مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره پنجم ـ شماره سوم ـ پاییز ۹۰
صفحات ۳۸ الی ٤٤

مقاله پژوهشی
(Original Article)

اثر ترکیبات محیط کشت بر تولید آنزیم هیالورونیداز توسط جدایه باسیلوس

فاطمه زهراب[۱]، احمدعلی پورابایی[۲]، محمدحسین عبدالمحمدی[۳]، محمد سلیمانی درجاق[٤]، محمدرضا زند[٥]

[۱]کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.
[۲]دانشیار میکروب‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۳]استادیار بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.
[٤]استادیار میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.
[٥]کارشناس ارشد شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: امروزه آنزیم هیالورونیداز در پزشکی، داروسازی، مهندسی بافت، انکولوژی و چشم‌پزشکی کاربرد گسترده‌ای دارد. اهمیت درمانی هیالورونیداز براساس شکست هیالورونان در بافت‌ها می‌باشد که موجب افزایش نفوذپذیری غشا، کاهش ویسکوزیته و تسهیل انتشار مایعات تزریق‌شده می‌شود. هیالورونیداز به‌عنوان ماده جانبی، جذب و انتشار داروهای تزریقی مثل آنتی‌بیوتیک‌ها را تسریع و افزایش می‌دهد، و کارآیی بیهوشی‌های موضعی را بهبود می‌بخشد. امروزه تولید این آنزیم توسط میکروارگانیسم‌ها مورد توجه قرار گرفته است. نظر به اینکه محیط کشت BHI براث محیط گران‌قیمتی است و نمی‌تواند به‌عنوان یک محیط کشت با صرفه از نظر اقتصادی، برای تولید صنعتی آنزیم هیالورونیداز توسط میکروب‌ها به کار رود؛ لذا در این مطالعه تلاش گردید تا محیط کشت سنتزی طراحی شود که تولید آنزیم را در حد محیط BHI براث (۷/۴Unit/ml) داشته باشد و ضمناً از لحاظ اقتصادی نیز مقرون به صرفه باشد.

روش بررسی: در این تحقیق از جدایه G8 جداشده از خاک بهشت زهرای تهران به‌عنوان سویه بومی تولیدکننده آنزیم هیالورونیداز استفاده شد. این جدایه نوعی باسیل اسپوردار هوازی است. در بررسی انجام‌شده علاوه بر تعیین نوع ترکیبات محیط کشت، میزان غلظت آنها نیز در محیط کشت سنتزی توسط طراحی تاگوچی به دست آمد. سنجش میزان تولید آنزیم به کمک روش کربازول صورت گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه، تولید آنزیم توسط جدایه G8، با استفاده از طراحی تاگوچی در محیط کشت حاوی فروکتوز ۵g/l، عصاره مخمر ۱۵g/l، کلرید آمونیوم ۱۰g/l همراه با دور شیکر ۲۵۰rpm صورت گرفت. میزان تولید آنزیم در این شرایط ۸/۰۴unit/ml گزارش گردید که میزان قابل توجهی است.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌تواند جهت طراحی محیط‌های کشت صنعتی و تعیین شرایط فیزیکوشیمیایی محیط کشت نظیر میزان هوادهی برای تولید بهینه آنزیم هیالورونیداز توسط جدایه G8 به کار رود.

کلید واژه‌ها: هیالورونوگلوکوزآمینالاز؛ هیالورونیک اسید؛ روش کربازول؛ طراحی تا گوچی؛ باسیل‌ها.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران؛
آدرس پست الکترونیکی: fatemezohrab@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۳

