بررسی تأثیر افزایش رقت بر زمان اختلاط و تولید پلیمر زیستی اسید هیالورونیک

**نویسندگان: سعید سحرخیز، ولی­الله بابائی پور\***

[تهران، دانشگاه صنعتی مالک اشتر](http://www.mut.ac.ir/)، دانشکده شیمی و مهندسی شیمی

پست الکترونیکی:vbabaeipour@mut.ac.ir

چکیده

اسید هیالورونیک بعنوان یک فراورده‌ی زیستی با ارزش افزوده‌ی بالا یکی از پرکاربردترین پلیمرهای زیستی در صنعت و پزشکی هست. تولید میکروبی پلیمرهای زیستی به طور معمول همراه با گرانروي بالا است، بنابراين اختلاط و اکسیژن­رسانی مناسب نقش مهمی در تولید آن دارد. زمان اختلاط يک پارامتر قابل مقايسه براي بررسي بازده سامانه هاي اختلاط مي باشد. به دلیل ماهیت سویه *استرپتوکوک* در تولید بالای اسید لاکتیک و در نتیجه مصرف بالای سود خصوصا در انتهای فاز تولید که با افزایش گرانروی و کاهش اختلاط همراه است، باعث تجمع نقطه­ای سود تزریقی و از بین رفتن سلول­ها و کاهش کمیت و کیفیت محصول تولیدی می­شود. یکی از مشخصه­های مهم هیدرودینامیکی در ارتباط با طراحی یک اختلاط بهینه زمان اختلاط می­باشد که در اين پژوهش اثر افزایش رقت سود مصرفی بر زمان اختلاط و افزایش تولید اسید هیالورونیک در يک فرمنتور 2 لیتری دارای پره راشتون و شرایط کشت فدبچ مورد مطالعه قرار گرفته است. افزایش رقت باعث کاهش زمان اختلاط و افزایش میزان محصول نهايی از 6/6 به 4/8 گرم شد.

کلید واژگان: اسید هیالورونیک، زمان اختلاط، گرانروی، افزایش تولید

مقدمه

هیالورونیک اسید بعنوان یک فراورده‌ی زیستی با ارزش افزوده‌ی بالا یکی از پرکاربردترین پلیمرهای زیستی در صنعت و پزشکی هست. هیالورونيك اسيد که در برخي متون به اختصار هیال[[1]](#footnote-1) هم ناميده می­شود، يك پلي ساكاريد غير منشعب (خطي) است كه ترکیبی تکرار شونده از زير واحدهاي هترو دي­ ساكاريدي گلوکورونیک اسید[[2]](#footnote-2) (GlcUA) و ان استیل گلوکزآمین[[3]](#footnote-3) است که با پیوندهای قندی بتا 1و3 و بتا 1و4 به هم متصل می­شود و وزن مولکولی آن از 104 تا 107 Da[[4]](#footnote-4) متغیر است و دارای خواص وسیکوالاستیک جالب توجه تحت تأثیر ویژگی­های پلیمری و پلی الکترولیت آن است و می­تواند تا 1000 برابر حجم خود، آب جذب کند.در بدن انسان هیالورونیک اسید بصورت نمک هیالورونات و با غلظت بالا در پوست، بند ناف و مايع زجاجیه يافت می­شود([[5]](#endnote-1)). این اسید در طب بالینی به عنوان مارکر تشخیصی بسیاری از بیماری­ها از جمله سرطان، آرتروز روماتیسمی و پاتولوژی کبد و هم چنین در بیماران آرتروزی به وسیلۀ ترزیقات درون مفصلی استفاده می­گردد. به طور کلی دو روش استخراج از منشأ حیوانی و تخمیر باکتريايی برای تولید هیالورونیک اسید وجود دارد. هیالورونیک اسید بطور موفقیت آمیزی در مقیاس صنعتی توسط باکتری *استرپتوکوکوس زواپیدموکوس* تولید می­شود.

