مجله علمی مطالعات پژوهشی
در علوم مهندسی آینده
www.journalhi.com/eng/

تولید هیالورونیک اسید با کمک تخمیر، بررسی پارامترهای موثر بر بازده تولید و بازیابی و تخلیص آن

محمد علی هوشمند[۱]

۱- مهندسی شیمی گرایش محیط زیست، کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد تهران جنوب، تهران،ایران. ایمیل: a.hooshmand@hotmail.com

چکیده

هیالورونیک اسید یک پلی‌ساکارید طبیعی است که به دلیل خواص بیولوژیکی و رئولوژیکی منحصردی که دارد، در صنایع پزشکی و آرایشی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تخمیر با کمک میکروارگانیسم‌ها روشی است که امروزه بیشتر برای تولید هیالورونیک اسید به کار گرفته می‌شود. در این مقاله، در ابتدا به بررسی میکروارگانیسم‌های تولید کننده و سویه‌های نوترکیب در تولید تخمیری هیالورونیک اسید پرداخته می شود. سپس فرمول‌بندی محیط کشت، شامل منابع کربن و نیتروژن و سوبستراهای جایگزین از نظر تأثیر بر بازده و وزن مولکولی هیالورونیک اسید مورد بررسی قرار می‌گیرد. انواع حالت‌های کشت و شرایط کشت بهینه از جمله دما، pH، هوادهی و هم‌زدن برای حداکثر کردن کارایی تولید بررسی می‌شوند. در نهایت، به تکنیک‌های خالص‌سازی برای دستیابی به هیالورونیک اسید با خلوص بالا پرداخته می‌شود. این مقاله، دید کلی کاملی از تولید هیالورونیک اسید از طریق تخمیر ارائه می‌دهد و اطلاعاتی برای بهینه‌سازی هر مرحله، از انتخاب میکروبی تا خالص‌سازی محصول فراهم می‌کند.

کلمات کلیدی: هیالورونیک اسید، تخمیر، تولید میکروبی، خالص‌سازی

Production of hyaluronic acid through fermentation, analysis of factors affecting production efficiency, and its recovery and purification processes

Mohammad Ali Hooshmand [1]

1- Chemical engineering with environmental orientation, master's degree, South Tehran Azad University, Tehran, Iran.
a.hooshmand@hotmail.com

Abstract

Hyaluronic acid, a natural polysaccharide, has gained significant attention in the medical and cosmetic fields due to its distinct biological and rheological properties. The predominant method for producing hyaluronic acid is through microbial fermentation. This article explores the microorganisms and recombinant strains utilized in the fermentation process for hyaluronic acid production. It examines the formulation of the culture medium, focusing on carbon and nitrogen sources and alternative substrates, and their impact on the yield and molecular weight of hyaluronic acid. Various culture modes and optimal conditions, including temperature, pH, aeration, and agitation, are analyzed to enhance production efficiency. Additionally, purification methods for obtaining high-purity hyaluronic acid are reviewed. This article provides a comprehensive overview of hyaluronic acid production via fermentation, offering insights for optimizing each stage, from microbial selection to product purification.

Keywords: hyaluronic acid, fermentation, microbial production, purification

۱- مقدمه

هیالورونیک اسید[1] که با نام هیالورانون نیز شناخته می‌شود، یک بیوپلیمر طبیعی است که به طور گسترده در طبیعت توزیع شده است. یک گلیکوزآمینوگلیکان[2] خطی و غیرسولفاته است که عمدتاً از واحدهای تکرار شونده N-استیل گلوکوزآمین[3] و اسید گلوکورونیک[4] تشکیل شده است که با پیوندهای گلیکوزیدی (۴-۱) -β و (۳-۱) -β به هم متصل شده‌اند و ساختار آن را از نظر انرژی پایدار می‌کنند [۱]. مولکول‌های هیالورونیک اسید خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوتی دارند. به عنوان مثال، در محلول‌های آبی، به دلیل پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی و فعل و انفعالات آبگریز، یک ساختار پایدار به صورت صفحات بتا را تشکیل می‌دهند که امکان تشکیل شبکه

[1] Hyaluronic acid
[2] Glycosaminoglycan
[3] N-acetylglucosamine
[4] Glucuronic acid

گسترده‌ای را فراهم می‌کند که به وزن مولکولی و غلظت هیالورونیک اسید بستگی دارد [۲].

عملکردهای بیولوژیکی هیالورونیک اسید به وزن مولکولی آن بستگی دارد. هیالورونیک اسیدها با وزن مولکولی بالا یک کلاس از پلیمرها با وزن مولکولی از $۱۰^۶ \times ۱$ تا $۱۰^۶ \times ۶$ دالتون هستند، در حالی که هیالورونیک اسیدها با وزن مولکولی پایین نمونه‌هایی با وزن مولکولی کمتر از $۱۰^۶ \times ۰/۲۵$ دالتون می‌باشند [۳]. برای مثال، چسبندگی مخاطی خاصیت هیالورونیک اسید با وزن مولکولی بالا است. این نوع هیالورونیک اسید به عنوان پرکننده فضا، ضد رگ‌زایی و سرکوب کننده سیستم ایمنی استفاده می‌شود، در حالی که زنجیره‌های اسید هیالورونیک با اندازه متوسط در تخمک‌گذاری، جنین‌زایی و ترمیم زخم نقش دارند. اسید هیالورونیک با وزن مولکولی پایین دارای خواص التهابی، محرک ایمنی، رگ‌زایی و ضد آپوپتوز هستند [۴].

هیالورونیک اسید در جنبه‌های مختلف صنعت داروسازی، پزشکی و آرایشی کاربرد دارد. با توجه به این نیاز، بهینه‌سازی تولید بیوتکنولوژیک و بهبود روش‌های به دست آوردن هیالورونیک اسید با خواص مطلوب یک چالش بزرگ است. هیالورونیک اسید به دلیل ویژگی‌هایی مانند قابلیت حفظ رطوبت، ویسکوالاستیسیته، مقاومت در برابر آسیب‌های مکانیکی و عدم سمیت به یک ماده زیستی جذاب برای کاربردهای مختلف مانند روان‌کنندگی (مفاصل)، تثبیت ساختار، ترمیم زخم، پرکردن فضای اندام (پوست)، قطره‌های چشمی برای سندرم چشم خشک و پیشگیری کننده از تخریب و شروع کننده ترمیم غضروف در طول آرتروز تبدیل شده است [۵].

تقاضا و ارزش هیالورونیک اسید در طول سال‌ها افزایش یافته است. بازار تخمینی هیالورونیک اسید در سال ۲۰۱۹، ۷/۶ میلیارد یورو بود. پیش‌بینی می‌شود از سال ۲۰۱۶ تا ۲۰۲۷ رشد سالانه ۸/۱ درصدی داشته باشد، به این معنی که ۲۰ تن هیالورونیک اسید تولید شده در سال ۲۰۲۷ قیمت متوسطی بین ۱۵۰۰ تا ۴۰۰۰ یورو در کیلوگرم داشته باشد [۶].

پیش از این، هیالورونیک اسید عمدتاً از منابع حیوانی به دست می‌آمد که در آن تاج خروس و زجاجیه گاو منابع اصلی بودند. هیالورونیک اسید حیوانی دارای معایبی از جمله پیوند مستقیم زنجیره‌های پروتئینی به مولکول، مقادیر بالاتر اسیدهای نوکلئیک و خطرات آلودگی ویروسی است [۷،۸]. در نتیجه، تولید هیالورونیک اسید از طریق تخمیر به تدریج به گزینه اصلی تبدیل شد و این فرآیند در بسیاری از مطالعات گزارش شده است.