مقدمه

برای اولین بار در سال ۱۹۲۸، F-Durans-Reynol در غشای پلاسمایی اسپرماتوزوئید، فاکتور پخش‌کننده عوامل ویروسی را به‌نام فاکتور Duran-Reynol معرفی نمود (۱). در سال ۱۹۳۶، ماده‌ای در اثر فعالیت پنوموکوک‌ها کشف گردید که با تجزیه هیالورونان بافت پیوندی موجب کاهش ویسکوزیته بافتی شد و این ماده به‌واسطه تجزیه هیالورونان، هیالورونیداز نام گرفت که از لحاظ فیزیکوشیمیایی با فاکتور Duran-Reynol یکسان بود. همچنین در سال ۱۹۹۵، پاتوژنز قارچ‌های جنس کاندیدا به تولید آنزیم هیالورونیداز ارتباط داده شد که در باکتری‌های مولد هیالورونیداز، این آنزیم فاکتور ویرولانس به حساب می‌آید و گسترش باکتری‌ها در بافت‌های میزبان را به‌وسیله تجزیه هیالورونان تسهیل می‌کند (۲). به دلیل ویژگی‌های عملکردی این آنزیم، امروزه استفاده از آن در صنایع دارویی اهمیت زیادی پیدا کرده است و داروهایی مانند هیالاز (Hyalase)، نئوپرمئاز (Neopermease)، ویداز (Wydase)، ویتراز (Vitrase)، با ترکیب هیالورونیداز در بازارهای دارویی کشورها وارد شده (۳) که منشأ آنها هیالورونیداز تستیکولار گاوی (BTH) می‌باشد (۴). مهم‌ترین کاربرد آنزیم هیالورونیداز در جراحی قرنیه است که برای رساندن داروهای بی‌حس‌کننده به بافت، مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵). در شیمی‌درمانی نیز زمانی‌که سلول‌های سرطانی مقاومت نشان می‌دهند؛ آنها را با هیالورونیداز حساس کرده و به کمک این آنزیم قدرت نفوذ دارو را به بافت هدف افزایش می‌دهند و علاوه بر این با تجزیه هیالورونیک اسید موجود در اطراف توده سرطانی، ادم بافت سرطانی کاهش یافته و بدین‌ترتیب حرکت دارو برای اثر بر بافت سرطانی سریع‌تر می‌شود (۱). اگرچه منابع تولیدکننده هیالورونیداز متنوع بوده و می‌توان این آنزیم را از منابع حیوانی تهیه نمود؛ اما به دلایل متعددی از جمله مسئله خالص‌سازی آنزیم و احتمال آلودگی آن، و پرهزینه بودن تهیه آنزیم هیالورونیداز از منابع حیوانی، امروزه منابع میکروبی به دلیل تکثیر سریع، دسترسی آسان و دستکاری‌های ژنتیکی، نسبت به منابع حیوانی بیشتر مورد توجه‌اند. انواع میکروب‌ها شامل قارچ‌ها، استرپتوکوکوس‌ها و حتی برخی باکتریوفاژها قادر به تولید هیالورونیداز می‌باشند. امروزه استرپتوکوکوس هیالورورلیتیکوس به‌عنوان یک سویه تجاری مولد آنزیم، استفاده می‌شود. جدایه G8 جداشده از خاک بهشت زهرای تهران نیز سویه تولیدکننده آنزیم بوده و به گروه باسیلوس‌ها تعلق دارد (۳). نظر به اینکه محیط کشت BHI براث، محیط گران‌قیمتی است و نمی‌تواند به‌عنوان محیط کشت در یک سیستم غوطه‌ور و باصرفه از نظر اقتصادی برای تولید صنعتی آنزیم به کار رود؛ لذا در این تحقیق تلاش گردید تا محیط کشتی سنتزی طراحی شود که در آن تولید آنزیم در حد محیط BHI بوده و ضمناً از لحاظ اقتصادی نیز مقرون به‌صرفه باشد.

در پژوهش انجام‌شده علاوه بر تعیین نوع ترکیبات محیط کشت، میزان غلظت آنها نیز توسط طراحی تاگوچی به دست آمد. روش تاگوچی توسط پروفسور Tagochi در سال ۱۹۸۰میلادی، به‌عنوان روشی مناسب و کارآمد جهت افزایش کیفیت محصولات در کشور امریکا معرفی شد. با کمک این روش آماری با کمترین تعداد آزمایشات و صرفه‌جویی زمانی، مالی و انسانی، بهترین و نزدیکترین نتایج به روش Full Factorial به دست می‌آید. استفاده از طراحی تاگوچی از آن جهت اهمیت بالایی دارد که علاوه بر کاهش تعداد آزمایشات، کاهش هزینه و صرف زمان کمتر، به‌طور همزمان اثر فاکتورها را بر هم مقایسه کرده (۳)، و با در نظر گرفتن تأثیر همزمان همه فاکتورها شرایط بهینه محیط کشت را معرفی می‌کند؛ زیرا اگر اثر هر فاکتور به‌طور جداگانه بررسی شود این امکان وجود دارد که ترکیبات به‌طور جداگانه اثر مطلوبی بر تولید آنزیم داشته باشند، ولی این احتمال نیز هست زمانی‌که با هم تشکیل محیط کشت می‌دهند در اثر اینتراکشن بین ترکیبات، اثر کاهشی داشته باشند؛ بنابراین روش تاگوچی از این جهت که همزمان اثر فاکتورها را بر یکدیگر و بر تولید آنزیم لحاظ می‌کند قابل اطمینان و اهمیت است.