محلول­های حاوی هیالورونیک اسید دارای خاصیت ویسکوالاستیک بوده و اساس رفتار آنها مبتنی بر رفتار محلول­های غیر ایده­آل است. به مایعات یا محلول­هایی که در یک زمان خاصیت کشسانی و گرانروی را با هم دارند، محلول­های ویسکوالاستیک[[6]](#footnote-5) گفته می­­شود که این خاصیت ویژه اغلب پلیمرها است. هنگامی که نیروی کششی بر روی یک پلیمر اعمال می­گردد این نیرو جذب شده و در مقابل، پلیمر هم تحت تاثیر این نیرو تغییر شکل می­دهد. ویژگی دیگر مواد ویسوالاستیک این است که وقتی تنش برشی حذف می­گردد کرنش به سرعت به صفر کاهش پیدا می­کند. اغلب سیالات ویسکوالاستیک رقیق شونده با برش نیز هستند. گرانروي بالای محلول هیالورونیک اسید در محیط کشت، موجب می­شود تا غلظت تولید در فرمنتاسیون تا 7-5 گرم در لیتر و وزن مولکولی آن محدود شود. هوادهی يک پارامتر مهم در تغییر بازده و وزن مولکولی بیوپلیمر هیالورونیک اسید است. با توجه به اينکه تولید میکروبی هیالورونیک اسید به طور معمول در شرايط گرانروي بالا است، بنابراين همزدن و اکسیژن­دهی با ايجاد محیطی هموژن و رساندن اکسیژن به تمام محیط در تولید آن نقش مهمی دارد. مطالعات بررسی اثرات سرعت همزدن، سرعت هوادهی و اکسیژن حل شده در باکتری­های تولید کننده HA نشان داده است که در محیط کشت هوازی نسبت به بی­هوازی، میزان تولید و وزن مولکولی اين ماده بیشتر بوده است ([[7]](#endnote-2)،[[8]](#endnote-3)،[[9]](#endnote-4)،[[10]](#endnote-5)). در مطالعه­ای میزان اکسیژن محلول را در سطوح مختلف ثابت نگه داشته و مشخص شده که با افزایش از %50-0 اکسیژن، وزن مولکولی محصول تا 90% می­تواند افزایش داشته باشد. افزایش بیشتر اکسیژن منجر به کاهش وزن مولکولی می­شود([[11]](#endnote-6)). کاهش انتقال جرم و اختلاط در فرایندهای با گرانروی بالا به دلایل زیر می­باشد([[12]](#endnote-7)): 1- کاهش انتقال جرم به دلیل کاهش توربولنسی 2- تشکیل حباب­های بزرگتر و کاهش سطح تماس ویژه 3- سرعت به هم چسبیدن حباب­ها بیشتر و حباب سریع­تر به حجم نهایی خود می­رسد 4- سرعت بالای همزن به دلیل گرمای زیاد تولید شده کاهش می­یابد 5- وجود حباب­های کوچک با محتوای اکسیژن کم و زمان اقامت زیاد 6- نفوذ مولکولی کاهش و ضخامت لایه مرزی بین گاز و مایع افزایش می­یابد .

گرانروی بالای محیط باعث محدودیت انتقال اکسیژن و کاهش محصول می­شود. یکی از روش­هایی که می­توان این محدودیت را برطرف نمود، کاهش گرانروی با روش­های شیمیایی و فیزیکی است. در یک تحقیق تاثیر پراکسید هیدروژن و اسکوربات به عنوان عواملی که باعث کاهش وزن مولکولی HA و در نتیجه کاهش گرانروی می­شوند بررسی شده است. پس از اضافه نمودن این مواد در مرحله رشد سلولی، وزن مولکولی از kDa1300 به kDa80 کاهش پیدا کرد و تولید محصول از 5 به 5/6 گرم افزایش یافت. اکسیژن محلول نیز از 1% هوای اشباع به 10% افزایش یافت که نشان دهنده تاثیر کاهش گرانروی محیط بر میزان اکسیژن محلول است([[13]](#endnote-8)). در مطالعه­ای دیگر اثر آنزیم هیالورونیداز که منجر به شکستن پلیمر HA می­شود بررسی شده که نتایج، روندی مشابه با مطالعه اخیر داشته است([[14]](#endnote-9)). کاهش وزن مولکولی سبب کاهش ارزش محصول می­شود که از معایب استفاده از این روش­ها است.

