، $CaCl_2$ (H) و نوع منبع نیتروژن (بصورت کیفی شامل عصاره مخمر و یا کلاژن هیدرولیز شده با غلظت g/L ۱۰) (J) در دو سطح پایین و بالا بررسی گردید. با توجه به تعداد فاکتورها و محدودیت تعداد آزمایش‌ها، طراحی به‌صورت کسری از نوع $2^{(9-5)}$ و شامل ۱۶ آزمایش انجام شد. این طراحی دارای وضوح (Resolution) نوع III است؛ به این معنا که برخی از اثرات اصلی ممکن است با اثرات متقابل دو عاملی به‌طور همزمان بر پاسخ اثر بگذارند و به‌صورت مستقل قابل تفکیک نباشند. ازاین‌رو، نتایج این مرحله با هدف غربالگری اولیه تفسیر شدند. پاسخ‌های مورد بررسی شامل میزان تولید هیالورونیک اسید (mg/L) و رشد سلولی (OD_{600nm}) بودند. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) انجام شد و سطح معنی‌داری برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

بهینه‌سازی شرایط تولید هیالورونیک اسید با روش سطح پاسخ

پس از انجام طراحی فاکتوریل دو سطحی و شناسایی عوامل مؤثر، چهار فاکتور شامل گلوکز(A)، پیرووات(B)، K_2HPO_4 (C) و منبع نیتروژن (D) به عنوان متغیرهای معنی‌دار انتخاب شدند. به منظور تعیین شرایط بهینه تولید هیالورونیک اسید، از روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology; RSM)با استفاده از طراحی Box–Behnken (BBD) در نرم‌افزار Design-Expertبهره گرفته شد. هر یک از فاکتورها در سه سطح (پایین، میانی و بالا) بررسی شدند. در مجموع ۲۹ آزمایش در یک بلاک بر اساس ماتریس طراحی اجرا گردید. پاسخ‌های اندازه‌گیری‌شده شامل میزان تولید هیالورونیک اسید (mg/L) و رشد سلولی (OD_{600nm}) بودند. داده‌ها با استفاده از مدل درجه دوم (Quadratic model)تحلیل شدند و معنی‌داری آماری مدل و ضرایب با استفاده از تحلیل واریانس (ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵ درصد ارزیابی گردید. کفایت مدل بر اساس مقدارF-value ، مقدارp ، آزمون Lack of Fit و ضریب تعیین (R^2) بررسی شد. سطوح بهینه فاکتورها بر اساس بیشینه‌سازی تولید هیالورونیک اسید تعیین گردید.

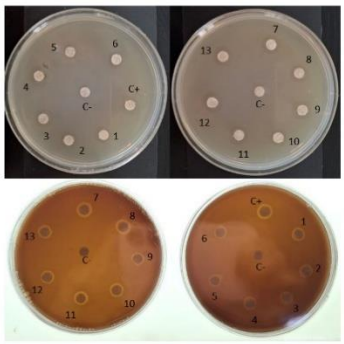
نتایج

با توجه به ماهیت جهش‌زایی تصادفی و تعداد زیاد کلنی‌های حاصل، غربالگری اولیه به‌صورت کیفی انجام شد و تنها کلنی‌های دارای تغییرات فنوتیپی بارز وارد مراحل بعدی شدند. در تیمار با NTG با افزایش غلظت و زمان انکوباسیون، درصد زنده‌مانی به طور معنی‌داری کاهش یافت. تیمار تکمیلی با UV نیز موجب کاهش بیشتر زنده‌مانی و افزایش تنوع فنوتیپی کلنی‌ها در اندازه، مورفولوژی و شدت همولیز گردید. به منظور مقایسه فعالیت همولیز و هیالورونیداز در سویه‌های منتخب، قطر هاله‌های ایجادشده روی محیط بلاد آگار و

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

محیط BHI حاوی هیالورونیک اسید اندازه‌گیری شد. برای هر کلنی، دو قطر عمود برهم اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها به عنوان قطر نهایی هاله در نظر گرفته شد (شکل ۱. A و B). نتایج نشان داد سویه وحشی دارای بیشترین فعالیت همولیتیک با میانگین قطر هاله ۱۰/۸ میلی‌متر بود و فعالیت هیالورونیداز آن ۱۲/۳ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. به‌طور مشخص، کلنی‌های ۱، ۴، ۸ و ۱۱ دارای کمترین فعالیت همولیتیک و کلنی‌های ۶ و ۱۱ بیشترین کاهش قطر هاله تجزیه هیالورونان را نسبت به سویه وحشی نشان دادند. بررسی منحنی رشد سویه وحشی و ۱۳ کلنی جهش‌یافته در طول ۹۶ ساعت نشان داد که اغلب کلنی‌ها الگوی رشد مشابهی با سویه کنترل داشتند و وارد فاز سکون شدند (شکل ۱.C). مقایسه میزان تولید هیالورونیک اسید در طول زمان نشان داد که برخی از کلنی‌های جهش‌یافته افزایش قابل‌توجهی در تولید HA نسبت به سویه وحشی داشتند (شکل ۱. D). میزان تولید اسید هیالورونیک در سویه وحشی پس از ۴۸ ساعت کشت برابر با ۱/۲ mg/L ± ۴۶/۶ اندازه‌گیری شد.

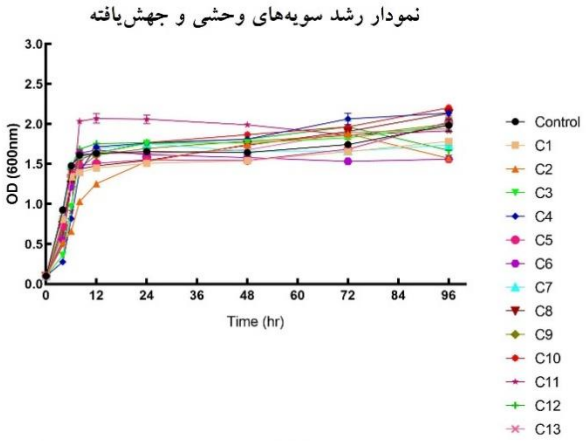
A



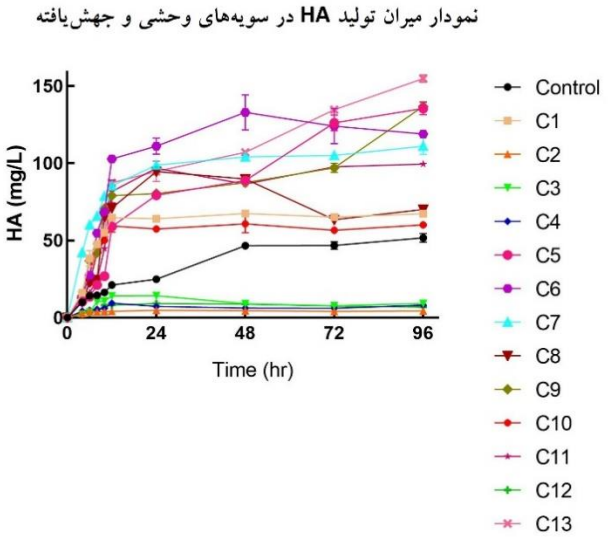
B

کلنی	قطر هاله تست همولیز	قطر هاله در تست هیالورونیداز
سویه وحشی	۱۰/۸	۱۲/۳
۱	۸/۵	۹/۸
۲	۹	۱۰/۶
۳	۷/۷	۱۰/۵
۴	۸/۴	۱۲/۱
۵	۷/۹	۹/۶
۶	۸	۸/۲
۷	۱۰/۳	۱۲
۸	۸/۴	۱۱/۴
۹	۷/۱	۹/۶
۱۰	۸/۷	۹/۳
۱۱	۸/۲	۱۰/۱
۱۲	۸/۴	۹/۴
۱۳	۸/۹	۱۰/۴