روش بررسی

در این مطالعه، محیط کشت جامد حاوی هیالورونیک اسید برای بررسی تولید آنزیم هیالورونیداز توسط جدایه G8مورد استفاده قرار گرفت. برای ساخت این محیط کشت به ۶۰ml آب مقطر، ۳/۷g محیط BHI براث اضافه گردید، سپس ۱g نوبل آگار به آن افزوده شد، و پس از انجام اتوکلاو، در دمای $45^{\circ}C$ محلولی از هیالورونیک اسید به‌عنوان سوبسترای آنزیم به محیط کشت اضافه گردید. این محلول از حل کردن ۰/۰۴g هیالورونیک اسید در ۲۰ml بافر فسفات سدیم ۰/۵M به دست آمد. همچنین از حل

کردن 1g آلبومین گاوی فرکشن v در 20ml بافر فسفات سدیم 0/5M، محلول آلبومین گاوی فرکشن v تهیه و پس از فیلتر شدن توسط فیلترهای 0/2µ، به محیط کشت با دمای 45°C اضافه شد (۶). سپس محیط کشت ساخته‌شده در پلیت‌های 8cm تقسیم گردید و در این محیط جامد چاهک‌هایی ایجاد شد. از آنجایی که آنزیم هیالورونیداز خارج سلولی است؛ لذا 200µl از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ کشت ۲۴ ساعت باکتری در محیط مایع BHI، به هر چاهک اضافه شد. پس از گرماگذاری پلیت در 37°C، به کمک اسید استیک 2N براساس ایجاد هاله یا عدم ایجاد هاله، حضور هیالورونیداز بررسی گردید. هیالورونیک اسید با آلبومین گاوی در شرایط اسیدی کنجوگه شده و محیط کشت را کدر می‌کند. درصورت وجود جدایه تولیدکننده هیالورونیداز، هیالورونیک اسید اطراف چاهک توسط هیالورونیداز باکتری تجزیه شده و اطراف چاهک شفاف باقی می‌ماند (۳). برای سنجش میزان هیالورونیک اسید باقیمانده از واکنش آنزیم و سوبسترا، روش کربازول مورد استفاده قرار گرفت (۷). (این روش بر مبنای تغییرات OD و براساس غلظت هیالورونیک اسید است). با روش کربازول ابتدا ۲ محلول شماره (۱) و (۲) به‌طور جداگانه ساخته شد. محلول شماره (۱) حاوی اسید سولفوریک و تترا بوراهیدرات و محلول شماره (۲) حاوی اتانل و کربازول بود. برای تهیه محلول شماره (۱)، به 75ml اسید سولفوریک ۹۵٪، 25ml آب مقطر افزوده شد، تا اسیدسولفوریک رقیق (۷۵٪) به‌دست آید. سپس به 100cc اسید سولفوریک رقیق‌شده، 191mg ترکیب سدیم تترا بوراهیدرات اضافه گردید (۷). برای تهیه محلول شماره (۲)، 125g٪ کربازول در 12/6ml اتانل حل شد (۷). برای سنجش غلظت هیالورونیک اسید، ابتدا به کمک سمپلر، 3ml از محلول شماره (۱) (حاوی اسید سولفوریک و سدیم تترا بوراهیدرات) در یک لوله درپوش‌دار ریخته شد، سپس دمای لوله با استفاده از یخ به 4°C کاهش یافت. پس از تنظیم دمای لوله در 4°C، به کمک سمپلر 500µl از نمونه مجهول به آرامی به لوله اضافه شد. نمونه مجهول در سطح محلول شماره (۱) به‌صورت شفاف اما در ۲ فاز مجزا قرار گرفت. در ادامه، به آرامی لوله‌ها جهت ادغام ۲ فاز ایجادشده تکان داده شدند، سپس به مدت ۱۰ دقیقه به بن‌ماری جوش انتقال یافتند. پس از سرد شدن لوله، به کمک سمپلر 100µl از محلول شماره (۲) (شامل اتانل و کربازول) به آرامی روی محتویات درون لوله اضافه گردید. در مرحله بعد، به مدت ۱۵ دقیقه لوله در بن‌ماری جوش قرار داده شد و پس از خنک شدن، جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. (هرچه رنگ ارغوانی محلول پررنگ‌تر باشد یا به عبارتی OD محلول بیشتر باشد، نشانه غلظت بالای هیالورونیک اسید در محلول است) (۷). برای رسم نمودار استاندارد، 50mg هیالورونیک به بالن ژوژه 50ml منتقل گردید، و به‌وسیله آب ۲ بار تقطیر به حجم 50ml رسانده شد. در مرحله بعد، ۱۰ بالن ژوژه 5ml را با فویل پوشانده و شماره‌گذاری شدند. سپس در هریک به کمک سمپلر، حجم‌های 0/5ml، ۱، 1/5، ۲، 2/5، ۳، 3/5، ۴، 4/5، ۵ از محلول ذخیره‌شده هیالورونیک اسید ریخته و با کمک آب ۲ بار تقطیر حجم نهایی به 5ml رسانده شد و بدین‌ترتیب غلظت‌های 0/1، 0/2، 0/3، 0/4، 0/5، 0/6، 0/7، 0/8، 0/9 و 1mg/ml از هیالورونیک اسید به دست آمد (۸). پس از ساخته شدن غلظت‌های مشخص از هیالورونیک اسید، برای هر غلظت آزمایش کربازول انجام گرفت و مقدار OD هریک از غلظت‌ها در طول موج بین 500–600nm سنجیده شد، سپس نمودار استاندارد هیالورونیک اسید رسم گردید (۹،۳). برای تهیه محلول سوبسترا، 25mg هیالورونیک اسید در یک بالن 25ml با بافر فسفات سدیم 0/05M و pH=7 به حجم رسانده شد. در ادامه، از محلول به دست آمده به‌عنوان سوبسترا آنزیم هیالورونیداز استفاده گردید (۳).