۲- بیان مساله

تولید هیالورونیک اسید با استفاده از فرآیند تخمیر

در تولید میکروبی هیالورونیک اسید از میکروارگانیسم‌های مختلفی مانند باکتری و مخمر استفاده شده است. اثر ترکیب محیط کشت بر تولید هیالورونیک اسید از طریق تخمیر چندین دهه است که مورد بررسی قرار گرفته است. اولین محیط کشت‌ها، توسط منابع حیوانی مانند محیط کشت عصاره قلب و مغز براث (BHI) و خون گوسفند ساخته شدند. اخیراً، منابع میکروبی، به ویژه عصاره مخمر و مشتقات گیاهی مانند پپتون سویا به عنوان اجزای جایگزین برای محیط‌های کشت استفاده می‌شوند. برخی از پارامترهای اصلی در محیط کشت، مانند pH، وجود یون‌های معدنی، غلظت اولیه گلوکز و نسبت کربن به نیتروژن به منظور بهبود تولید مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. دما به عنوان یک پارامتر اساسی برای تخمیر تعیین شد، زیرا می‌تواند هم حداکثر غلظت هیالورونیک اسید و هم وزن مولکولی متوسط آن را تغییر دهد. هوادهی، اکسیژن محلول و سرعت هم‌زدن نیز عوامل مهمی برای بهبود بازده هیالورونیک اسید و تأثیر بر جرم مولکولی آن هستند. علاوه بر این، بهبود سویه یک عامل کلیدی برای افزایش تولید هیالورونیک اسید بوده است. سویه‌های نوترکیب، جدید و غیر بیماری‌زا در حال حاضر برای تولید بازده بالای هیالورونیک اسید با جرم مولکولی بالا استفاده می‌شوند [۹].

۲-۱- میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در تخمیر

تا کنون از باکتری‌های گرم مثبت و منفی و همچنین قارچها برای تولید تخمیری هیالورونیک اسید استفاده شده است. *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس*[1] (*S. zooepidemicus*)، یک باکتری گرم مثبت است که به دلیل سرعت بالای تولید هیالورونیک اسید و سهولت کشت، یکی از پرمصرف‌ترین ارگانیسم‌ها برای تولید هیالورونیک اسید است. این باکتری قادر به تولید هیالورونیک اسید با وزن مولکولی بالا و زیست سازگاری عالی است که آن را برای کاربردهای پزشکی مانند ترمیم زخم و روانکاری مفاصل مناسب می‌کند. با این حال، یک ارگانیسم با رشد کند است و فرآیند تولید به دلیل نیاز به محیط‌های کشت گران قیمت و فرآیندهای پایین دستی، پرهزینه است. با این حال، نیازی به استفاده از مواد شیمیایی سمی یا حلال ندارد و در نتیجه محصول نهایی خالص و ایمن است [۴]. عیب اصلی آن بیماری‌زایی بالای آن است. *S. zooepidemicus* یک پاتوژن فرصت طلب است که باعث بیماری‌های تنفسی و عصبی در گونه‌های مختلف پستانداران، به ویژه، سگ، اسب، گوسفند، خوک، گربه‌ها، جوندگان و انسان‌ها می‌شود [۹]. این امر، استفاده از سویه‌های جدیدی که می‌توانند در تولید صنعتی هیالورونیک اسید مورد استفاده قرار گیرند را ضروری می‌سازد.

از آنجایی که هیچ تولیدکننده بومی هیالورونیک اسید در میان باکتری‌های گرم مثبت به جز استرپتوکوکوس‌ها وجود ندارد، همه سویه‌های بالقوه تولید کننده هیالورونیک اسید سویه‌های نوترکیب هستند که با کمک بیان ژن به دست می‌آیند [۱۰]. ۱۲ گونه از سویه‌های نوترکیب باکتری‌های لاکتوباسیلوس برای بیوسنتز هیالورونیک اسید به کار گرفته شده‌اند [۹]. باسیلوس سوبتیلیس[2] نیز گونه دیگری است که برای تولید هیالورونیک اسید استفاده شده است. مزایای اصلی آن در مقایسه با سویه‌های استرپتوکوکوس، محیط کشت ارزان‌تر و عدم وجود اگزوتوکسین است. علیرغم در دسترس بودن تجاری و تعداد مزایای آن، تلاش‌ها برای ایجاد یک سویه باسیلوس نوترکیب که بهره‌وری آن بیشتر از استرپتوکوکوس‌ها باشد، تاکنون شکست خورده است. باسیلوس هیالورونیک اسید با وزن مولکولی کمتر تولید می‌کند که برای کاربردهای آرایشی مانند کرم‌ها و سرم‌های مرطوب کننده مناسب است. باسیلوس به سرعت رشد می‌کند و تولید آن نسبتاً ارزان است که آن را به گزینه‌ای سودآورتر برای شرکت‌های آرایشی تبدیل می‌کند [۱۱]. سویه‌های نوترکیب باکتری‌های *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* (*C. glutamicum*)، *استرپتومایسیس*[3]، *سینکوکوکوس*[4] و *لاکتوکوکوس لاکتیس*[5] نیز برای تولید هیالورونیک اسید به کار گرفته شده‌اند [۱۲–۱۵].

در میان باکتری‌های گرم منفی، تنها *پاستورلا مولتوسیدا*[6] (*P. multocida*) به طور بومی هیالورونیک اسید را تولید می‌کند، اما به دلیل بیماری‌زایی بالا، تنها به عنوان منشاء ژن pmHas استفاده می‌شود و نه به

[1] *Streptococcus zooepidemicus*
[2] *Bacillus subtilis*
[3] *Streptomyces*
[4] *Synchococcus*
[5] *Lactococcus lactis*
[6] *Pasteurella multocida*

عنوان منبع هیالورونیک اسید [۱۶]. اشریشیا کلی[1] (*E. coli*) یک باکتری گرم منفی عاری از اندوتوکسین است، بنابراین یک ارگانیسم نوترکیب امیدوارکننده برای تولید هیالورونیک اسید می‌باشد. از طیف گسترده‌ای از ابزار دستکاری ژنتیک می‌توان برای تولید سویه‌های نوترکیب *اشرشیا کلی* استفاده کرد. با این حال، در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت استرپتوکوکوس و باسیلوس، بازده کمتری در تولید هیالورونیک اسید دارد [۱۷]. سویه‌های نوترکیب باکتری *آگروباکتریوم*[2] نیز برای تولید هیالورونیک اسید به کار گرفته شده‌اند [۱۸].

در بیوتکنولوژی، قارچ‌ها مزایای غیرقابل انکاری نسبت به باکتری‌ها دارند که از آن جمله می‌توان رشد سریع، دستکاری ژنتیکی آسان، و عدم وجود اندوتوکسین‌ها و DNA ویروسی را نام برد. آنها قادر به تولید انواع مختلفی از مواد از جمله هیالورونیک اسید و مشتقات آن هستند. با این حال، عیب اصلی استفاده از مخمر، خطر بالای هایپرگلیکوزیلاسیون پروتئین‌های نوترکیب است [۹]. امیدوارکننده‌ترین میزبان‌ها برای تولید پروتئین‌های هترولوگ در میان مخمرها، ساکارومایسس سرویزیه[3] و پیچیا پاستوریس[4] هستند [۱۰,۱۱]. از دیگر سویه‌های قارچی که برای تولید هیالورونیک اسید از آنها استفاده شده است می‌توان *کلایورومایسیس لاکتیس*[5] را نام برد [۱۹].

۲-۲- محیط کشت

توجه به این نکته ضروری است که سوبستراها و مواد مغذی مناسب و غلظت بهینه آنها در محیط کشت بسته به میکروارگانیسم مورد استفاده برای تولید هیالورونیک اسید می‌تواند متفاوت باشد. محققان اغلب از ترکیبی از سوبستراها و مواد مغذی مختلف استفاده می‌کنند و غلظت آنها را برای یافتن بهترین شرایط تولید هیالورونیک اسید تغییر می‌دهند. همچنین توجه به این نکته ضروری است که استفاده از این مواد در محیط کشت می‌تواند هزینه‌های تولید را افزایش دهد. از این رو، یافتن تعادل بین هزینه‌ها و افزایش تولید مهم است. سوبستراهایی که بیشتر در تولید هیالورونیک اسید استفاده می‌شوند، گلوکز و ساکارز به عنوان منابع کربن و انرژی اولیه هستند. سایر منابع کربن مانند لاکتوز، مالتوز، گالاکتوز، مانوز و غیره مورد بررسی قرار گرفته‌اند. با این حال، تولید هیالورونیک اسید با کمک آنها بالا نیست [۲۰]. منابع نیتروژن مانند سولفات آمونیوم، عصاره مخمر و پپتون‌ها را می‌توان به محیط کشت اضافه کرد تا اسیدهای آمینه ضروری مانند لیزین، سیستئین، اسید گلوتامیک و آرژنین و سایر مواد مغذی را برای میکروارگانیسم‌ها فراهم کنند. این می‌تواند به افزایش سرعت تولید اسید هیالورونیک کمک کند [۲۱]. ویتامین‌هایی مانند تیامین، ریبوفلاوین و پیریدوکسین و مواد معدنی مانند سدیم، پتاسیم، منیزیم و کلسیم را می‌توان به محیط کشت برای ترویج رشد میکروارگانیسم‌ها و افزایش سرعت تولید هیالورونیک اسید اضافه کرد [۲۰,۲۱].