افزایش همزدگی و اکسیژن منجر به افزایش تولید برخی از پلي­ساكاريدهای برون­سلولی شده است. افزایش تولید HA و ژلان نمونه­هایی از این محصولات می­باشد. افزایش بیش از حد همزدن نیز باعث کاهش وزن مولکولی پلیمر و از بین رفتن سلول می­شود. به عنوان مثال افزایش سرعت همزن باعث کاهش وزن مولکولی آلژینات تولیدی شده و تولید زانتان بر اثر تخریب سلول کاهش پیدا کرده است([[15]](#endnote-10)). در مطالعه­ای تاثیر سرعت همزن بر تولید و وزن مولکولی HA بررسی و مشخص شد که با افزایش بیش از حد دور همزن، به دلیل تنش وارد شده به سلول و پلیمر HA، میزان محصول و وزن مولکولی آن کاهش پیدا کرده است و با کاهش دور همزن نیز به دلیل کمبود اکسیژن و عدم یکنواختی محیط، با همان نتایج مشابه افزایش بیش از حد سرعت همزن مواجه شده است([[16]](#endnote-11)).

در بیشتر تحقیقات صورت گرفته برای کنترل pH از سود 5 مولار استفاده می­شود که به دلیل ماهیت سویه *استرپتوکوک* و تولید بالای اسید لاکتیک و در نتیجه مصرف بالای سود بویژه در انتهای فاز تولید که با افزایش گرانروی و کاهش اختلاط مواجه می­باشیم، باعث تجمع نقطه­ای سود تزریقی و کاهش کمیت و کیفیت محصول تولیدی و از بین رفتن سلول­ها می­شود. لذا در این تحقیق برای جلوگیری از ایجاد این مشکل و رفع کاهش اختلاط، از غلظت­های کمتر سود استفاده شد تا ضمن افزایش رقت محیط کشت، اثر آن روی کاهش زمان اختلاط و مقدار تولید مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش­ها

سویه *استرپتوکوکوس زو اپیدمیکوس* موتاسیون شده در این مرکز به عنوان سویه تولید کننده HA استفاده شد. کشت در واکنشگاه( فرمنتور) 2 لیتری شرکت B.Braun مدل Biostat.B، دارای دو پره راشتون 6 تیغه و نسبت قطر پره به قطر مخزن5/0 انجام شد. ترکیب محیط کشت شامل کازئین هیدرولیز شده 20، عصاره مخمر 20، گلوکز اولیه 30، کلرید سدیم 5/1 و سولفات منیزیم 6/0 گرم در لیتر است. مایه تلقیح از محیط کشت تهیه و به میزان 5% با 1-5/0OD600= اضافه شد. 100میلی لیتر گلوکز 30% نیز به صورت تدریجی از میانه فاز رشد به محیط خوراک­دهی شد.pH محیط در حین کشت با غلظت­های مختلف سود برابر 7 ثابت و دما C⸰37 تنظیم شد. حداقل میزان اکسیژن به میزان 5% با مقادیر مختلف هوادهی در حین کشت تنظیم شد. سود با غلظت­های 5، 2 و 5/0 مولار برای تنظیم pH استفاده شد و هر آزمایش با 2 بار تکرار با هر غلظت انجام شد.