آنزیم هیالورونیداز آنزیمی خارج سلولی است. بنابراین از محیط کشت مایع که باکتری در آن رشد کرده بود، به‌وسیله سانتریفوژ یخچال‌دار در دور 8000×g، محلول رویی حاوی آنزیم از رسوب جدا شد (۱۰). برای مراحل سنجش تولید آنزیم برای هر نمونه محلول آنزیمی، 1ml محلول سوبسترا با 1ml محلول رویی حاوی آنزیم به دست آمده از سانتریفوژ در دور 8000×g در دمای 37°c به مدت یک ساعت در انکوباتور گرماگذاری شد و بعد از این مدت، با افزودن 100µl از ترکیب سدیم دودسیل سولفات، آنزیم غیرفعال گردید. سپس با افزودن 8ml اتانل، محلول به مدت ۲۰ دقیقه در دور 2750×g توسط سانتریفوژ یخچال‌دار سانتریفوژ شد. سپس رسوب هیالورونیک اسید جدا شده با آب ۲ بار تقطیر استریل در بالن 5ml به حجم رسانده شد (۳). در مرحله بعد، میزان هیالورونیک اسید باقیمانده را با روش کربازول سنجیده و طبق نمودار استاندارد میزان تولید آنزیم مشخص گردید. (براساس تعریف، واحد آنزیمی مقدار آنزیمی است که در مدت ۳۰ دقیقه

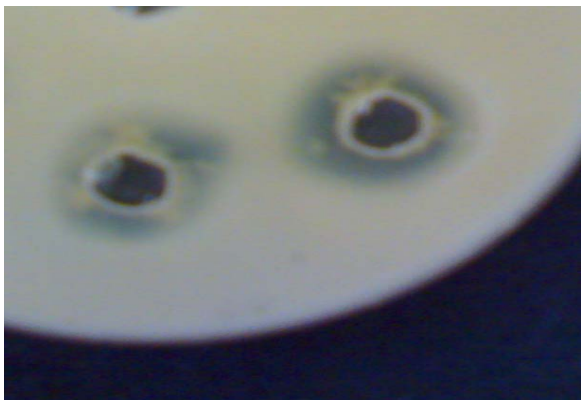
میزان جذب هیالورونیک اسید را ۰/۱ کاهش می‌دهد) (۷،۳). بدین‌ترتیب مقدار آنزیم تولیدشده به دست آمد. نمونه‌ای که تمام فاکتورهای مورد آزمایش را دارا بوده و تنها اثر فعالیت آنزیم در آن حذف شده بود، به‌عنوان نمونه کنترل برای هر آزمایش در نظر گرفته شد؛ تا با انجام تست کربازول بر روی این نمونه، میزان اثر آنزیم هیالورونیداز در نمونه مورد آزمایش با توجه به نمونه کنترل بررسی گردد.