C



D



شکل ۱. ارزیابی فنوتیپی و مقایسه رشد و تولید هیالورونیک اسید در سویه وحشی و کلنی‌های جهش‌یافته. A) بررسی الگوی همولیز در محیط بلاد آگار و آزمون فعالیت هیالورونیداز در محیط حاوی هیالورونیک اسید. B) اندازه‌گیری کمی قطر هاله همولیز و هیالورونیداز. C) منحنی رشد سویه وحشی و ۱۳ کلنی جهش‌یافته در محیط BHI. D) مقایسه میزان تولید هیالورونیک اسید در سویه وحشی و کلنی‌های جهش‌یافته. میله‌های خطا در تمامی نقاط لحاظ شده‌اند، اما در برخی موارد به دلیل پایین بودن پراکندگی داده‌ها، اندازه آن‌ها کوچک بوده و ممکن است در نمودار به وضوح قابل مشاهده نباشند.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

انتخاب کلنی برتر بر اساس مجموعه‌ای از شاخص‌ها شامل کاهش فعالیت همولیتیک، کاهش فعالیت هیالورونیداز و مهم‌تر از همه افزایش میزان تولید هیالورونیک اسید انجام شد. در این میان، کلنی شماره ۶ علاوه بر کاهش قابل توجه در فعالیت هیالورونیداز و همولیز، بالاترین میزان تولید HA را در مقایسه با سایر موتانت‌ها نشان داد. کلنی شماره ۶ در محیط BHI توانست میزان تولید را به حدود ۲/۹ mg/L ± ۱۴۲/۹ افزایش دهد که نشان‌دهنده افزایش تقریباً سه برابری نسبت به سویه وحشی است. آزمون t-test مستقل (با تصحیح Welch) نشان داد که این افزایش از نظر آماری بسیار معنی‌دار است ($P < 0.0001$، $t = ۵۳/۸۱$، $df = ۲/۷۰۵$). اختلاف میانگین بین دو گروه برابر با ۹۶/۳ mg/L بود که نشان‌دهنده افزایش قابل‌توجه تولید HA در سویه جهش‌یافته می‌باشد. از این رو، این کلنی به عنوان سویه منتخب برای ادامه مطالعات انتخاب گردید.

به‌منظور بررسی اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید هیالورونیک اسید، کلنی منتخب در هشت محیط کشت با منابع نیتروژن متفاوت کشت داده و میزان تولید HA اندازه‌گیری گردید، بیشترین میزان تولید در محیط غنی BHIمشاهده شد. در میان محیط‌های حاوی منابع نیتروژن جایگزین نیز، محیط شماره ۷ حاوی عصاره مخمر و پپتون بیشترین تولید HA را نشان داد، پس از آن به‌ترتیب محیط شماره ۳ حاوی پودر سویا و محیط شماره ۱ حاوی آرد لوبیا سفید قرار داشتند (پیوست-شکل۲). اگرچه ترکیب عصاره مخمر و پپتون به عنوان منبع نیتروژن مورد بررسی قرار گرفت، اما جهت کاهش پیچیدگی در طراحی آزمایش‌های بهینه‌سازی، عصاره مخمر به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر در مرحله غربالگری فاکتورها برای مراحل بعدی انتخاب شد.

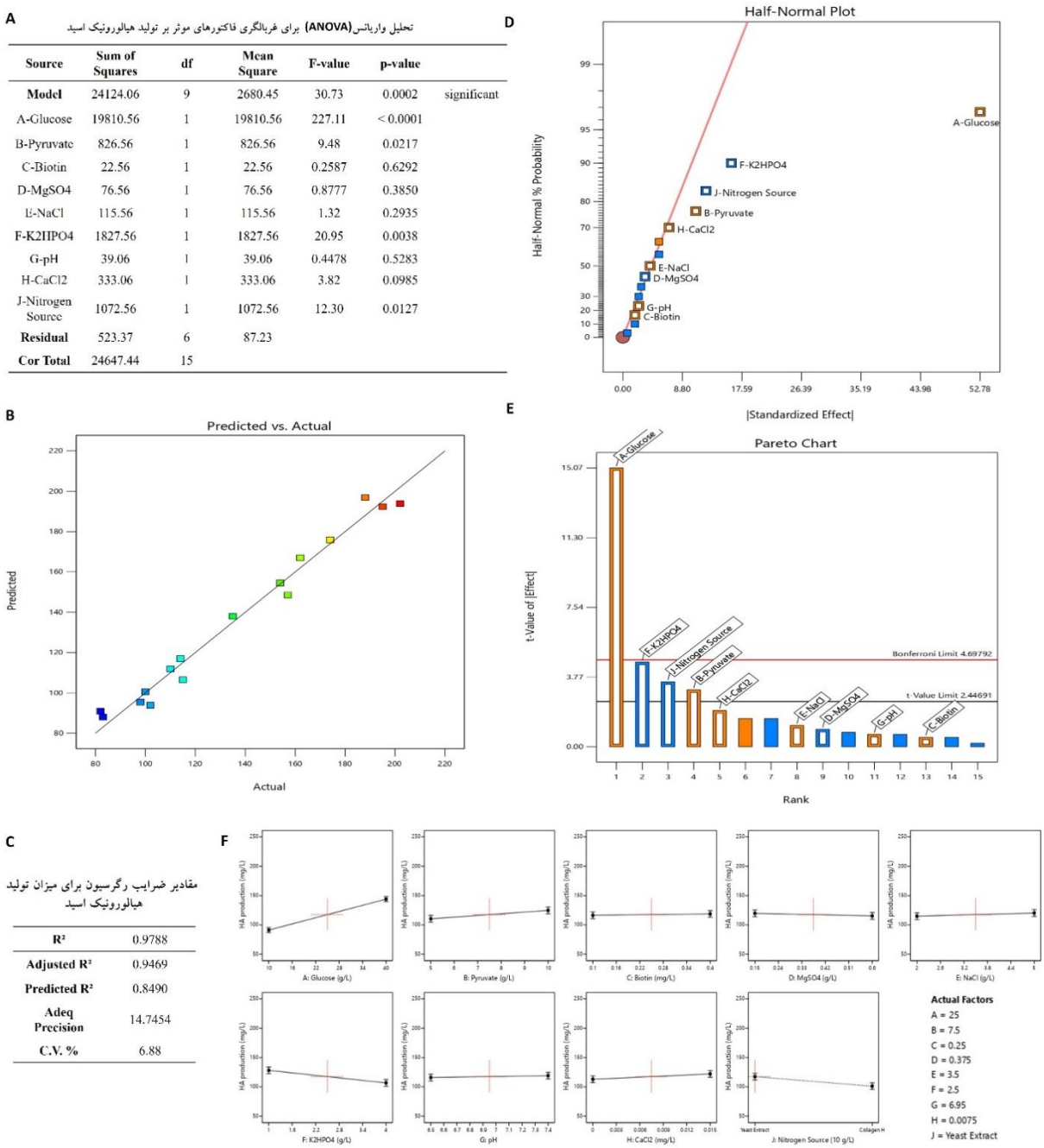
نتایج حاصل از آزمایش فاکتوریل کسری جهت غربالگری فاکتورهای مؤثر، میزان تولید HA در شرایط مختلف آزمایش را در محدوده ۸۲ تا mg/L ۲۰۲ نشان داد (پیوست-جدول ۲). بیشترین مقدار تولید (۲۰۲ mg/L) در آزمایش شماره ۶ مشاهده شد که در آن غلظت گلوکز g/L ۶۰، پیروات ۱۰g/L و منبع نیتروژن عصاره مخمر بود. تحلیل واریانس (ANOVA) نشان داد که مدل از نظر آماری معنی‌دار است. در میان فاکتورها در محدوده بررسی‌شده، گلوکز، پیروات، K_2HPO_4 و منبع نیتروژن اثر معنی‌داری بر تولید HA داشتند (شکل۲. A). در این مرحله، نوع منبع نیتروژن به‌صورت کیفی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، عصاره مخمر عملکرد بهتری نشان داد و به‌عنوان منبع نیتروژن برای مراحل بعدی انتخاب گردید. مقدار ضریب تعیین R^2 بیانگر توضیح ۹۷/۸۸ درصد از تغییرات پاسخ توسط مدل می‌باشد. همچنین مقدار Adjusted R^2 برابر با ۰/۹۴۶۹ و Predicted R^2 برابر با ۰/۸۴۹۰ به‌دست آمد، اختلاف ۰/۰۹۷۹ بین این دو شاخص، نشان‌دهنده مطابقت قابل‌قبول بین برازش مدل و توان پیش‌بینی آن است. مقدار Adeq Precision برابر با ۱۴/۷۵ نشان‌دهنده نسبت مناسب سیگنال به نویز مدل می‌باشد و کفایت مدل برای تحلیل پاسخ می‌باشد (شکل۲. C). علاوه بر این، مقدار ضریب تغییرات (CV) نشان‌دهنده دقت مناسب آزمایش‌ها است. نمودار Half-Normal نیز تأثیر قابل‌توجه فاکتورهای گلوکز، K_2HPO_4، منبع نیتروژن و پیرووات را تأیید نمود، به‌طوری که این فاکتورها فاصله بیشتری از خط مرجع داشتند (شکل۲. D). نمودار پارتو نیز این نتایج را تأیید کرده و نشان داد که گلوکز مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بر تولید هیالورونیک اسید است (شکل۲. E). همچنین نمودار مقادیر پیش‌بینی‌شده در مقابل مقادیر واقعی نشان‌دهنده توانایی مناسب مدل در پیش‌بینی پاسخ می‌باشد (شکل۲. F).