روش­های سنجش

*برای بررسی مقدار* HA *تولید شده (بازدهی) از روش کربازول[[17]](#footnote-6) استفاده گردید. اصول این روش سنجش مقدار گلوکورونیک اسید موجود در ساختار* HA *می­باشد. در این روش ابتدا محلول حاوی* HA در اسید سولفوریک غلیظ جوشانده می­شود. این امر منجر به شکسته شدن HA به اجزای کوچک­تر می­گردد *و سپس معرف کربازول به محیط اضافه می­گردد. این معرف به واحدهای گلوکورونیک اسید متصل شده و در اثر حرارت رنگ تولید می­کند و شدت این رنگ به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شده و در مقایسه با استاندارد گلوکورونیک اسید، مقادیر غلظت­های حاوی* HA *به دست می­آید. جزییات دقیق روش سنجش در مقاله ذاکری و همکاران ذکر شده است([[18]](#endnote-12)).* سنجش گرانروی با ویسکومتر بروکفیلد مدل RVDV-II+Pro انجام شد. زمان رسیدن به 95% اختلاط کامل از شروع تزریق 1-5/0 میلی لیتر سود نیز به عنوان زمان اختلاط در نظر گرفته شد(زمان ثابت شدن پاسخ سنسور pH به تغییرات).

نتایج و بحث

شکل1 تغییرات زمانی زمان اختلاط در غلظت­های مختلف سود را نمایش می­دهد. با توجه به اختلاط و انتقال جرم بهتر در رقت­های بالاتر، زمان اختلاط نیز کاهش پیدا کرده است. با نزدیک شدن به انتهای فاز تولید شاهد کاهش تدریجی زمان اختلاط به دلیل شرایط ناهمگن محیطی از نظر انتقال جرم مواد غذایی و اکسیژن در دسترس سلول و کاهش وزن مولکولی اسید هیالورونیک تولیدی در اثر تنش­های محیطی مانند همزن و تولید آنزیم هیالورونیداز هستیم.

|  |
| --- |
|  |
| شکل 1. تغییرات زمان اختلاط با زمان در غلظت­های مختلف سود: (M)5/0 لوزی، (M)2 مربع، (M)5 مثلث |

شکل 2 تغییرات گرانروی محصول نهایی را در غلظت­های مختلف سود نمایش می­دهد. همان طور که پیش بینی شده بود، با کاهش رقت سود، گرانروی محیط افزایش می­یابد که در نتیجه با کاهش میزان اختلاط و انتقال جرم، میزان محصول نهایی کاهش یافته و به دلیل ایجاد شرایط بی­هوازی، بیشتر انرژی سلول صرف تولید اسید لاکتیک می­شود. کاهش مقدار سود مصرفی در شکل 3 نیز درستی این مطلب را نمایش می­دهد. کاهش مقدار سود مصرفی در رقت­های بیشتر نشانگر این موضوع است که متابولیزم سلول بیشتر صرف تولید اسید هیالورونیک شده است تا اسید لاکتیک. این افزایش محصول به دلیل اختلاط بهتر سیال و انتقال جرم بهتر مواد غذایی و اکسیژن است.

|  |
| --- |
|  |
| شکل2. تغییرات گرانروی با افزایش غلظت سود |

|  |
| --- |
|  |
| شکل 3. تغییرات حجمی و وزنی سود مصرفی (g)(●)، سود مصرفی (ml)(­­­○) |

تأثیر افزایش رقت سود بر میزان بازدهی و محصول نهایی در شکل4 نمایش داده شده است. نتایج بیانگر این موضوع است که با کاهش غلظت سود، بازدهی اسید هیالورونیک کاهش پیدا کرده است، ولی بدلیل افزایش حجم نهایی با افزایش رقت سود، مقدار پایانی محصول افزایش پیدا کرده است.

|  |
| --- |
|  |
| شکل4. اثر غلظت سود (مورداستفاده در کنترل pH) روی مقدار نهایی (○) و بازدهی اسید هیالورونیک (●) |