در تحقیقات خود، چن و همکاران [۲۲] از گلوکز به عنوان منبع کربن و عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن برای کشف بهترین نسبت کربن به نیتروژن (C/N) استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که نسبت C/N ۲:۱ سنتز اسید هیالورونیک را در g/L ۲/۴۵ به حداکثر می‌رساند. در سایر نسبت‌های C/N، مانند ۳:۱ و ۴:۱، تولید اسید هیالورونیک به ترتیب g/L ۲/۲ و g/L ۱/۵۲ بود. در تحقیقی دیگر، آروسکار و همکاران [۲۳] تأثیر مواد مغذی مختلف در محیط کشت را برای تولید هیالورونیک اسید با کمک باکتری *S. zooepidemicus* بررسی کردند. در این مطالعه، منبع کربن دکستروز بازدهی بالاتری (g/L ۰/۷) نسبت به سایر منابع کربن مورد استفاده مانند ساکارز (g/L ۰/۵۱)، مالتوز (g/L ۰/۵) و دکسترین (g/L ۰/۵۵) در تولید هیالورونیک اسید داشت. محققان افزودن L-arginine HCl و اسید تانیک به محیط تخمیر را بررسی کردند که منجر به افزایش بازده به g/L ۱/۰۲۹ شد.

شاه و همکاران [۲۱] تاثیر افزودن مکمل‌های گلوتامین و یدواستات سدیم در تولید هیالورونیک اسید با کمک *S. zooepidemicus* را بررسی کردند. یدواستات سنتز اسید لاکتیک را با مهار مسیر گلیکولیز کاهش می‌دهد. در نتیجه، مسیر مصرف کربن از تشکیل اسید لاکتیک به تشکیل اسید گلوکورونیک UDP، یکی از پیش سازهای هیالورونیک اسید تغییر می‌کند. گلوتامین یک اسید آمینه است که در تشکیل یکی از پیش‌سازهای هیالورونیک اسید نقش دارد. بر این اساس، غلظت هیالورونیک اسید از g/L ۲ در محیط‌های بدون مکمل به g/L ۵ در محیط کشت حاوی این مکمل‌ها افزایش یافت. سرعت رشد ویژه از h^{-1} ۰/۴۲ به h^{-1} ۰/۲۵ کاهش یافت و وزن مولکولی هیالورونیک اسید از $۲/۴ \times ۱۰^{۳}$ به $۳/۲ \times ۱۰^{۳}$ کیلودالتون افزایش یافت.

فتوحی و همکاران [۲۴] از گونه *اسیدوفیلوس لاکتوباسیلوس*[6] برای تولید هیالورونیک اسید استفاده کردند. از عصاره مخمر، گلوتامین، اوره و سولفات آمونیوم به عنوان منابع نیتروژن و از لاکتوز و پیرووات به عنوان منبع کربن استفاده شد و مشاهده گردید که سطوح پایین لاکتوز تأثیر بیشتری بر تولید هیالورونیک اسید داشت. در تحقیقی دیگر، هافمن و همکاران [۲۵] اثر کشت سویه‌های نوترکیب C. glutamicum در دو محیط کشت مختلف CGXII و MEK700 بر میزان تولید هیالورونیک اسید را بررسی کردند. تولید کلی در محیط CGXII (mg/L ۱۲۴۱) نسبت به محیط کشت MEK700 (mg/L ۳۶۳) بیشتر بود، اما وزن مولکولی محصول در MEK700 (MDa 1.4 <) بیشتر از CGXII (KDa 270 <) بود. غلظت اولیه گلوکز بر تولید هیالورونیک اسید، توده خشک سلولی و همچنین سطح بیان ژن در هر دو محیط تأثیر داشت. بیشترین میزان تولید هیالورونیک اسید در محیط کشت MEK700 در غلظت ۰٪/۸ وزنی-حجمی گلوکز و در محیط کشت CGXII در غلظت ۴٪ وزنی-حجمی مشاهده شد.

۲-۳- منابع جایگزین به عنوان سوبسترا

به طور سنتی، محیط کشت برای تولید هیالورونیک اسید بر پایه قندهای ساده مانند گلوکز و فروکتوز بوده است، اما اینها می‌توانند گران باشند و ممکن است به راحتی در دسترس نباشند [۲۰,۲۱]. در نتیجه، محققان منابع جایگزین را به عنوان بستر برای محیط کشت بررسی کرده‌اند. این منابع جایگزین برای کاهش هزینه‌های تولید و پایدارتر کردن فرآیند مورد بررسی قرار گرفته است. برخی از امیدوارکننده‌ترین منابع جایگزین، ضایعات کشاورزی مانند تفاله چغندر قند، عصاره غلیظ ذرت و سبوس گندم؛ ضایعات صنعتی مانند ضایعات تقطیر و ملاس؛ و سوبستراهای مصنوعی مانند هیدرولیزهای نشاسته و سلولز هستند [۴].

آمادو و همکاران [۲۶] بهینه‌سازی یک محیط حاوی آب پنیر برای تولید هیالورونیک اسید توسط *S. zooepidemicus* را مطالعه کردند. مواد مغذی اصلی در آب پنیر، لاکتوز، پروتئین‌های محلول (β-لاکتوگلوبولین، α-لاکتالبومین)، لیپیدها و ویتامین‌های گروه B هستند. با استفاده از پروتئین

[1] *Escherichia coli*
[2] *Agrobacterium*
[3] *Saccharomyces cerevisiae*
[4] *Pichia pastoris*
[5] *Kluyveromyces lactis*
[6] *Acidophilus Lactobacillus*

آب پنیر و گلوکز به ترتیب به عنوان منابع نیتروژن و کربن، حداکثر نرخ تولید ۰/۸۷ g/L.h (۰/۷۵ g/L.h) در محیط کشت کنترل حاوی گلوکز و عصاره مخمر) ، غلظت هیالورونیک اسید ۴/۰۲ g/L (۳/۱۹ g/L) در محیط کشت کنترل) و میانگین وزن مولکولی ۳/۷۱ × ۱۰^{۳} کیلو دالتون بدست آمد.

ارسلان و آیدوگان [۲۷] اثربخشی پپتون پشم گوسفند و ملاس را به ترتیب به عنوان منابع نیتروژن و کربن در محیط‌های تخمیر برای تولید هیالورونیک اسید، با استفاده از همان سویه آمادو و همکاران، آزمایش کردند. تولید هیالورونیک اسید در محیط‌های حاوی پپتون پشم گوسفند (g/L ۳/۵۴) از محیط‌های حاوی تریپتون (۲/۵۸ g/L) و پپتون (۲/۴۷ g/L) بیشتر بود. پپتون پشم گوسفند محتوای پروتئین کمتری (۷۰/۶ گرم در ۱۰۰ گرم) نسبت به تریپتون و پپتون (به ترتیب ۸۳/۱ و ۸۳/۳ گرم در ۱۰۰ گرم) دارد ولی در مقابل، محتوای عناصر پتاسیم، فسفر و منیزیم که در تولید هیالورونیک اسید نقش دارند در آن بالاتر است. علاوه بر این، این منبع نیتروژن حاوی محتوای بالای سیستئین و آرژنین است که اسیدهای آمینه اصلی تاثیرگذار در تولید هیالورونیک اسید هستند. اینها دلایل احتمالی برای تولید بیشتر هیالورونیک اسید در پپتون پشم گوسفند نسبت به تریپتون و پپتون است. علیرغم مزایای اقتصادی پپتون‌های پشم گوسفند، استفاده از پپتون‌های گیاهی در تولید هیالورونیک اسید برای کاربردهای دارویی و آرایشی به دلیل نیازهای خلوص ارجحیت دارد.