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

A

تحلیل واریانس(ANOVA) برای غربالگری فاکتورهای موثر بر تولید هیالورونیک اسید

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	24124.06	9	2680.45	30.73	0.0002	significant
A-Glucose	19810.56	1	19810.56	227.11	< 0.0001	
B-Pyruvate	826.56	1	826.56	9.48	0.0217	
C-Biotin	22.56	1	22.56	0.2587	0.6292	
D-MgSO4	76.56	1	76.56	0.8777	0.3850	
E-NaCl	115.56	1	115.56	1.32	0.2935	
F-K2HPO4	1827.56	1	1827.56	20.95	0.0038	
G-pH	39.06	1	39.06	0.4478	0.5283	
H-CaCl2	333.06	1	333.06	3.82	0.0985	
J-Nitrogen Source	1072.56	1	1072.56	12.30	0.0127	
Residual	523.37	6	87.23			
Cor Total	24647.44	15				



C

مقادیر ضرایب رگرسیون برای میزان تولید هیالورونیک اسید

R^2	0.9788
Adjusted R^2	0.9469
Predicted R^2	0.8490
Adeq Precision	14.7454
C.V. %	6.88

شکل ۲. نتایج طراحی غربالگری عوامل مؤثر بر تولید هیالورونیک اسید. A) جدول تحلیل واریانس (ANOVA) برای بررسی معنی‌داری عوامل مختلف. B) نمودار مقادیر پیش‌بینی‌شده در مقابل مقادیر واقعی برای ارزیابی دقت مدل. C) شاخص‌های آماری برازش مدل شامل R^2 ، Adjusted R^2 و Predicted R^2. D) نمودار Half-Normal برای شناسایی عوامل مؤثر بر پاسخ. E) نمودار پارتو نشان‌دهنده شدت اثر عوامل مختلف بر تولید. F) نمودار اثرات اصلی (Main effects) فاکتورهای مختلف بر میزان تولید.

بر اساس نتایج مرحله غربالگری، مهم‌ترین متغیرهای مؤثر انتخاب و در مرحله بعدی به منظور بهینه‌سازی تولید HA، از روش سطح پاسخ (RSM) بر پایه طراحی Box–Behnken استفاده شد. درRSM، غلظت عصاره مخمر (g/L) به‌عنوان یک متغیر کمی وارد مدل گردید تا مقدار بهینه آن تعیین شود. طراحی آزمایش شامل ۲۹ تیمار آزمایشی بود که پنج تکرار در نقطه مرکزی برای برآورد خطای آزمایش در نظر گرفته شد(پیوست- جدول ۳). مقدار تولید اسید هیالورونیک در تیمارهای مختلف در بازه‌ی ۲۳۱ تا ۳۰۵ mg/L تغییر کرد. بیشترین میزان تولید HA در شرایط شامل ۶۰ g/L گلوکز، ۱۰ g/L پیروات، ۳/۵ g/L K_2HPO_4 و ۱۰ g/L

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

عصاره مخمر مشاهده شد. همچنین مقادیر به‌دست‌آمده در تکرارهای نقطه مرکزی اختلاف کمی نشان دادند که بیانگر دقت مناسب آزمایش‌ها و قابلیت اعتماد طراحی آزمایشی است. نتایج تحلیل واریانس (ANOVA) مدل ارائه شده در شکل ۳. A نشان داد که مدل رگرسیونی از نظر آماری بسیار معنی‌دار است. در میان فاکتورها، منبع نیتروژن بیشترین اثر را بر تولید HA داشت. علاوه بر اثرات اصلی، اثرات متقابل بین فاکتورها نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعامل بین گلوکز و منبع نیتروژن (AD) و همچنین تعامل بین K_2HPO_4 و منبع نیتروژن (CD) دارای اثر معنی‌دار هستند. این نتایج نشان می‌دهد که منبع نیتروژن نقش کلیدی در تعامل با سایر فاکتورها در فرآیند تولید اسید هیالورونیک ایفا می‌کند. مقادیر p کمتر از ۰/۰۰۰۱ تمامی ترم‌های درجه دوم بیانگر اثرات غیرخطی متغیرها بر پاسخ است که نشان‌دهنده وجود یک نقطه بهینه در محدوده متغیرهای مورد بررسی می‌باشد. مقدار ضریب تعیین (R^2) برابر با ۰/۹۶۳۹ به‌دست آمد که نشان می‌دهد مدل قادر است حدود ۹۶ درصد از تغییرات پاسخ را توضیح دهد.

همچنین مقادیر $Adjusted\ R^2$ و $Predicted\ R^2$ به‌ترتیب برابر با ۰/۹۲۷۸ و ۰/۸۳۲۱ بودند و اختلاف ۰/۰۹۵۷ بین این دو مقدار نشان‌دهنده مطابقت قابل‌قبول بین برازش مدل و توان پیش‌بینی آن است. مقدار Adeq Precision برابر با ۱۶/۰۵ نیز نشان‌دهنده نسبت مناسب سیگنال به نویز و کفایت مدل برای توصیف و پیش‌بینی پاسخ بود. ضریب تغییرات (CV) برابر با ۲/۱۸ درصد نشان‌دهنده دقت بالای آزمایش‌ها و تکرارپذیری مناسب نتایج است. نمودارPerturbation ارائه‌شده در شکل B.۳ نشان می‌دهد تغییرات در منبع نیتروژن و پس از آن، گلوکز، بیشترین تأثیر را بر تولید اسید هیالورونیک داشته اند. نمودار مقادیر پیش‌بینی‌شده در مقابل مقادیر واقعی (Predicted vs Actual)در شکل D.۳ ارائه شده است که نشان‌دهنده همبستگی مناسب بین مقادیر پیش‌بینی‌شده توسط مدل و داده‌های تجربی است. نمودار باقیمانده‌ها در مقابل مقادیر پیش‌بینی‌شده (Residuals vs Predicted)در شکل E.۳ نشان‌دهنده یکنواخت بودن واریانس خطاها و صحت فرضیات مدل رگرسیونی می‌باشد.