برای بررسی اثر منابع کربنی متفاوت بر تولید آنزیم، ابتدا محیط کشت پایه طراحی شد، سپس انواع قندها شامل گلوکز، فروکتوز، لاکتوز، نشاسته به میزان 5g/l به ۴ محیط کشت پایه جداگانه افزوده و پس از رشد جدایه G8، در شرایط بهینه میزان تولید آنزیم به روش کربازول طبق دستور کار مورد سنجش قرار گرفت. برای مطالعه اثر منابع نیتروژنی متفاوت بر تولید آنزیم، ابتد محیط کشت پایه طراحی شد، سپس انواع منابع نیتروژنی شامل نیترات آمونیوم، پپتون از کازئین سولفات آمونیوم، عصاره مخمر به میزان 5g/l به ۴ محیط کشت پایه به‌طور جداگانه اضافه و پس از رشد جدایه G8 در شرایط بهینه، میزان تولید آنزیم طبق دستور کار ارزیابی گردید. همچنین برای بررسی اثر کلریدهای مختلف بر تولید آنزیم هیالورونیداز، ابتدا با ساخت محیط کشت پایه، انواع کلریدها شامل: کلرید آمونیوم، کلرید منیزیوم، کلرید منگنز و کلرید پتاسیم به میزان 5g/l به ۴ محیط کشت پایه، به‌طور جداگانه اضافه شد، و پس از رشد جدایه G8 در شرایط بهینه، میزان تولید آنزیم طبق روش بررسی مورد سنجش قرار گرفت. به‌منظور مطالعه همزمان چند فاکتور در چند سطح مختلف، بهترین و مناسب‌ترین روش فاکتوریل کامل (Full Factorial) می‌باشد که به‌علت بالا بودن تعداد آزمایشات در این روش و صرف هزینه‌های مالی، زمانی و نیروی انسانی، روش تاگوچی به‌عنوان یک روش آماری مطمئن و قابل قبول می‌تواند جایگزین روش فاکتوریل کامل شود. برتری این روش بر تک فاکتوریل این است که می‌توان همزمان اثرات متقابل عوامل مختلف مورد سنجش را در نتیجه لحاظ نمود؛ درحالی‌که روش تک فاکتوری فقط اثر یک فاکتور را در صورت ثابت ماندن بقیه فاکتورهای مورد نظر می‌سنجد.

پس از مشخص شدن منابع نیتروژنی، کربنی و نوع کلریدی که در محیط کشت تأثیر بیشتری بر تولید آنزیم داشتند، براساس طراحی تاگوچی میزان غلظت بهینه ترکیبات و نیز تأثیر میزان هوادهی همراه با محیط‌های کشت سنتزی ارزیابی گردید. غلظت واردشده ترکیبات در طراحی تاگوچی ۰/۵، ۱، ۱/۵ و 2g/l محیط کشت و سطوح هوادهی ۱۰۰ rpm، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ در نظر گرفته شد. براساس فاکتورها و سطوح انتخابی نرم‌افزار تاگوچی، آزمایش‌هایی طراحی شد. به تمام محیط‌های کشت طراحی‌شده براساس نرم‌افزار تاگوچی 3g/l عصاره گوشت به‌عنوان کوآنزیم و ویتامین افزوده شد.

یافته‌ها

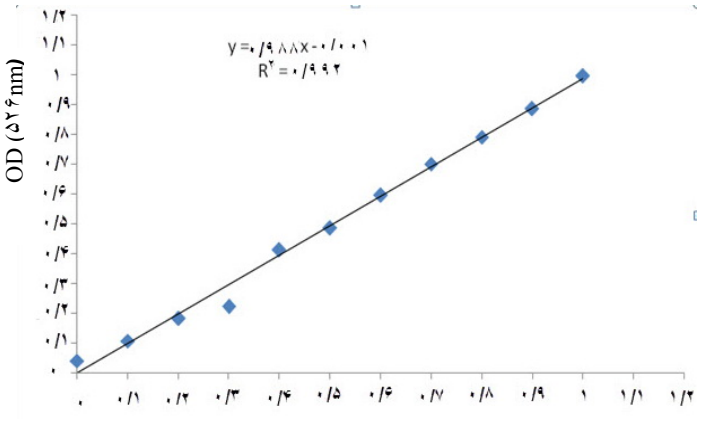
طبق نتایج، به دلیل تولید آنزیم هیالورونیداز توسط جدایه G8 و تجزیه هیالورونیک اسید اطراف چاهک، اسید هیالورونیک قادر به کنجوگه شدن با آلبومین گاوی فرکشن V محیط کشت، در اطراف چاهک نخواهد بود و اطراف چاهک شفاف باقی می‌ماند (شکل).



شکل: ایجاد هاله شفاف در محیط کشت جامد پس از ریختن اسید استیک

پس از اثبات تولید آنزیم توسط جدایه G8، خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی این جدایه ارزیابی شد. این باکتری باسیل گرم مثبت و اسپوردار است و در لام تهیه‌شده از کشت ۲۴ ساعته جدایه G8 در محیط BHI آگار، آرایش کلنی آن به‌صورت زنجیره‌ای می‌باشد که با افزایش مدت زمان کشت باسیل‌ها طویل‌تر شده و ضخامت آنها کمتر می‌شود. کلنی این جدایه فاقد پیگمان و موکوئیدی با حاشیه نامنظم و سر برجسته است.

برای رسم نمودار استاندارد هیالورونیک اسید مطابق با روش بررسی، آزمایش کربازول در مورد هر غلظت انجام گردید و در طول موج‌های بین ۶۰۰nm-۵۰۰ جذب گرفته شد. طول موج مناسب برای سنجش هیالورونیک اسید در ۵۲۶nm به دست آمد و در این طول موج نمودار استاندارد هیالورونیک اسید ترسیم شد.