قدکه[1] و همکاران [۲۸] شکر پالمیرا و پپتون سویا را برای فرموله کردن محیطی برای تولید هیالورونیک اسید توسط *S. zooepidemicus* ارزیابی کردند. قند نخل پالمیرا حاوی ساکارز و ویتامین‌ها (اسید نیکوتین، تیامین، ریبوفلاوین و ویتامین C) است که برای رشد یک میکروارگانیسم ضروری است. میزان تولید هیالورونیک اسید و نرخ رشد ویژه در محیط‌های مبتنی بر قند نخل پالمیرا به ترتیب ۰/۴۱ g/L و ۰/۵۴ h^{-1} بود که در مقایسه با محیط‌های مبتنی بر ساکارز خالص (۰/۳۱ g/L و ۰/۳۲ h^{-1}) بالاتر بود. غلظت ۳۰ g/L سوبسترا بیشترین میزان بازده تولید هیالورونیک اسید (۱/۲۲ g/L) را داشت و وزن مولکولی هیالورونیک اسید ۹/۵ × ۱۰^{۲} کیلودالتون بدست آمد.

۲-۴- تعیین شرایط کشت

یکی دیگر از عوامل مهم برای ایجاد یک فرآیند موفق برای تولید هیالورونیک اسید با کمک تخمیر، شناسایی پارامترهای موثر بر تخمیر و بهینه‌سازی آنهاست. شرایط کشت به عوامل مختلفی اشاره دارد که می‌تواند بر رشد و تولید میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در تولید هیالورونیک اسید تأثیر بگذارد. دما یکی از عوامل تاثیرگذار است. دمای مطلوب برای رشد میکروارگانیسم‌ها و تولید هیالورونیک اسید بسته به گونه مورد استفاده متفاوت خواهد بود. محدوده دمایی که برای تولید هیالورونیک اسید مناسب‌تر است معمولاً بین ۳۰ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد است [۲۹]. لی و همکاران [۳۰] تولید هیالورونیک اسید با وزن‌های مولکولی متفاوت را با کمک باکتری *باسیلوس سابتیلیس* ارزیابی کردند. آنها هیالورونیک اسید با وزن مولکولی بالا، متوسط و پایین را به ترتیب با تنظیم دما در ۳۲، ۴۲ و ۴۷ درجه سانتی‌گراد به دست آوردند. بالاترین وزن مولکولی هیالورونیک اسید (۶/۱۳ × ۱۰^{۳} کیلو دالتون) در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد با غلظت هیالورونیک اسید ۱/۸۸ g/L به دست آمد. با این حال، بالاترین غلظت هیالورونیک اسید (g/L ۴/۲۵) با وزن مولکولی ۸/۶۱ کیلو دالتون در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به دست آمد.

pH محیط کشت یکی دیگر از شرایط مهم کشت است که باید تعیین شود. pH باید در محدوده خاصی حفظ شود که برای رشد میکروارگانیسم‌ها و تولید هیالورونیک اسید مناسب باشد. محدوده pH بهینه برای تولید هیالورونیک اسید معمولا بین ۶/۵ تا ۷/۵ است. برای دستیابی به تعادل بین غلظت‌های بالاتر هیالورونیک اسید و وزن مولکولی بالاتر، لیو و همکاران [۳۱] یک استراتژی تخمیر دو مرحله‌ای را توسعه دادند. بیشترین غلظت و وزن مولکولی هیالورونیک اسید در شرایط یکسان سرعت هوادهی و سرعت همزدن (به ترتیب ۱ vvm و ۶۰۰ rpm) به دست آمد. با این حال، این مقادیر غلظت و وزن مولکولی در شرایط مختلف دما و pH به دست آمد. مرحله اول تخمیر در pH= ۸ و دمای ۳۱ درجه سانتیگراد انجام شد تا بهترین شرایط برای افزایش وزن مولکولی فراهم شود و در نهایت، مرحله نهایی فرآیند در ۷ =pH و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای افزایش تولید هیالورونیک اسید انجام شد. غلظت و وزن مولکولی هیالورونیک اسید به ترتیب از ۲/۹۹ g/L و ۱۰^{۳} × ۲/۲۶ کیلو دالتون به ۴/۷۵ g/L و ۱۰^{۳} × ۲/۳۶ کیلو دالتون افزایش یافت.

هوادهی، همزدن، غلظت بهینه سوبسترا و افزودن مواد مغذی مختلف و فاکتورهای رشد نیز می‌توانند بر میزان تولید هیالورونیک اسید تأثیر بگذارند [۳۲]. برای دستیابی به بالاترین غلظت هیالورونیک اسید (۵/۳ g/L)، ذاکری و رسایی [۳۳] بهترین شرایط تخمیر را ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۷ =pH، همزدن ۳۰۰ دور در دقیقه، و اکسیژن محلول ۵۰٪ عنوان داشتند. علاوه بر این، آنها همچنین بهترین منابع کربن و نیتروژن را گلوکز (۷۰ g/L) و عصاره مخمر (۳۰ g/L) عنوان داشتند. هوانگ و همکاران [۳۴] نیز با استفاده از سوبستراهای مشابه، نقش اکسیژن محلول و اثر همزدن را بر تولید هیالورونیک اسید با استفاده از تخمیر بررسی کردند. با افزایش غلظت اکسیژن محلول از ۲/۵٪ به ۵٪، بازده هیالورونیک اسید از ۲/۷ g/L به ۳/۱ g/L افزایش یافت ولی در مقادیر بالاتر اکسیژن محلول، بازده تولید هیالورونیک اسید تحت تأثیر قرار نگرفت. نقش اصلی همزدن، مخلوط کردن محیط کشت است. با این حال، اختلاط می‌تواند به جذب اکسیژن توسط سلول‌ها نیز کمک کند. در ۴۰۰ دور در دقیقه (۰/۷۴ گرم هیالورونیک اسید/گرم سلول)، بهره‌وری هیالورونیک اسید بالاتر از ۲۰۰ دور در دقیقه (۰/۶۵ گرم هیالورونیک اسید/گرم سلول) بود.

لانگ لیو و همکاران [۳۵] سه استراتژی برای کنترل اکسیژن محلول در محیط تولید پیشنهاد کردند. ابتدا، آنها یک مدل کنترل سرعت همزدن سه مرحله‌ای را اعمال کردند که در آن سرعت هم زدن را بین ۲۰۰ دور در دقیقه (۸-۰ ساعت)، ۴۰۰ دور در دقیقه (۸-۱۲ ساعت) و ۶۰۰ دور در دقیقه (۱۲-۲۰ ساعت) تغییر دادند. بهره‌وری تولید هیالورونیک اسید از ۵ g/L گرم در سرعت همزدن ثابت (۲۰۰ دور در دقیقه) به ۵/۵ g/L افزایش یافت. سپس یک مدل کنترل اکسیژن محلول دو مرحله‌ای را مورد بررسی قرار دادند. در این مدل، سطح اکسیژن محلول را در ۸ ساعت اول فرآیند تخمیر در سطح ۱۰٪ کنترل کردند و پس از آن با استفاده از کنترل سرعت همزدن، سطح اکسیژن محلول را به ۵٪ کاهش دادند. هنگامی که در سطوح حیاتی اکسیژن محلول برای رشد سلولی و تولید هیالورونیک اسید تفاوت وجود داشت، با این استراتژی، توانستند جریان کربن را در فاز اول فرآیند تخمیر برای رشد سلول و بعداً برای تولید هیالورونیک اسید تغییر دهند. در نتیجه، تولید و بهره‌وری هیالورونیک اسید به ترتیب به ۶/۳ g/L و ۰/۰۹۸۴ g/L.h افزایش یافت. راهبرد دیگر برای بهبود سطح اکسیژن محلول در محیط کشت، افزودن وکتورهای اکسیژن به محیط کشت است. بدین منظور، لانگ لیو و همکاران

[1] Ghodke

[۲۶] اثر افزودن پرفلورودکالین[1] به محیط را در ۸ ساعت از فرآیند بررسی کرد. مشخص شد که پرفلورودکالین سطح اکسیژن محلول را از ۰/۵٪ به ۵٪ در سرعت همزدن کم (۲۰۰ دور در دقیقه) بهبود بخشید و بازده هیالورونیک اسید نیز ۶/۶ g/L بود.