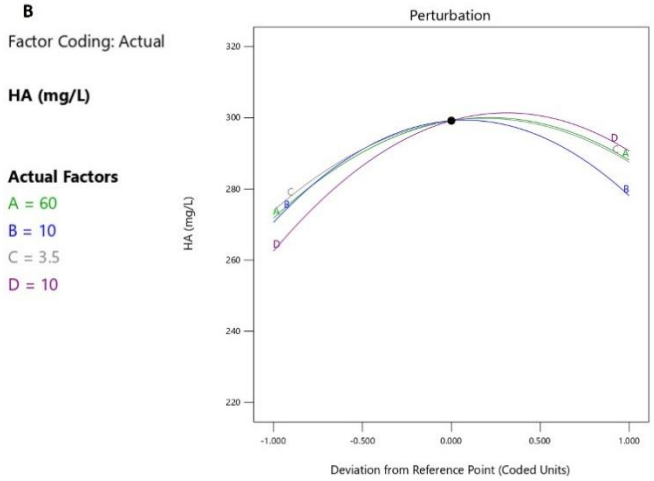
مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

A

تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم در طراحی Box–Behnken برای تولید اسید هیالورونیک

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	12415.92	14	886.85	26.70	< 0.0001	significant
A-Glucose	800.33	1	800.33	24.09	0.0002	
B-Pyruvate	168.75	1	168.75	5.08	0.0408	
C-K2HPO4	560.33	1	560.33	16.87	0.0011	
D-Nitrogen Source	2380.08	1	2380.08	71.65	< 0.0001	
AB	110.25	1	110.25	3.32	0.0899	
AC	64.00	1	64.00	1.93	0.1868	
AD	240.25	1	240.25	7.23	0.0176	
BC	132.25	1	132.25	3.98	0.0658	
BD	6.25	1	6.25	0.1882	0.6711	
CD	240.25	1	240.25	7.23	0.0176	
A^2	2397.41	1	2397.41	72.17	< 0.0001	
B^2	4005.55	1	4005.55	120.58	< 0.0001	
C^2	2214.00	1	2214.00	66.65	< 0.0001	
D^2	3313.04	1	3313.04	99.74	< 0.0001	
Residual	465.05	14	33.22			
Lack of Fit	342.25	10	34.23	1.11	0.4991	not significant
Pure Error	122.80	4	30.70			
Cor Total	12880.97	28				

B

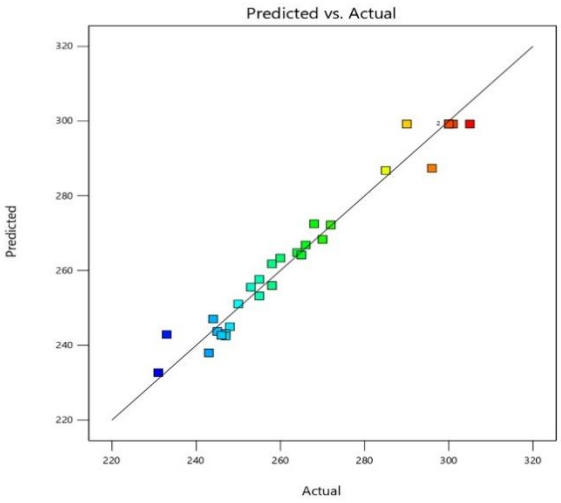


C

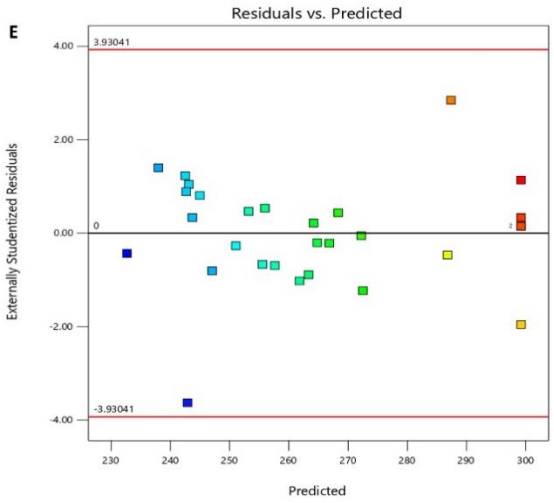
مقادیر ضرایب رگرسیون برای میزان تولید هیالورونیک اسید

R^2	0.9639
Adjusted R^2	0.9278
Predicted R^2	0.8321
Adeq Precision	16.0512
C.V. %	2.18