نمودار: نمودار استاندارد هیالورونیک اسید

براساس آزمایشات صورت گرفته، pH=۷ دور شیکر ۱۰۰rpm، حجم تلقیح اولیه ۳۰۰µl به ازای ۲۰ml محیط کشت و مدت گرماگذاری ۹ ساعت، شرایط بهینه رشد جدایه G8 در محیط BHI براث می‌باشد (۳).

در شرایط بهینه میزان تولید آنزیم به روش کربازول سنجیده شد، و میزان تولید آنزیم توسط جدایه G8 در محیط BHI براث در شرایط بهینه مذکور ۷/۴unit/ml گزارش گردید. برای مطالعه اثر منابع کربنی بر تولید آنزیم مطابق روش بررسی، نمونه کنترل تهیه شد؛ تا میزان اثر منابع کربنی متفاوت بر تولید آنزیم در مقایسه با نمونه کنترل مشخص گردد. با بررسی تأثیر منابع مختلف کربنی (شامل فروکتوز، گلوکز، نشاسته، لاکتوز) بر تولید آنزیم هیالورونیداز در محیط کشت حاوی فروکتوز در مراحل سنجش آنزیم، OD به دست آمده ۰/۵۹۴ کاهش جذب را نشان داد که بر این اساس تولید آنزیم ۵/۹unit/ml به دست آمد. OD مربوط به نشاسته ۰/۴۱۴، گلوکز ۰/۳۲۸ و لاکتوز ۰/۲۰۹ بود. با رشد جدایه G8 در ۴ محیط پایه با منابع نیتروژنی متفاوت، نمونه کنترل طبق روش بررسی تهیه شد و آزمایش کربازول روی نمونه کنترل نیز انجام گرفت، سپس با مقایسه میزان جذب نمونه مورد آزمایش و نمونه کنترل، میزان تولید آنزیم در محیط‌های متفاوت از نظر نوع منبع نیتروژنی به دست آمد. با بررسی تأثیر منابع نیتروژنی (شامل نیترات آمونیوم، عصاره مخمر، پپتون از کازئین و سولفات آمونیوم) بر تولید آنزیم هیالورونیداز توسط جدایه G_8، در محیط کشت حاوی عصاره مخمر در مراحل سنجش آنزیم، OD به دست آمده برای عصاره مخمر ۰/۶۳۲، کاهش جذب را نشان داد که بر این اساس تولید آنزیم ۶/۳unit/ml به دست آمد. OD برای پپتون از کازئین ۰/۵۹۰، نیترات آمونیوم ۰/۳۱۰ و سولفات آمونیوم ۰/۲۷۰ بود.

با رشد جدایه G8 در ۴ محیط پایه با کلریدهای متفاوت، مطابق روش بررسی، سنجش تولید آنزیم صورت گرفت و با مقایسه میزان جذب نمونه مورد آزمایش و نمونه کنترل، میزان تولید آنزیم در محیط‌های متفاوت از نظر نوع کلرید به دست آمد. با بررسی تأثیر کلریدهای مختلف شامل: کلرید پتاسیم، کلرید منیزیم، کلرید آمونیوم و کلرید منگنز بر تولید آنزیم هیالورونیداز توسط جدایه G8، در محیط کشت حاوی کلرید آمونیوم در مراحل سنجش آنزیم، OD به دست آمده برای کلرید آمونیوم، ۰/۶۸۴ کاهش جذب را نشان داد که بر این اساس تولید آنزیم ۶/۸unit/ml به دست آمد. OD برای کلرید پتاسیم ۰/۳۵۵، کلرید منگنز ۰/۲۴۷ و کلرید منیزیم ۰/۱۹۰ بود. با استفاده از روش تاگوچی ۱۶ آزمایش براساس فاکتورها و سطوح انتخابی طراحی شد (جدول).

جدول: آزمایش‌های طراحی‌شده تاگوچی

آزمایش	غلظت فروکتوز g/l	غلظت عصاره مخمر g/l	غلظت کلرید آمونیوم g/l	Rpm
۱	۵	۵	۵	۱۰۰
۲	۵	۱۰	۱۰	۱۵۰
۳	۵	۱۵	۱۵	۲۰۰
٤	۵	۲۰	۲۰	۱۵۰
۵	۱۰	۵	۱۰	۲۰۰
٦	۱۰	۱۰	۵	۲۵۰
۷	۱۰	۱۵	۲۰	۱۰۰
۸	۱۰	۲۰	۱۵	۱۵۰
۹	۱۵	۵	۱۵	۱۵۰
۱۰	۱۵	۱۰	۲۰	۲۰۰
۱۱	۱۵	۱۵	۵	۱۵۰
۱۲	۱۵	۲۰	۱۰	۱۵۰
۱۳	۲۰	۵	۱۵	۱۵۰
۱٤	۲۰	۱۰	۱۵	۱۰۰
۱۵	۲۰	۱۵	۱۰	۲۵۰
۱٦	۲۰	۲۰	۵	۲۰۰