۲-۵- پیکربندی فرمانتور

پیکربندی فرمانتور به طراحی و راه‌اندازی تجهیزات مورد استفاده در فرآیند تخمیر برای تولید هیالورونیک اسید اشاره دارد. فرمانتور معمولا شامل اجزای زیر است:

- ظرف تخمیر: ظرف یا راکتوری که فرآیند تخمیر در آن انجام می‌شود. این ظرف معمولاً از فولاد ضد زنگ ساخته می‌شود و بسته به مقیاس تولید می‌تواند در اشکال و اندازه‌های مختلفی طراحی شود.
- همزن: این وسیله مکانیکی برای مخلوط کردن محیط کشت و تامین اکسیژن میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. همزن‌ها را می‌توان در اشکال مختلفی مانند پره ملخی، پره پارویی و پره توربینی طراحی کرد و می‌توان آن را تنظیم کرد تا نرخ همزدن بهینه را برای میکروارگانیسم‌های مورد استفاده فراهم کند.
- سیستم هوادهی: دستگاهی است که برای اکسیژن‌رسانی به محیط کشت استفاده می‌شود. سیستم‌های هوادهی را می‌توان به اشکال مختلفی مانند اسپارجر، حباب هوا و پخش کننده هوا طراحی کرد.
- کنترلر pH و دما: از این دستگاه‌ها برای نظارت و حفظ pH و دمای محیط کشت در محدوده بهینه برای رشد سلول و تولید هیالورونیک اسید استفاده می‌شود.
- سیستم کنترل: دستگاهی است که برای کنترل و نظارت بر پارامترهای مختلف فرآیند تخمیر مانند دما، pH، سرعت همزدن و سرعت هوادهی استفاده می‌شود.

طراحی فرآیند تخمیر به مقیاس تولید و میکروارگانیسم‌های مورد استفاده بستگی دارد. علاوه بر این، یک سیستم تخمیر صنعتی در مقیاس بزرگ مجهز به ویژگی‌های اضافی مانند نمونه‌گیری خودکار، کنترل خودکار pH و دما، کنترل خودکار کف کردن، استریل‌سازی خودکار و غیره است.

چندین محقق سرعت همزدن و نوع پروانه را برای بهبود ضریب انتقال اکسیژن بررسی کرده‌اند. لای و همکاران [۳۶] اثر همزن با پره حلزونی و پروانه توربین راشتون را در یک محفظه ۲ لیتری بررسی کردند و مشاهده کردند که ضریب انتقال حجمی اکسیژن گاز- مایع ($K_L\alpha$) با استفاده از همزن با پره حلزونی در مقایسه با پروانه توربین راشتون ۲۵٪ افزایش یافته است. کاهش $K_L\alpha$ مربوط به افزایش ویسکوزیته است که بر سرعت انتقال اکسیژن تأثیر می‌گذارد. در تحقیق دیگر، کیم و همکاران [۳۷] دو نوع پروانه مختلف را آزمایش کردند: نوع راشتون و نوع اینترمیگ[2]. تولید هیالورونیک اسید با استفاده از دو پروانه تحت شرایط تخمیر یکسان مشابه بود، اما افزایش وزن مولکولی هیالورونیک اسید با استفاده از نوع اینترمیگ ($۱۰^۳ \times ۴/۸$ کیلو دالتون) در مقایسه با نوع راشتون ($۱۰^۳ \times ۳/۸$ کیلو دالتون) مشاهده شد. با این وجود، پروانه نوع راشتون پر استفاده‌ترین سیستم برای همزدن در سیستم تخمیر بوده است.

۲-۶- انواع روش کشت

روش کشت به روشی اطلاق می‌شود که برای رشد و نگهداری میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در فرآیند تخمیر استفاده می‌شود. برخی از روش‌های رایج عبارتند از:

- کشت ناپیوسته: در کشت ناپیوسته، تمام اجزای محیط به جز گازهای اتمسفر، اسید یا باز برای کنترل pH و عوامل ضد کف در شروع کشت در یک ظرف بسته قرار می‌گیرند. میکروارگانیسم‌ها برای مدت زمان مشخصی رشد می‌کنند و پس از آن کشت برداشت شده و هیالورونیک اسید استخراج می‌شود. راه‌اندازی کشت ناپیوسته ساده و آسان است، اما از بازدهی پایین‌تر و هزینه بیشتر نسبت به سایر روش‌ها رنج می‌برد [۳۸].
- کشت نیمه پیوسته: در کشت نیمه پیوسته میکروارگانیسم‌ها در یک ظرف بسته رشد می‌کنند و به صورت دوره‌ای با یک سوبسترا یا مکمل خاص تغذیه می‌شوند. این اجازه می‌دهد تا غلظت بالاتری از میکروارگانیسم‌ها و سرعت بالاتری از تولید هیالورونیک اسید وجود داشته باشد. کشت نیمه پیوسته کارآمدتر از کشت ناپیوسته است، اما تنظیم و کنترل آن پیچیده‌تر است [۳۹].
- کشت پیوسته: در کشت پیوسته، میکروارگانیسم‌ها در یک ظرف بسته رشد می‌کنند و به طور مداوم با یک محیط کشت تازه تغذیه می‌شوند. این اجازه می‌دهد تا غلظت بالایی از میکروارگانیسم‌ها رشد کنند و سرعت تولید هیالورونیک اسید بالا باشد. کشت پیوسته کارآمدترین روش کشت است، اما همچنین پیچیده‌ترین راه اندازی و کنترل را دارد [۴۰].

هر روش کشت مزایا و معایب خاص خود را دارد و مناسب‌ترین روش کشت به نوع میکروارگانیسم‌های مورد استفاده و مقیاس تولید بستگی دارد. محققان اغلب از ترکیبی از حالت‌های مختلف کشت استفاده می‌کنند و چندین فاکتور را برای یافتن شرایطی که در آن بیشترین میزان هیالورونیک اسید تولید می‌شود، تغییر می‌دهند.

بیشترین نوع کشت مورد استفاده برای تولید هیالورونیک اسید، حالت ناپیوسته بوده است. لانگ لیو و همکاران [۳۹] اثر حالت‌های مختلف کشت بر تولید هیالورونیک اسید را بررسی کردند. غلظت هیالورونیک اسید در روش ناپیوسته (۵ g/L) نسبت به روش نیمه پیوسته (۴/۷۲ g/L) بیشتر بود. با این حال، غلظت سلول از ۱۳/۳ g/Lدر حالت ناپیوسته به ۱۴/۷ g/L در حالت نیمه پیوسته افزایش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که حالت نیمه پیوسته برای رشد سلول ترجیح داده می‌شود و حالت ناپیوسته برای تولید هیالورونیک اسید مناسب‌تر است. در نتیجه، محققان یک استراتژی کشت دو مرحله‌ای را بررسی کردند که در آن کشت نیمه پیوسته در مرحله اولیه فرآیند تخمیر و کشت ناپیوسته در مرحله دوم انجام شد. در نتیجه، غلظت هیالورونیک اسید بالاتری (۶/۶ g/L) حاصل شد.

برای افزایش کارایی تولید هیالورونیک اسید، ژانگ و همکاران [۴۱] یک فرآیند تخمیر نیمه پیوسته شامل بیوراکتورهای دو مرحله‌ای ۳ لیتری طراحی کردند که در آن بهره‌وری ۱/۰۱ g/L.h و غلظت هیالورونیک اسید ۱۴/۶ g/L به دست آمد. برای افزایش بیشتر تولید هیالورونیک اسید، هیالورونیداز نوترکیب SzHYal در ۶ ساعت به بیوراکتور مرحله دوم اضافه شد تا ویسکوزیته محیط کشت کاهش یابد. بالاترین غلظت هیالورونیک اسید ۲۹/۳۸ g/L با بهره‌وری ۱/۱۳ g/L.h در ۳۰۰ U/L SzHYal پس از ۲۴ ساعت به دست آمد. این فرآیند تخمیر نیمه پیوسته به تازگی توسعه یافته، یک

[1] Perfluorodecalin
[2] Intermig

استراتژی امیدوارکننده برای تولید صنعتی هیالورونیک اسید و پلی ساکاریدهای مرتبط ارائه داد.

۳- خالص‌سازی هیالورونیک اسید

ثابت شده است که درجه خلوص هیالورونیک اسید یک عامل تعیین کننده برای کاربردهای بالینی موفق آن است. عمده‌ترین فرآیندهای جداسازی و خالص‌سازی مورد مطالعه برای فرآیند پایین دستی هیالورونیک اسید به شرح زیر است: رسوب‌دهی، فیلتراسیون، جذب، الکتروفورز و تبادل یونی. ترکیبی از عملیات‌های مختلف برای خالص‌سازی هیالورونیک اسید می‌تواند اثربخشی و کارایی حذف ناخالصی‌ها را بهبود دهد [۸]. جدول ۱ مروری بر کارهای انجام شده برای خالص‌سازی هیالورونیک اسید تولید شده از تخمیر دارد.