D



E

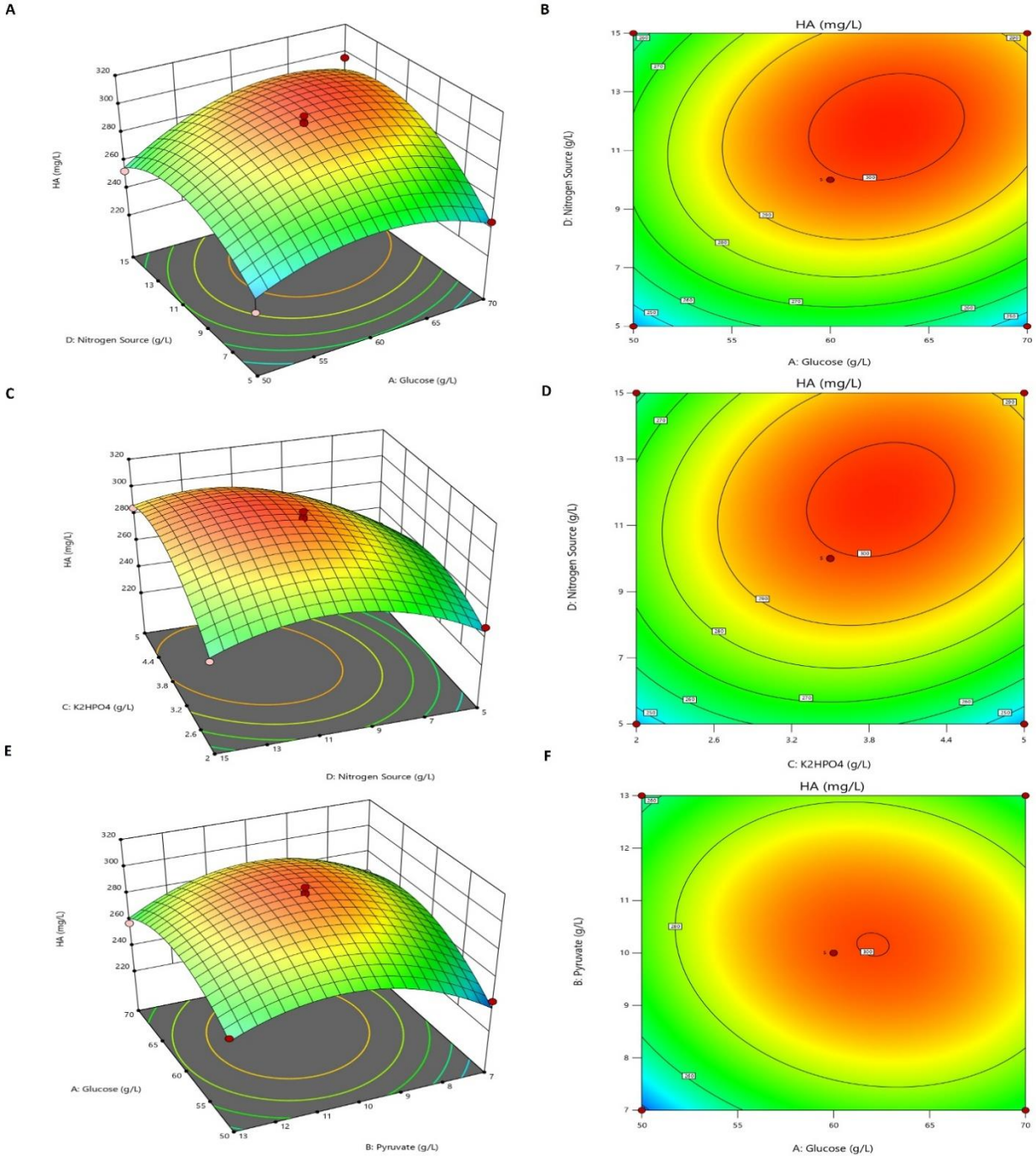


شکل۳. تحلیل آماری مدل RSM برای تولید اسید هیالورونیک. A) جدول تحلیل واریانس مدل درجه دوم حاصل از طراحی Box–Behnken. B) نمودار Perturbation که اثر تغییرات هر فاکتور بر تولید HA را نشان می‌دهد. C) شاخص‌های آماری برازش مدل. D) نمودار مقادیر پیش‌بینی شده در مقابل مقادیر واقعی تولید HA. E) نمودار باقیمانده‌ها در مقابل مقادیر پیش‌بینی شده جهت ارزیابی اعتبار مدل.

برای بررسی اثر متقابل متغیرها بر تولید HA، نمودارهای سه‌بعدی سطح پاسخ و کانتور ترسیم شدند (شکل ۴). نمودارهای مربوط به اثر گلوکز و منبع نیتروژن نشان دادند که با افزایش غلظت گلوکز تا حدود ۶۰ g/L، میزان تولید را افزایش یافته و پس از آن کاهش پیدا می‌کند. همچنین افزایش منبع نیتروژن تا حدود ۱۰ تا ۱۱ g/L موجب افزایش تولید HA شده است. بررسی اثر K_2HPO_4و منبع نیتروژن نشان داد که بیشترین میزان تولید اسید هیالورونیک در حدود ۳/۵ g/L برای K_2HPO_4و حدود ۱۰ g/L برای منبع نیتروژن حاصل شده است. در نمودارهای مربوط به اثر گلوکز و پیروات نیز مشاهده شد که افزایش غلظت پیروات تا حدود g/L

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

۱۰ موجب افزایش تولید HA می‌شود، در حالی که افزایش بیشتر آن باعث کاهش پاسخ می‌گردد. بیشترین میزان تولید اسید هیالورونیک در محدوده حدود g/L ۶۰ گلوکز و g/L ۱۰ پیروات مشاهده شد.



شکل ۴. نمودارهای سطح پاسخ و کانتور حاصل از طراحی Box–Behnken برای بررسی اثر متقابل فاکتورها بر تولیدHA . A و B) اثر گلوکز و منبع نیتروژن. C و D) اثر K_2HPO_4 و منبع نیتروژن. E و F) اثر گلوکز و پیروات بر تولید اسید هیالورونیک.

بر اساس نتایج حاصل، یک مدل رگرسیون درجه دوم برای پیش‌بینی تولید HA به دست آمد. این مدل رابطه بین متغیرهای مستقل و پاسخ را توصیف می‌کند و شامل اثرات خطی، برهم‌کنش‌ها و اثرات درجه دوم می‌باشد.

معادله ۱. مدل رگرسیون درجه دوم پیش‌بینی تولید HAبر حسب فاکتورهای واقعی:

HA=-961.053+25.02A+63.33B+54.92C+8.81D-0.175AB-0.267AC+0.155AD+1.278BC-

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

$0.083BD+1.033CD-0.192A^2-2.761B^2-8.211C^2-0.904D^2$

که در آن A (غلظت گلوکز)، B (غلظت پیرووات)، C (غلظت K_2HPO4) و D (عصاره مخمر) می‌باشد. به منظور تعیین شرایط بهینه، از ابزار Numerical Optimization در نرم‌افزار Design-Expert استفاده شد. نتایج بهینه‌سازی نشان داد که بیشترین تولید HA در این شرایط حاصل می‌شود: گلوکز (۶۲/۵۷ g/L)، پیرووات (۱۰/۲۰ g/L)، K_2HPO_4 (۳/۸۸ g/L) و عصاره مخمر (۱۱/۹۸ g/L). در این شرایط مقدار پیش‌بینی شده تولید HAتوسط مدل برابر با ۳۰۴ mg/L با مقدار desirability برابر با ۰/۹۸۷ بود که نشان‌دهنده مناسب بودن شرایط بهینه پیشنهادی است. برای ارزیابی صحت مدل، آزمایش تأییدی تحت شرایط بهینه پیش‌بینی شده در سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که میانگین تولید هیالورونیک اسید ۱/۵ mg/L ± ۲۹۶/۳ بوده است که اختلاف بسیار کمی با مقدار پیش‌بینی شده توسط مدل دارد.

رشد باکتری در آزمایش‌های غربالگری و بهینه‌سازی با اندازه‌گیری جذب نوری مورد ارزیابی قرار گرفت (پیوست- جدول ۴ و ۵). نتایج تحلیل واریانس در مرحله غربالگری نشان داد که مدل آماری از معنی‌داری بالایی برخوردار است و ضریب تعیین بالا R^2 برابر با ۰/۹۷ نشان‌دهنده برازش مناسب مدل با داده‌های تجربی بود. با وجود بررسی اثر فاکتورهای مختلف بر رشد باکتری، تمرکز اصلی این مطالعه بر افزایش تولید HA بود. بنابراین در این مطالعه، ارزیابی شرایط بهینه عمدتاً بر اساس میزان تولید HA انجام گرفت.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب جهش‌زایی تصادفی با NTG و UV-C همراه با بهینه‌سازی آماری محیط کشت می‌تواند به‌طور معنی‌داری تولید هیالورونیک اسید در باکتری *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* را افزایش دهد. نکته قابل توجه در این مطالعه این است که افزایش تولید HA (بیش از ۶ برابر) بدون تغییر قابل توجه در الگوی رشد سلولی حاصل شد، که که می‌تواند با تغییر در تخصیص متابولیکی منابع به سمت تولیدHA ، بدون افزایش قابل توجه زیست‌توده، سازگار باشد. این یافته ممکن است ناشی از تغییرات در عوامل تنظیمی یا فعالیت مسیرهای متابولیکی مرتبط با تولید HA باشد؛ با این حال، تعیین سازوکار مولکولی این تغییرات نیازمند مطالعات ژنومی و ترنسکریپتومی است. جهش‌زایی با عوامل آلکیله‌کننده مانند NTG یکی از روش‌های رایج برای بهبود سویه‌های صنعتی محسوب می‌شود. این ترکیب با ایجاد آلکیلاسیون در بازهای DNAبه‌ویژه O^6 متیل گوانین، موجب بروز جهش‌های نقطه‌ای می‌شود که می‌توانند بر بیان ژن‌ها و مسیرهای متابولیکی اثر بگذارند. در مقابل، تابش UV-C عمدتاً با ایجاد آسیب‌هایی مانند دایمرهای پیریمیدینی، مسیر متفاوتی از آسیب DNA را ایجاد می‌کند. بنابراین، استفاده متوالی از NTG و UV-C می‌تواند با ایجاد انواع متفاوتی از آسیب‌هایDNA ، دامنه تنوع جهشی را افزایش داده و با مشارکت مسیرهای ترمیمی مستعد خطا، احتمال تثبیت جهش‌های جدید را افزایش دهد. در مطالعه حاضر، تمامی جمعیت‌های جهش‌یافته ابتدا با NTG تیمار شدند و بخشی از آن‌ها به‌صورت تکمیلی تحت تابش UV-C قرار گرفتند؛ ازاین‌رو، موتانت‌های منتخب می‌توانستند از نظر نوع و ترکیب جهش‌های ایجادشده تنوع بیشتری داشته باشند. مطالعات نشان داده‌اند که چنین جهش‌هایی می‌توانند با تغییر در مسیرهای تنظیمی یا آنزیم‌های کلیدی متابولیسم، منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه یا پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی شوند (۳۰, ۳۱).