زمان اختلاط یک متغیر قابل مقایسه برای بررسی روش اختلاط است. استفاده از سود با رقت بیشتر روشی ساده، ارزان و کاربردی است که در تولید میکروبی پلی­ساکاریدهای خارج سلولی می­تواند باعث کاهش زمان اختلاط و افزایش تولید گردد. بالاترین عدد گزارش شده در تولید اسید هیالورونیک (g/l) 7-6 بوده که با کاربرد این روش می­توان به رقم­های بالاتر از 8 گرم محصول نهایی دست یافت. از مزایای این روش می­توان به کاهش کمتر تخریب محصول و سلول در اثر تجمع نقطه­ای سود در هنگام تزریق و عدم نیاز به کنترل اتوماتیک میزان رقت در حین تخمیر اشاره نمود. نکته دیگری که قابل ذکر است این است که بر خلاف بیشتر محصولات زیستی همانند پروتئین­ها که غلظت بیشتر محصول در فرایند تخلیص مطلوب است، ­به دلیل گرانروی بالای HA، در مراحل تخلیص نیاز به رقیق­سازی آن لازم است که با این روش مرتفع می­گردد.

مراجع

1. . Hyal [↑](#footnote-ref-1)
2. . Glucuronic acid [↑](#footnote-ref-2)
3. . N-Acetyl glucosamine [↑](#footnote-ref-3)
4. . Dalton [↑](#footnote-ref-4)
5. [] Kogan G, Soltes L, Stern R, Gemeiner R. (2007). Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 29:17- 25. [↑](#endnote-ref-1)
6. . viscoelastic [↑](#footnote-ref-5)
7. [] Liu L, Du GC, Chen J, Wang M, Sun J. (2009). “Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*”.  *Journal Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32:755-763. [↑](#endnote-ref-2)
8. [] Huang WC, Chen SJ, Chen TL. (2006). “The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation”. *Biochemical Engineering Journal*, 32:239-243. [↑](#endnote-ref-3)
9. [] Chong FB, Nielsen LK. (2003). “Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase”. *Biochemical Engineering Journal*, 16:153-162. [↑](#endnote-ref-4)
10. [] Duan, X, Niu, Tan.w, and Xu Zhang. (2009). “Mechanism Analysis of Effect of Oxygen on Molecular Weight of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*”. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(3): 299–306. [↑](#endnote-ref-5)
11. [] Duan XJ, Yang L, Zhang X, Tan WS, Effect of oxygen and shear stress on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Microbiology* and *Biotechnology*. (2008) 18:718-724. [↑](#endnote-ref-6)
12. [] Schügerl, K. Oxygen transfer into highly viscous media, Springer, Berlin, Heidelberg.‏ p. 71-74. (1981). [↑](#endnote-ref-7)
13. [] Long L, Guocheng D, Jian C, Yang Z, Miao W, Jun S. (2009). “Microbial production of low molecular weight hyaluronic acid by adding hydrogen peroxide and ascorbate in batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*”. *Bioresource Technology*, 100 362–367. [↑](#endnote-ref-8)
14. [] Long L, Guocheng D, Jian C, Miao W, Jun S. (2008). “Inﬂuence of hyaluronidase addition on the production of hyaluronic acid by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*”. *Food Chemistry*, 110 923–926. [↑](#endnote-ref-9)
15. [] Freitas, F., Torres, C. A., & Reis, M. A. (2017). “Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production”. *Bioresource technology*, 245, 1674-1683.‏ [↑](#endnote-ref-10)
16. [] Duan XJ, Yang L, Zhang X, Tan WS. (2008). “Effect of oxygen and shear stress on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*”. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18:718-724. [↑](#endnote-ref-11)
17. carbazole [↑](#footnote-ref-6)
18. [] Zakeri A, Rasaee MJ, Pourzardosht N. (2017). “Enhanced hyluronic acid production in *Streptococcus Zooepidemicus* by over expressing HasA and molecular weight control with Niscin and glucose”. *Biotechnology reports.*

    [↑](#endnote-ref-12)