۳-۱- رسوب‌دهی

پروتئین‌ها منبع اصلی ناخالصی‌ها در فرآیندهای تولید هیالورونیک اسید هستند. رسوب‌دهی توسط حلال‌های آلی یا نمک‌های چهارظرفیتی به طور گسترده‌ای برای حذف پروتئین استفاده شده است. به طور کلی، به دلیل اثربخشی آن در حذف اکثر پروتئین‌ها و سایر آلاینده‌ها، رسوب‌دهی در مراحل اولیه در فرآیندهای خالص‌سازی هیالورونیک اسید انجام می‌شود.

حلال‌های آلی باعث دهیدراسیون و کاهش ثابت دی الکتریک محیط می‌شوند که باعث افزایش برهمکنش‌های الکترواستاتیکی شده که منجر به تجمع درون و بین مولکولی می‌شود. حلال‌هایی مثل اتانول، متانول، استون و پروپانول می‌توانند برای رسوب‌دهی به کار گرفته شوند. استفاده از اتانول و پروپانول به دلیل سمیت حلال‌هایی مانند متانول و استون ترجیح داده می‌شود. اتانول پراستفاده‌ترین حلال برای رسوب هیالورونیک اسید است، زیرا در مقایسه با سایر الکل‌ها و کتون‌ها معمولاً ارزان‌تر است. نسبت‌های ۱:۱ تا ۳:۱ حجمی-حجمی اتانول:محیط کشت برای رسوب هیالورونیک اسید حاصل از تخمیر *S. zooepidemicus* استفاده شده است [۸]. در تحقیقی، نمرود و همکاران [۴۲] امکان رسوب‌دهی چند مرحله‌ای به جای تک مرحله‌ای را برای خالص‌سازی هیالورونیک اسید تولید شده توسط *S. zooepidemicus* از محیط کشت تخمیر بررسی کردند. pH حدودا روی ۵ تنظیم شد و محیط تا دمای ۸۰ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد گرم شد و برای حذف سلول‌ها و همچنین سایر مواد نامحلول فیلتراسیون انجام شد. علاوه بر این، سه رسوب‌دهی متوالی شامل ایزوپروپانول، اتانول یا استون در توالی‌های مختلف برای رسوب هیالورونیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از دو مرحله اول، رسوب در محلول آبی استات سدیم ۳٪ قرار داده شد. خلوص نهایی بین ۸۷ تا ۹۱ درصد بود.

۳-۲- فیلتراسیون

عملیات فیلتراسیون مبتنی بر حفظ ذرات بر اساس اندازه آنها بر روی یک غشای متخلخل است. پدیده رسوب، محدودیت اصلی فیلتراسیون معمولی است که در آن انسداد منافذ در طول زمان رخ می‌دهد و مقاومت شار و افت فشار را افزایش می‌دهد. فیلتراسیون مماسی از این محدودیت با جریان تغذیه مماس به غشاء به جای جریان عمودی جلوگیری می‌کند. فرآیندهای خالص‌سازی هیالورونیک اسید معمولاً شامل فیلتراسیون و رسوب‌دهی به صورت متوالی است و در بیشتر موارد، رسوب‌دهی قبل از فیلتراسیون انجام می‌شود. با این حال، هنگامی که هر دو عملیات را به خصوص در مقیاس صنعتی با هم مقایسه می‌کنیم، عدم نیاز به مصرف مقدار قابل توجهی از حلال آلی که در روش رسوب‌دهی به کار می‌رود، به مزیت اصلی فیلتراسیون تبدیل می‌شود [۴۳]. ژو و همکاران [۴۴] خالص‌سازی هیالورونیک اسید تولید شده با کمک *S. zooepidemicus* را با استفاده متوالی از میکروفیلتراسیون (MF) و اولترافیلتراسیون (UF) مماسی مورد مطالعه قرار دادند. از غشاهای پلی‌وینیلیدین فلوراید با برش‌های ۰/۲ و ۰/۴۵ میکرومتر (MF) و ۱۰۰ و ۳۰۰ کیلو دالتون (UF) استفاده شد و ضریب تصفیه ۱۰۰۰ (محتوای پروتئین ۰/۰۷ ٪) و بازیابی ۷۷٪ هیالورونیک اسید حاصل شد.

۳-۳- جذب

عملیات جذب بر اساس قابلیت نگهداری انتخابی ترکیبات بر روی سطح جامدات متخلخل است. برای خالص‌سازی هیالورونیک اسید، جذب معمولاً در حالت ناپیوسته پس از رسوب‌دهی و/یا فیلتراسیون استفاده می‌شود. زغال فعال، به دلیل هزینه کم و در دسترس بودن، پرمصرف‌ترین جاذب است. با این وجود، استفاده از رزین‌ها و سیلیکاژل نیز رایج است [۴۵]. وون و همکاران [۴۶] غلظت‌های مختلف زغال چوب و گاما آلومینا، به تنهایی یا به صورت ترکیبی را برای خالص‌سازی هیالورونیک اسید تولید شده توسط استرپتوکوکوس مورد بررسی قرار دادند. بهترین نتایج با ترکیب ۳٪ زغال چوب و ۱/۵٪ گاما آلومینا به دست آمد که در آن هیالورونیک اسید با محتوای پروتئین ۱/۵ µg/mL حاصل شد. غلظت پروتئین ۱/۷ µg/mL و ۱/۹ µg/mL به ترتیب با استفاده جداگانه از زغال چوب ۳٪ و گاما آلومینا ۲٪ به دست آمد. برخی از ذرات جدید نیز در بازیابی و خالص‌سازی هیالورونیک اسید مورد استفاده قرار گرفتند. آکدامار و همکاران [۴۷] از ریزدانه‌ها ساخته شده از پلیمرهای اسید گلوکورونیک برای جداسازی هیالورونیک اسید از محیط کشت تخمیر استفاده کردند. حداکثر جذب ۸۱۰ میلی‌گرم هیالورونیک اسید به ازای گرم ذرات جاذب و تیتر ۲۲۶۸ میلی‌گرم هیالورونیک اسید در لیتر محیط کشت تخمیر شده به دست آمد.

۳-۴- تبادل یونی

تبادل یونی جذب انتخابی ترکیبات در اثر برهمکنش آنها با بین یک رزین با بار مخالف است. همنت و همکاران [۴۸] از کروماتوگرافی تبادل کاتیونی (Indion 225H به عنوان رزین کاتیونی) برای حذف ناخالصی‌های فلزی (کاتیون‌های محیط کشت) از هیالورونیک اسید تخمیر شده، پس از تیمار با بنتونیت و زغال چوب فعال استفاده کردند. نسبت پروتئین به هیالورونیک اسید و بازیابی هیالورونیک اسید به ترتیب ۰/۰۶٪ و ۹۹/۳٪ بود.