برخلاف بسیاری از مطالعات که صرفاً افزایش تولید را گزارش می‌کنند، در این پژوهش تغییرات فنوتیپی (کاهش همولیز و فعالیت هیالورونیداز) نیز هم‌زمان بررسی شد. کاهش فعالیت هیالورونیداز در موتانت منتخب به‌عنوان یک عامل کلیدی در افزایش بازده HA قابل تفسیر است، زیرا این آنزیم مستقیماً در تجزیه پلیمر نقش دارد. بنابراین، کاهش فعالیت آن منجر به افزایش تجمع HA می‌شود. این یافته با مطالعات قبلی هم‌خوانی

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

دارد که نشان داده‌اند مهار یا کاهش بیان هیالورونیداز می‌تواند به‌طور مستقیم بازده نهایی را افزایش دهد (۳۲). علاوه بر این، همانطور که در مطالعات انجام شده در *استرپتوکوکوس پیوژنز* نشان داده شده است، کاهش فعالیت همولیتیک ممکن است ناشی از افزایش ضخامت کپسول HA باشد که می‌تواند دسترسی فاکتورهای ویرولانسی به محیط را محدود کند، بنابراین کاهش همولیز به‌عنوان یک نشانگر اولیه برای غربالگری موتانت‌ها استفاده شد. در استرپتوکوک‌ها، افزایش ضخامت کپسول HA می‌تواند دسترسی استرپتولیزین‌ها به محیط را محدود کرده و موجب کاهش فعالیت همولیتیک قابل مشاهده شود (۳۳). درنتیجه، کاهش همولیز در کنار تغییرات مورفولوژی کلنی به‌عنوان یک معیار اولیه برای انتخاب کاندیداها استفاده شد و افزایش واقعی تولید HA در مرحله بعد به‌صورت کمی اندازه‌گیری و تأیید شد (۳۳).

در سطح متابولیکی، شناسایی گلوکز به‌عنوان عامل کلیدی اولیه کاملاً با مسیرهای بیوسنتزی HA سازگار است. گلوکز پیش‌ساز مستقیم UDP-sugars مورد نیاز برای سنتز HA است، اما وجود یک نقطه بهینه (g/L ۶۰) نشان‌دهنده یک موازنه‌ی متابولیکی است؛ به‌طوری‌که افزایش بیش از حد آن ممکن است با تغییر در توزیع شار کربنی، از جمله افزایش تمایل به مسیرهای تخمیری مانند تولید لاکتات، همراه باشد. این رفتار پیش‌تر نیز در مطالعات متابولیکی گزارش شده است (۲۴, ۳۶-۳۴). در مقابل ، در مرحله بهینه‌سازی با استفاده از روش سطح پاسخ مشخص شد که منبع نیتروژن بیشترین تأثیر را بر پاسخ دارد. این تفاوت احتمالاً ناشی از اثرات متقابل بین منبع نیتروژن و سایر فاکتورها به ویژه گلوکز و K_2HPO_4 است که در مدل درجه دوم آشکار شده‌اند. منابع نیتروژن علاوه بر تأمین اسیدهای آمینه برای رشد سلولی، می‌توانند در تنظیم مسیرهای متابولیکی دخیل در سنتز پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی نقش داشته باشند. در این مطالعه، استفاده از عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن منجر به افزایش قابل توجه تولید HA شد. عصاره مخمر حاوی ترکیبات مغذی متعددی از جمله اسیدهای آمینه آزاد، پپتیدها، ویتامین‌های گروه B و نوکلئوتیدها است که می‌توانند رشد سلولی و فعالیت مسیرهای بیوسنتزی را تقویت کنند. نتایج مشابهی در مطالعات مختلف گزارش شده است که نشان می‌دهند استفاده از عصاره مخمر می‌تواند تولید HA را در *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* افزایش دهد. در کنار منابع کربن و نیتروژن، فسفات نیز یکی از فاکتورهای مهم در محیط کشت محسوب می‌شود. ترکیبات فسفاتی مانند K_2HPO_4 علاوه بر نقش بافری در محیط کشت، در بسیاری از واکنش‌های متابولیکی و تولید ATP نقش دارند. فسفات‌ها همچنین در تنظیم متابولیسم مرکزی سلول و مسیرهای بیوسنتزی دخیل هستند (۲۳, ۳۷). در مطالعه حاضر مشاهده شد که فسفات در تعامل با سایر فاکتورها می‌تواند بر تولید HA تأثیر بگذارد. در فرایند غربالگری و بهینه سازی، قابلیت پیش‌بینی مدل‌ها نیز قابل‌قبول بود؛ اگرچه Predicted R^2در هر دو مدل کمتر از Adjusted R^2 بود، اختلاف بین این دو شاخص در غربالگری وRSM محدود بود. علاوه بر این، نزدیک بودن مقدار تجربی تولید HA در شرایط بهینه mg/L ۲۹۶/۵ به مقدار پیش‌بینی‌شده توسط مدل mg/L ۳۰۴، توان پیش‌بینی مدل RSM را در محدوده شرایط بررسی‌شده به‌صورت تجربی تأیید کرد. تحلیل یکپارچه عوامل (جدول۱) نشان می‌دهد که تولید HA یک پدیده چندعاملی است که تحت تأثیر هم‌زمان محدودیت‌های متابولیکی (مانند شار کربنی)، فیزیولوژیکی و فرایندی قرار دارد. به‌عنوان مثال، عدم همبستگی مستقیم بین رشد و تولید HA تأیید می‌کند که تولید این پلی‌ساکارید صرفاً تابع افزایش رشد سلولی نیست و احتمالاً تحت تأثیر عوامل متابولیکی و فرایندی نیز قرار دارد.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

جدول۱. مقایسه عوامل کلیدی مؤثر بر تولید هیالورونیک اسید در این مطالعه با نتایج گزارش‌شده در مقالات.