پس از تهیه محیط‌های کشت مطابق طراحی تاگوچی و تلقیح باکتری به محیط کشت و ایجاد شرایط رشد باکتری طبق روش بررسی، سنجش تولید آنزیم براساس آزمایش کربازول انجام گرفت، و میزان جذب‌های به دست آمده آزمایشات طراحی‌شده توسط نرم‌افزار تاگوچی بررسی گردید، سپس براساس نتایج به

دست آمده، شرایط بهینه تولید آنزیم به‌وسیله نرم‌افزار تاگوچی معرفی و میزان جذب در شرایط اپتیمم تخمین زده شد.

در شرایط بهینه معرفی‌شده طراحی تاگوچی برای تولید آنزیم هیالورونیداز توسط جدایه G8 یعنی محیط کشتی حاوی فروکتوز (۵g/l)، عصاره مخمر (۱۵g/l)، کلرید آمونیوم (۱۰g/l) و دور شیکر ۲۵۰rpm، میزان جذب در محدوده تعیین‌شده نرم‌افزار یعنی OD=۰/۱۹۶ به دست آمد. بر این اساس در شرایط بهینه به دست‌آمده میزان تولید آنزیم ۸/۰۴unit/ml گزارش شد.

بحث

با توجه به کاربرد روزافزون این آنزیم در صنایع دارویی و تولید داروهای حاوی این آنزیم، و نیز کاربرد گسترده آن در تحقیقات پایه علوم زیستی مانند مهندسی بافت، پاتولوژی و فیزیولوژی سلول‌های سرطانی، بررسی تحقیقات در زمینه تولید میکروبی آنزیم حایز اهمیت است. Macciean و همکارانش در سال ۱۹۴۱، مطالعه‌ای در زمینه تولید هیالورونیداز از باکتری‌های استرپتوکوکی انجام دادند (۱۱). Dorfman و همکارانش نیز در سال ۱۹۴۷، کاربرد روش کدورت‌سنجی برای سنجش تولید هیالورونیداز را بررسی نمودند. همچنین Thomas و همکارانش در سال ۱۹۹۴، تحقیقاتی در زمینه کلونینگ و سکوانس توالی ژن هیالورونیداز پنوموکوکی و تلخیص آنزیم از Ecoli نوترکیب انجام دادند (۳). در زمینه بهینه‌سازی تولید آنزیم هیالورونیداز و تأثیر منابع متفاوت کربنی و نیتروژنی، مطالعاتی توسط Sahoo و همکارانش در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت. آنها اثر منابع مختلف کربنی شامل گلوکز، لاکتوز، سوکروز و نشاسته را بر تولید آنزیم هیالورونیداز توسط استرپتوکوکوس میتیس بررسی نمودند. نتایج آنها نشان داد قند سوکروز بیشترین تأثیر را بر تولید آنزیم هیالورونیداز توسط استرپتوکوکوس میتیس داشته است. در تحقیق Shaoo نیز روش سنجش تولید هیالورونیداز براساس افزایش گرانروی سوبسترا بررسی شد که بسیار هزینه‌بر بود (۱۲)، با توجه به اینکه جدایه G8 در محیط BHI به‌عنوان یک محیط مغذی رشد خوبی دارد؛ لذا میزان تولید آنزیم در محیط مایع BHI سنجیده شد که ۷/۴unit/ml به دست آمد (۳).

نظر به اینکه محیط BHI براث محیط گران‌قیمتی است و نمی‌تواند به‌عنوان محیط کشت در یک سیستم غوطه‌ور و باصرفه از نظر اقتصادی، برای تولید صنعتی آنزیم به کار رود؛ لذا تلاش گردید تا محیط کشتی سنتزی طراحی شود که در آن تولید آنزیم در حد محیط BHI بوده و ضمناً از لحاظ اقتصادی نیز مقرون به‌صرفه باشد.