جدول ۱: مروری بر روش‌های به کار رفته برای خالص‌سازی هیالورونیک اسید تولید شده با استفاده از تخمیر (٪ خلوص بر مبنای خلوص هیالورونیک اسید یا درصد پروتئین باقیمانده)

۳-۶- مطالعه امکان سنجی و برآورد هزینه عملیات تخمیر

نوع میکروارگانیسم	روش خالص‌سازی	خلوص (٪)	منبع
S. zooepidemicus	رسوب‌دهی (اتانول، ۳:۲ حجمی-حجمی؛ ۴ مرحله متوالی) و کروماتوگرافی اندازه طردی (ستون Superose 6 ۱۰/۳۰۰GL)	٪۸۷ (هیالورونیک اسید)	[۴۹]
S. zooepidemicus	فیلتراسیون (جریان مماسی، UF ،۱۰۰ K Da، دیافیلتراسیون)	٪۹۰ (هیالورونیک اسید)	[۵۰]
S. zooepidemicus	رسوب‌دهی (۲-پروپانول، ۳:۱ حجمی-حجمی)؛ فیلتراسیون (۲ مرحله، الترافیلتراسیون در حالت دیافیلتراسیون)؛ جذب (زغال چوب، ۱-٪ وزنی-حجمی)	٪۹۹/۲ (هیالورونیک اسید)	[۵۱]
S. zooepidemicus	رسوب‌دهی (اتانول، ۳:۱ تا ۳:۲ حجمی-حجمی)؛ فیلتراسیون ؛ جذب (رزین آرومانیک و کربن فعال، هر کدام ٪۳ وزنی-حجمی)	٪۹۹ (هیالورونیک اسید)	[۵۲]
S .pyogenes	رسوب‌دهی (اتانول، ۳:۱ حجمی-حجمی؛ CTAB، ۰/۳۲ ٪)؛ فیلتراسیون (جریان مماسی در حالت دیافیلتراسیون)	٪۰/۱۶ (پروتئین)	[۵۳]

تولید هیالورونیک اسید در اوایل دهه ۲۰۰۰ برای کاربردهای چشمی، آرایشی و رژیمی ۱۰ تا ۲۰ تن در سال و برای کاربردهای پزشکی کمتر از ۱ تن در سال تخمین زده شد. قیمت هیالورونیک اسید در این بخش‌ها به ترتیب در محدوده ۲۰۰۰-۱۰۰۰ و ۴۰۰۰۰-۶۰۰۰۰ دلار به کیلوگرم بود [۵۴]. این تفاوت قیمت زیاد در درجه اول به دلیل خلوص بسیار بالا و تا حدی کمتر به وزن مولکولی بالاتر مورد نیاز در کاربردهای پزشکی مربوط می‌شود. انتظار می‌رود که میانگین قیمت هیالورونیک اسید به ۱۰۰۰ تا ۵۰۰۰ دلار بر کیلوگرم کاهش یابد [۵۵]. علیرغم اهمیت قابل توجه پزشکی و اقتصادی هیالورونیک اسید، مطالعات بسیار کمی در رابطه با امکان‌سنجی و تحلیل فنی-اقتصادی تولید هیالورونیک اسید انجام شده است.

فریرا و همکاران [۶] فرآیند تولید هیالورونیک اسید را با استفاده از نرم‌افزار SuperPro Designer v12 که برای شبیه‌سازی فرآیند و ارزیابی اقتصادی کاربرد دارد، شبیه‌سازی کردند. فرآیند به چهار بخش تقسیم شد: بخش بالادست، بخش بازیابی اولیه، بخش خالص‌سازی و بخش بازیافت حلال. در مجموع چهار سناریو فرآیند ایجاد شد. در سناریوهای اول و دوم فرض شد که یک محصول به شکل پودر خشک تولید می‌شود که برای فرمول‌های موضعی (مانند محصولات مراقبت از پوست) مناسب است. از سوی دیگر، در سناریوهای سوم و چهارم، ۱۰ درصد از هیالورونیک اسید بازیابی شده به سمت تولید هیالورونیک اسید بسیار خالص، استریل و با وزن مولکولی بالا که برای کاربردهای تزریقی مناسب است (مانند درمان استئوآرتریت) سوق داده شد. علاوه بر این، در سناریوهای اول و سوم فرض شد که تخمیر میکروبی در حالت ناپیوسته انجام می‌شود و تیتر (جرم خالص پروتئین در حجم کل مایع زیست‌راکتور) به ۲/۵ g/L می‌رسد، در حالی که در در سناریوهای دوم و چهارم فرض بر این بود که تخمیر در حالت ناپیوسته انجام می‌شود و تیتر به ۵ g/L می‌رسد. همچنین محل احداث این کارخانه، ایالات متحده و سال تاسیس ۲۰۲۰ در نظر گرفته شد. زمان بهره‌برداری سالانه ۳۳۰ روز در نظر گرفته شد. این فرآیند به گونه‌ای طراحی شد که زمان چرخه کلی ۲۴ ساعت در تمام سناریوها داشته باشد (یعنی هر ۲۴ ساعت یک بچ جدید شروع می‌شود). مقیاس تولید در حالت ناپیوسته، ۲۰ تن در سال تنظیم شد که تقریباً ۳٪ از تقاضای فعلی جهانی را نشان می‌دهد. باکتری *S. zooepidemicus* و محیط کشتی که حاوی گلوکز، عصاره مخمر و نمک بود برای همه‌ی سناریوها در نظر گرفته شدند. در تمام سناریوها، هوادهی VVM ۲، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، pH= ۷ و غلظت NaOH ٪۲۰ وزنی-وزنی در نظر گرفته شدند. برای بخش بازیابی اولیه یک مرحله شفاف‌سازی و یک مرحله فیلتراسیون جریان مماسی با غشای الترافیلتراسیون در نظر گرفته شد. فرض شد که بازده محصول کلی در این مرحله حدود ۹۶٪ باشد. در تمام سناریوها فرض بر این بود که بخش خالص‌سازی شامل جذب توسط کربن فعال گرانولی (GAC)، رسوب ایزوپروپانول، سانتریفیوژ و خشک کردن نمک هیالورونیک اسید با خشک‌کن پاششی باشد. ستون GAC بیشتر پروتئین‌های آلوده کننده، اسیدهای نوکلئیک، بقایای سلولی، گلوکز، استات و لاکتات را که در بخش بازیابی اولیه حذف نشده‌اند را حذف کرده و بازده‌ای برابر با ۹۵٪ داشته باشد. سپس رسوب با سانتریفیوژ از مایع رویی جدا شده و امکان بازیابی ۹۵ درصدی هیالورونیک رسوب داده شده را فراهم کند. در نهایت، کیک با خشک‌کن پاششی خشک شده تا محتوای جامد نهایی ۹۵٪ وزنی-وزنی بدست آید و مایع رویی مرحله سانتریفیوژ برای بازیابی و خالص‌سازی حلال به یک ستون تقطیر پیوسته فرستاده شود.

کل سرمایه‌گذاری (TCI) برآورد شده برای سناریوهای اول و دوم به ترتیب ۵۳/۵ و ۴۴/۳ میلیون دلار بود. سناریوهای سوم و چهارم به ترتیب به TCI بالاتر ۱۰۷ و ۸۹/۶ میلیون دلار نیاز داشتند، زیرا از مراحل اضافی برای تولید هیالورونیک اسید بسیار خالص و با وزن مولکولی بالا استفاده می‌کردند. این مراحل شامل یک سیستم فیلتراسیون جریان مماسی اضافی برای جداسازی هیالورونیک اسید با وزن مولکولی بالا از کم، و یک خشک‌کن انجمادی به جای خشک‌کن پاششی بود، زیرا خشک کردن با اسپری باعث کاهش وزن مولکولی می شود. هر دو مورد تجهیزات مستلزم هزینه های قابل توجهی برای خرید تجهیزات هستند. از سوی دیگر، سناریوهای نیمه پیوسته دوم و چهارم، نیاز به سرمایه‌گذاری کمتری نسبت به همتایان پیوسته خود دارند. دلیل آن این است که فرآیندهای نیمه پیوسته منجر به تولید محصول بالاتر (۲×) می‌شوند و بنابراین تجهیزات با ظرفیت کمتری برای تیتر همان مقدار محصول مورد نیاز است. نتایج هزینه تولید واحد (UPC) از روندهای مشابه TCI پیروی می‌کرد. سناریوهای اول و دوم به ترتیب به ۱۱۱۵ و ۹۴۶ دلار در کیلوگرم محصول منجر می‌شدند، در حالی که سناریوهای سوم و چهارم مقادیر بالاتر، به ترتیب ۱۶۹۱ و ۱۴۴۹ دلار در کیلوگرم را نشان دادند. با این حال، باید توجه داشت که این مقادیر فقط مقدار محصول اصلی تولید شده (به عنوان مثال هیالورونیک اسید "مصرف موضعی") را در برمی‌گیرد که در سناریوهای سوم و چهارم کمتر از اول و دوم است، زیرا بخشی از محصول به هیالورونیک اسید قابل تزریق تبدیل می‌شود. تأثیر مقیاس تولید بر روی UPC و TCI نیز مورد بررسی قرار گرفت. ، افزایش ۵ برابری مقیاس تولید (از ۱۰ تا ۵۰ تن در سال) تنها منجر به افزایش ۲/۶ برابری در TCI (از ۳۷/۵ به ۹۷/۲ میلیون دلار) و ۱/۵ برابری در هزینه کار سالانه شد. هزینه‌های مواد اولیه، آب و برق و مواد مصرفی متناسب با مقیاس تولید افزایش می‌یابد. کاهش هزینه‌های سرمایه و نیروی کار با افزایش مقیاس تولید منجر به کاهش عمده UPC می‌شد (از ۱۷۰۸ دلار بر کیلوگرم برای تولید ۱۰ تن در سال به ۷۵۲ دلار بر کیلوگرم برای تولید ۵۰ تن در سال). شایان ذکر است که یک فرآیند تولید پیچیده مانند آنچه در این مقاله توضیح داده شده است دارای تعداد بسیار زیادی از پارامترها است که برخی از آنها به طور دقیق شناخته شده نیستند. در نتیجه باید در نظر داشت که نتایج ارائه شده در این کار دارای درجه‌ای از عدم قطعیت است.. در کارهای آینده، تأثیر عدم قطعیت و تغییرپذیری را می توان با انجام مطالعات شبیه‌سازی مونت کارلو کمی بیشتر کرد.