عامل	مشاهده در مطالعه حاضر	اثر	تفسیر	منبع
منبع کربن (گلوکز)	اثر مثبت معنی‌دار؛ مقدار بهینه ۶۰ g/L	پیش‌ساز اصلیUDP-sugars؛ مقدار بیش از حد باعث انحراف شار کربنی به سمت اسید لاکتیک می‌شود	گلوکز شار متابولیکی را به سمت بیوسنتز HA هدایت می‌کند؛ نقطه بهینه در مطالعه حاضر با مطالعات قبلی هم‌خوانی دارد	(۲۴, ۳۴)
منبع نیتروژن (عصاره مخمر)	قوی‌ترین عامل در مدلRSM ؛ بیشترین اثر اصلی و تعاملی	تأمین اسیدهای آمینه، ویتامین‌های گروه B و کوفاکتورها	تقویت فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزی HA و تعادل redox سلولی	(۲۳)
فعالیت هیالورونیداز	کاهش قابل توجه در موتانت منتخب	اغلب با مهار یا جهش کاهش می‌یابد تا تجزیه HA کم شود؛ کاهش فعالیت منجر به تجمع بیشتر پلیمر می‌گردد	کاهش تخریب HA منجر به افزایش پایداری و بازده نهایی محصول میشود	(۳۲, ۳۸)
فعالیت همولیتیک	کاهش معنی‌دار در چندین موتانت از جمله کلنی منتخب	به ندرت در مطالعات تولید HA ارزیابی می‌شود؛ کاهش همولیز اغلب با افزایش ضخامت کپسول HA مرتبط است	نشان‌دهنده تغییر در شبکه تنظیمی ویرولانس و تولیدHA	(۳۳)
شرایط فرآیند (pH و دما)	بهینه‌سازی غیرمستقیم از طریقRSM	اثر قوی بر سینتیک آنزیمی و تعادل متابولیکی	RSMتعاملات پیچیده را شناسایی کرد و شرایط بهینه را بدون آزمایش‌های زیاد تعیین نمود	(۳۹)
سیستم کشت	فاکلون (۱۰ میلی‌لیتر)	ویسکوزیته در فالکون محدودیت ایجاد می‌کند	مطالعه حاضر برای screening اولیه مناسب است	(۱۸)
ویسکوزیته	مستقیماً بررسی نشد	یکی از مهم‌ترین گلوگاه‌ها در تولیدHA ؛ افزایش ویسکوزیته انتقال مواد و اکسیژن را مختل می‌کند	عامل احتمالی تفاوت بین مقدار تولید در فلاسک و بیوراکتور؛ کاهش فعالیت هیالورونیداز در مطالعه حاضر به‌طور غیرمستقیم کمک کرده است	(۳۴)
رشد سلولی در مقابل تولیدHA	همبستگی مستقیم مشاهده نشد؛ تولید بیشتر در فاز سکون	پدیده رایج در سیستم‌هایHA ؛ شار متابولیکی بین رشد و تولید محصول ثانویه تقسیم می‌شود	نشان‌دهنده تنظیم متابولیکی موفق به نفع بیوسنتزHA ؛ جهش‌ها مسیر را به سمت تولید هدایت کرده‌اند	(۴۰)

با وجود افزایش قابل توجه تولید، باید توجه داشت که سیستم کشت در این مطالعه در مقیاس فالکون انجام شده است. در چنین شرایطی، ویسکوزیته بالای محیط و محدودیت انتقال اکسیژن می‌توانند به‌عنوان عوامل محدودکننده عمل کنند. بنابراین، اختلاف بین مقدار تولید گزارش‌شده در این مطالعه و مقادیر بالاتر در بیوراکتورها لزوماً ناشی از ضعف سویه نیست، بلکه به محدودیت‌های فرایندی مربوط می‌شود. این موضوع اهمیت انتقال به مقیاس بالاتر و بهینه‌سازی پارامترهایی مانند هوادهی و شیک را نشان می‌دهد .افزایش مقیاس کشت و بهینه‌سازی هوادهی، انتقال اکسیژن و راهبرد تغذیه می‌تواند در مطالعات آتی برای افزایش تولید HA مورد بررسی قرار گیرد. در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیب جهش‌زایی تصادفی با بهینه‌سازی آماری می‌تواند یک راهکار ساده اما قدرتمند برای بهبود تولید HA باشد. افزایش تولید در این مطالعه حاصل اثر

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

همزمان تغییرات ژنتیکی ایجادشده و شرایط بهینه محیط کشت است. در آینده، استفاده از تحلیل‌های ژنومیک و ترنسکریپتومیک می‌تواند به شناسایی دقیق جهش‌های مسئول این تغییرات کمک کند و مسیر را برای مهندسی هدفمندتر هموار سازد.

نتیجه گیری

در این پژوهش با استفاده از روش‌های جهش‌زایی تصادفی، مجموعه‌ای از موتانت‌های *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* ایجاد و از میان آن‌ها سویه‌ای با توانایی بالاتر در تولید هیالورونیک اسید انتخاب شد. نتایج نشان داد که موتانت منتخب در مقایسه با سویه وحشی افزایش قابل توجهی در تولید هیالورونیک اسید نشان می‌دهد، در حالی که الگوی رشد آن تفاوت معنی‌داری با سویه اولیه نداشت. بررسی ویژگی‌های فنوتیپی نیز نشان داد که برخی فاکتورهای مرتبط با ویرولانس از جمله فعالیت همولیتیک و هیالورونیدازی در موتانت‌ها دچار تغییر شده است که می‌تواند ناشی از تغییر در مسیرهای تنظیمی مرتبط با سنتز کپسول هیالورونانی باشد.

همچنین نتایج غربالگری فاکتورهای محیط کشت نشان داد که ترکیباتی مانند گلوکز و منبع نیتروژن از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تولید هیالورونیک اسید هستند. در ادامه، بهینه‌سازی شرایط کشت با استفاده از روش سطح پاسخ منجر به تعیین شرایط بهینه برای افزایش تولید این پلی‌ساکارید شد. نتایج بهینه‌سازی نشان داد که تنظیم مناسب ترکیب محیط کشت می‌تواند با هدایت شار متابولیکی به سمت مسیر بیوسنتز هیالورونیک اسید، میزان تولید آن را به طور قابل توجهی افزایش دهد. در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیب روش جهش‌زایی تصادفی با بهینه‌سازی آماری محیط کشت می‌تواند راهکاری مؤثر برای افزایش تولید هیالورونیک اسید توسط این باکتری باشد.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام شد. نویسندگان از حمایت‌های علمی و فراهم‌سازی امکانات آزمایشگاهی توسط این پژوهشگاه صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

فهرست منابع

.۱ Cheng F, Gong Q, Yu H, Stephanopoulos G. High-titer biosynthesis of hyaluronic acid by recombinant Corynebacterium glutamicum. Biotechnology journal. 2016;11(4):574-84.

.۲ Borschiver S, Vasconcelos RC, Silva FC, Freitas GC, Santos PE, do Bomfim RO. Technology roadmap for hyaluronic acid and its derivatives market. Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 2019;13(3):435-44.

.۳ Selyanin MA, Boykov PY, Khabarov VN, Polyak F. The history of hyaluronic acid discovery, foundational research and initial use. Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine. 2015:1-8.

.۴ Cerminati S, Leroux M, Anselmi P, Peirú S, Alonso JC, Priem B, et al. Low cost and sustainable hyaluronic acid production in a manufacturing platform based on Bacillus subtilis 3NA strain. Applied Microbiology and Biotechnology. 2021;105(8):3075-86.

.۵ Beres SB, Sesso R, Pinto SW, Hoe NP, Porcella SF, Deleo FR, et al. Genome sequence of a Lancefield group C Streptococcus zooepidemicus strain causing epidemic nephritis: new information about an old disease. PLoS One. 2008;3(8):e3026.

.۶ Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clinical microbiology reviews. 2002;15(4):613-30.

.۷ Malke H. Genetics and pathogenicity factors of group C and G Streptococci. Gram-Positive Pathogens. 2019:239-63.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰ DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

.۸ Xu B, Pei X, Su Y, Ma Z, Fan H. Capsule of Streptococcus equi subsp. zooepidemicus hampers the adherence and invasion of epithelial and endothelial cells and is attenuated during internalization. FEMS Microbiology Letters. 2016;363.(۱۶)

.۹ Lindahl SB, editor Streptococcus equi subsp. equi and Streptococcus equi subsp. zooepidemicus2013.

.۱۰ Schroeder EL. Investigating respiratory disease outbreaks. Robinson's Current Therapy in Equine Medicine: Elsevier; 2015. p. 207-12.

.۱۱ Xiong Z, Li W, Xie F, Zhang H, Song X, Wang G, et al. Biochemical characterization of hasB, a UDP-glucose dehydrogenase from the hyaluronic acid high-yield producer Streptococcus zooepidemicus CR003. Process Biochemistry. 2024;147:75-85.