نتیجه‌گیری

به دلیل اهمیت پزشکی، فیزیولوژی، بیولوژی و تجاری آنزیم هیالورونیدازها (۴)، این پژوهش برای بهینه‌سازی شرایط محیط کشت با هدف تولید صنعتی آنزیم هیالورونیداز توسط جدایه باسیلوس مولد آنزیم جداشده از خاک بهشت زهرای تهران، صورت گرفت. نتایج این مطالعه، این فرضیه را اثبات نمود که ترکیبات محیط کشت بر تولید آنزیم هیالورونیداز مؤثرند، همچنین برخی ترکیبات و منابع کربنی، نیتروژنی و کلریدها نه تنها اثر مهاری بر تولید آنزیم ندارند؛ بلکه باعث افزایش تولید نیز می‌شوند و در محیط کشت صنعتی در فرمانتورها و...، می‌توان از منابع طبیعی که دارای درصد بالایی از این ترکیبات می‌باشد، استفاده نمود. از طرفی، تعیین نسبت غلظت ترکیبات محیط کشت و تعیین میزان هوادهی می‌تواند راهنمایی برای طراحی شرایط بهینه تولید آنزیم در مقیاس صنعتی بوده و بدین‌ترتیب محیط کشت باصرفه از نظر اقتصادی و شرایط بهینه تولید، تهیه شود. در مورد جدایه G8 با توجه به اینکه قند فروکتوز بیشترین تأثیر را بر تولید آنزیم داشته است؛ در محیط کشت صنعتی می‌توان از پساب کارخانجات تولید آب میوه، یا آب انگور و...، و یا ضایعات این کارخانجات نیز استفاده کرد.

پیشنهادات

با توجه به کاربردهای گسترده این آنزیم، و جداسازی جدایه بومی مولد و با توجه به اینکه تولید آنزیم در داخل کشور انجام نگرفته است؛ لذا در ادامه این پروژه بررسی تأثیر انواع پساب‌های حاوی منابع کربنی و نیتروژنی بر تولید آنزیم هیالورونیداز، طبق نتایج به دست آمده از این پژوهش، شناسایی ژن مولد آنزیم هیالورونیداز در جدایه G8 و طراحی روش‌های کلونینگ و بیان ژن آنزیم هیالورونیداز در میزبان مناسب و بررسی تأثیر سایر فاکتورها مانند ویتامین‌ها و عناصر بر تولید آنزیم هیالورونیداز توسط جدایه G8 می‌تواند راهگشای تولید صنعتی آنزیم هیالورونیداز باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با همکاری صمیمانه پرسنل آزمایشگاه تخصصی مولکولی بوعلی به انجام رسید. بدین وسیله از جناب آقای دکتر حائری، مهندس خازنی و جناب آقای هندیانی سپاسگزاری می‌نماییم.

References:

1. Stern R. Hyaluronan Metabolism: A Major Paradox in Cancer Biology. Pathology 2005;53:372-382.

2. Kaneko Y, Ohya T. Production of Hyaluronidase from Astrain of Streptomyces. Applied Microbiology 1973;29:414-421.

3. Esarifar E. Isolation and Identify Aerobic Produce Bacteria. (Thesis) Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Qom Branch; 2009. p. 32,45,54,105. [Text in Persian]

4. Oettl M, Hoechstetter J, Asen I, Bernhardt G, Buschauer A. Comparative Characterization of Bovine Testicular Hyaluronidase and a Hyaluronat Lyase from Streptococcus Agalactiae in Pharmaceutical Preparations. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2003;18:267-277.

5. Kozak IR. Tayikcioglu O, Cheng L. The Effect of Recombinant Human Hyaluronidase on Dexamethasone Penetration Into the Posterior Segment of the Eye after Sub-Tenon's Injection. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics 2006;5:362-369.

6. SmithR, Willett N. Rapid Plate Method for Screening Hyaluronidase and Chondrotinsulfatase-Producing Microorganisms. Applied Microbiology 1968;16:1434-1436.

7. Bitter T, Muir HM. Amodified Uronid Uronic Acid Carbazol Reaction. Anal Biochem 1962;4:330-333.

8. Prehm P. Release of Hyaluronate from Eukaryotic Cell. Biocnhem J 2004;185-9.

9. Jenab Zade H. Analyzing Capability of Production of Hyaluronic Acid Among Microbial Species Selected from Environment and Optimization Biosynthetic Condition of Them. (Thesis) Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Qom Branch; 2009. p. 23,64.82,93. [Text in Persian]

10. Bake R, Dong J, Gpritchard D. The Hyalurnan Lyase of Streptococcus Pyogenes Bacteriophage h 4489 A. Biochem J 2002;365:317-322.

11. Tam Y. Phase Variation of Hyaluronidase Producing Pepto Streptococci Asso Ciated With Periodontal Disease. J Dent Res 1983;62(9):1009-1012.

12. Sahoo PK, Panda SR, Mishra, et al. Optimization Physical and Nutritional Parameters for Hyaluronidase Production by Streptococcus Mitis. Farmaceutical Sciences J 2008;70:661-664.