.۱۲ Zhao R, Li J, Li Y, Pei X, Di J, Xie Z, et al. Inducible engineering precursor metabolic flux for synthesizing hyaluronic acid of customized molecular weight in Streptococcus zooepidemicus. Microbial Cell Factories. 20.۲۴:(۱)۲۴;۲۵

.۱۳ Zhang X, Duan X-J, Tan W-S. Mechanism for the effect of agitation on the molecular weight of hyaluronic acid produced by Streptococcus zooepidemicus. Food chemistry. 2010;119(4):1643-6.

.۱۴ Rowlands R. Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. Enzyme and microbial technology. 1984;6(1):3-10.

.۱۵ Patnaik R. Engineering complex phenotypes in industrial strains. Biotechnology Progress. 2008;24(1):38-47.

.۱۶ Proctor LD, Warr AJ. Development of a Continuous Process for the Industrial Generation of Diazomethane1. Organic process research & development. 2002;6(6):884-92.

.۱۷ Dawes IW, Carter BL. Nitrosoguanidine mutagenesis during nuclear and mitochondrial gene replication. Nature. 1974;250(5469):709-12.

.۱۸ Zhang RH, Feng JC, editors. Compound Mutation Breeding of Streptococcus equi JC-63 for Producing High Molecular Weight Hyaluronic Acid and Optimization of Culture Conditions. Key Engineering Materials; 2016: Trans Tech Publ.

.۱۹ Luna-Flores CH, Wang A, von Hellens J, Speight RE. Towards commercial levels of astaxanthin production in Phaffia rhodozyma. Journal of Biotechnology. 2022;350:42-54.

.۲۰ Chauhan S, Jaiswal V, Attri C, Seth A. Random mutagenesis of thermophilic xylanase for enhanced stability and efficiency validated through molecular docking. Recent Patents on Biotechnology. 2020;14(1):5-15.

.۲۱ Arora N, Yen H-W, Philippidis GP. Harnessing the power of mutagenesis and adaptive laboratory evolution for high lipid production by oleaginous microalgae and yeasts. Sustainability. 2020;12(12):5125.

.۲۲ Shiedlin A, Bigelow R, Christopher W, Arbabi S, Yang L, Maier RV, et al. Evaluation of Hyaluronan from Different Sources: Streptococcus z ooepidemicus, Rooster Comb, Bovine Vitreous, and Human Umbilical Cord. Biomacromolecules. 2004;5(6):2122-7.

.۲۳ Samadi M, Khodabandeh Shahraky M, Tabandeh F, Aminzadeh S, Dina M. Enhanced hyaluronic acid production in Streptococcus zooepidemicus by an optimized culture medium containing hyaluronidase inhibitor. Preparative biochemistry & biotechnology. 2022;52(4):413-23.

.۲۴ Zhang Y, Dong J, Xu G, Han R, Zhou J, Ni Y. Efficient production of hyaluronic acid by Streptococcus zooepidemicus using two-stage semi-continuous fermentation. Bioresource Technology. 2023;377:128896.

.۲۵ Arslan NP, Aydogan MN. Evaluation of sheep wool protein hydrolysate and molasses as low-cost fermentation substrates for hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246. Waste and Biomass Valorization. 2021;12:925-35.

.۲۶ Amado IR, Vázquez JA, Pastrana L, Teixeira JA. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

Streptococcus zooepidemicus. Food chemistry. 2016;198:54-61.

.۲۷ Baş D, Boyacı İH. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. Journal of food engineering. 2007;78(3):836-45.

.۲۸ Patil S, Chaudhari B. A simple, rapid and sensitive plate assay for detection of microbial hyaluronidase activity. Journal of Basic Microbiology. 2017;57(4):358-61.

.۲۹ Oueslati N, Leblanc P, Harscoat-Schiavo C, Rondags E, Meunier S, Kapel R, et al. CTAB turbidimetric method for assaying hyaluronic acid in complex environments and under cross-linked form. Carbohydrate polymers. 2014;112:102-8.

.۳۰ Morita R, Nakane S, Shimada A, Inoue M ,Iino H, Wakamatsu T, et al. Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. Journal of nucleic acids. 2010;2010.

.۳۱ Shrivastav N, Li D, Essigmann JM. Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. Carcinogenesis. 2010;31(1):59-70.

.۳۲ Lu J, Zhu Y, Sun H, Liang S, Leng F, Li H. Highly efficient production of hyaluronic acid by Streptococcus zooepidemicus R42 derived from heterologous expression of bacterial haemoglobin and mutant selection. Letters in applied microbiology. 2016;62(4):316-22.

.۳۳ Wessels MR. Capsular polysaccharide of group A Streptococcus. Microbiology spectrum. 2019;7(1):10.1128/microbiolspec. gpp3-0050-2018.

.۳۴ Chong BF, Nielsen LK. Amplifying the cellular reduction potential of Streptococcus zooepidemicus. Journal of biotechnology. 2003;100(1):33-41.

.۳۵ Sunguroğlu C, Sezgin DE, Aytar Çelik P, Çabuk A. Higher titer hyaluronic acid production in recombinant Lactococcus lactis. Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2018;48(8):734-42.

.۳۶ Mao Z, Shin H-D, Chen R. A recombinant E. coli bioprocess for hyaluronan synthesis. Applied microbiology and biotechnology. 2009;84(1):63-9.

.۳۷ Chahuki FF, Aminzadeh S, Jafarian V, Tabandeh F, Khodabandeh M. Hyaluronic acid production enhancement via genetically modification and culture medium optimization in Lactobacillus acidophilus. International journal of biological macromolecules. 2019;121:870-81.

.۳۸ Kang C-L, Zheng D-Q, Yao Z-Y, Yang K, Zhao Y, Mao Z, et al. Hyaluronidases improve the hyaluronic acid yield during the fermentation of Streptococcus zooepidemicus. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2025;13:1625009.

.۳۹ Zakeri A, Rasaee MJ. Identification of wild type Streptococcus zooepidemicus and optimization of culture medium and fermentation conditions for production of hyaluronic acid. Biosciences Biotechnology Research Asia. 2016;13(1):189-98.

.۴۰ de Oliveira JD, Carvalho LS, Gomes AMV, Queiroz LR, Magalhães BS, Parachin NS. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. Microbial cell factories. 2016;15(1):119.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۷۳-۲۹۰
DOI :10.22034/cmr.2026.8779.3347

Improvement of Hyaluronic Acid Production in *Streptococcus zooepidemicus* Using Random Mutagenesis and Statistical Optimization of Culture Medium

Fatemeh Velayatipour, Saeed Aminzadeh*

Department of Bioprocess Engineering, Industrial and Environmental Research Institute, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

**Corresponding Author Email: aminzadeh.saeed@yahoo.com*

Abstract

Hyaluronic acid (HA) is a valuable biopolymer widely used in pharmaceutical, medical, and cosmetic industries. In this study, random mutagenesis using N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) and ultraviolet (UV) irradiation was applied to enhance HA production by *Streptococcus zooepidemicus*, followed by phenotypic screening of mutant strains. The superior mutant was selected based on reduced hemolytic and hyaluronidase activities along with increased colony mucoidity.

Subsequently, the effects of different nitrogen sources on HA production were investigated, and yeast extract was identified as the most effective among the tested sources. Further optimization of culture conditions was carried out using factorial design and response surface methodology (RSM), focusing on key variables including glucose, pyruvate, phosphate, and nitrogen source.

Under the optimized conditions predicted by the model, HA production reached approximately 304 mg/L, while experimental validation yielded 296 mg/L, representing about a 6.3-fold increase compared to the wild-type strain.

Overall, the results demonstrate that the combination of random mutagenesis and statistical medium optimization is an effective strategy for improving HA production at the laboratory scale.

Keywords: Hyaluronic acid, NTG, Random Mutagenesis, RSM, *Streptococcus zooepidemicus*