۴- نتیجه گیری

با توجه به کاربردهای متنوع، علاقه به تولید در مقیاس بزرگ و مقرون به صرفه هیالورونیک اسید همچنان قوی است و به طور پیوسته در حال رشد است. S. zooepidemicus در میان تمام منابع بیولوژیکی گزارش شده بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است، زیرا از نظر تاریخی برای تولید هیالورونیک اسید استفاده می‌شده است. ارگانیسم های نوترکیب به دلیل عدم نیاز به تصفیه سموم، منابع جایگزین ایمن و مقرون به صرفه برای تولید هیالورونیک اسید در نظر گرفته می‌شوند. در بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، به ترتیب، باسیلوس و اشرشیا کلی، به دلیل در دسترس بودن تجاری، بیشترین پتانسیل را دارند. با این حال، بهره‌وری آنها هنوز نمی‌تواند با تولیدکنندگان بومی به دلیل ناپایداری پلاسمیدهای مورد استفاده برای بیان ژن مقایسه شود. قارچ‌ها از نظر سرعت رشد نسبت به باکتری‌ها برتری دارند و به محیط غذایی کمتر نیاز دارند، علاوه بر این، دستکاری ژنتیکی آنها ساده‌تر است. این

عوامل آنها را به یکی از امیدوار کننده‌ترین ارگانیسم‌ها برای تولید هیالورونیک اسید تبدیل می‌کند.

تولید اسید هیالورونیک با استفاده از میکروارگانیسم‌ها شامل فرآیند پیچیده‌ای است که شامل انتخاب سوبسترای مناسب، مکمل‌ها و شرایط کشت است. منابع جایگزین مانند ضایعات کشاورزی، ضایعات صنعتی و سوبستراهای مصنوعی را می‌توان به عنوان سوبسترا در محیط کشت استفاده کرد، اما مناسب‌ترین بستر به میکروارگانیسم‌های مورد استفاده و مقیاس تولید بستگی دارد. شرایط بهینه کشت به میکروارگانیسم‌های مورد استفاده بستگی دارد و شامل عواملی مانند دما، pH، هوادهی، همزدن و غلظت سوبسترا می‌باشد. طراحی فرمنتور نیز مهم است و به مقیاس تولید و میکروارگانیسم های مورد استفاده بستگی دارد. نوع روش کشت نیز بسیار مهم است و از آنجا که هر حالت دارای مزایا و معایب خاص خود است، محققان اغلب از ترکیبی از روش‌های مختلف کشت برای یافتن شرایطی استفاده می‌کنند که بیشترین تولید هیالورونیک اسید را به همراه داشته باشد.

خلوص هیالورونیک اسید برای کاربرد در صنایع دارویی و بهداشتی از اهمیت بالایی برخوردار است. رسوب‌دهی معمولاً در ابتدای اکثر فرآیندهای پایین دستی قرار می‌گیرد، زیرا کارایی، سهولت استفاده و هزینه نسبتا مناسبی دارد. استفاده از فیلتراسیون نیز می‌تواند کارآمد باشد، به خصوص زمانی که در حالت دیافیلتراسیون کار می‌شود. کروماتوگرافی جذب و تبادل یونی اغلب در مراحل بعدی برای تولید هیالورونیک اسید بسیار خالص استفاده می‌شوند. مطالعات آینده بهتر است بر توسعه مدل‌های ریاضی برای بهینه‌سازی فرآیند، و همچنین بهبود استراتژی‌های بالادستی با هدف کاهش تعداد و هزینه عملیات پایین‌دستی تمرکز کنند. تأثیر فرآیند بر ساختار هیالورونیک اسید و توزیع جرم مولی آن نیز باید با توجه به فعالیت بیولوژیکی آن بررسی شود.

مراجع

[1] [1] P. Zhai, X. Peng, B. Li, Y. Liu, H. Sun, X. Li, The application of hyaluronic acid in bone regeneration, Int J Biol Macromol 151 (2020) 1224–1239. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.10.169.

[2] C.D. Rodriguez-marquez, S. Arteaga-marin, A. Rivas-sánchez, R. Autrique-hernández, R. Castro-muñoz, A Review on Current Strategies for Extraction and Purification of Hyaluronic Acid, International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 6038 23 (2022) 6038. https://doi.org/10.3390/IJMS23116038.

[3] A.G. Tavianatou, I. Caon, M. Franchi, Z. Piperigkou, D. Galesso, N.K. Karamanos, Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer, FEBS J 286 (2019) 2883–2908. https://doi.org/10.1111/FEBS.14777.

[4] M. Serra, A. Casas, D. Toubarro, A.N. Barros, J.A. Teixeira, Microbial Hyaluronic Acid Production: A Review, Molecules 2023, Vol. 28, Page 2084 28 (2023) 2084. https://doi.org/10.3390/MOLECULES28052084.

[5] N. Gallo, H. Nasser, L. Salvatore, M.L. Natali, L. Campa, M. Mahmoud, L. Capobianco, A. Sannino, M. Madaghiele, Hyaluronic acid for advanced therapies: Promises and challenges, Eur Polym J 117 (2019) 134–147. https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2019.05.007.

[6] R.G. Ferreira, A.R. Azzoni, M.H.A. Santana, D. Petrides, Techno-Economic Analysis of a Hyaluronic Acid Production Process Utilizing Streptococcal Fermentation, Processes 2021, Vol. 9, Page 241 9 (2021) 241. https://doi.org/10.3390/PR9020241.

[7] C.G. Boeriu, J. Springer, F.K. Kooy, L.A.M. van den Broek, G. Eggink, Production Methods for Hyaluronan, International Journal of Carbohydrate Chemistry 2013 (2013) 624967. https://doi.org/10.1155/2013/624967.

[8] A.D.D. Cavalcanti, B.A.G. de Melo, B.A.M. Ferreira, M.H.A. Santana, Performance of the main downstream operations on hyaluronic acid purification, Process Biochemistry 99 (2020) 160–170. https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2020.08.020.

[9] E. V. Shikina, R.A. Kovalevsky, A.I. Shirkovskaya, P. V. Toukach, Prospective bacterial and fungal sources of hyaluronic acid: A review, Comput Struct Biotechnol J 20 (2022) 6214–6236. https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2022.11.013.

[10] T. Yoshimura, N. Shibata, Y. Hamano, K. Yamanaka, Heterologous production of hyaluronic acid in an ε-Poly-L-Lysine producer, Streptomyces albulus, Appl Environ Microbiol 81 (2015) 3631–3640. https://doi.org/10.1128/AEM.00269-15/ASSET/D9173733-EC34-49B2-807B-4E2A7E43D797/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991162670006.JPEG.

[11] A.W. Westbrook, X. Ren, M. Moo-Young, C.P. Chou, Engineering of cell membrane to enhance heterologous production of hyaluronic acid in Bacillus subtilis, Biotechnol Bioeng 115 (2018) 216–231. https://doi.org/10.1002/BIT.26459.

[12] M. Karami, M.K. Shahraky, M. Ranjbar, F. Tabandeh, D. Morshedi, S. Aminzade, Preparation, purification, and characterization of low-molecular-weight hyaluronic acid, Biotechnol Lett 43 (2021) 133–142. https://doi.org/10.1007/S10529-020-03035-4/METRICS.

[13] F.M. Reda, S.M. El-Shanawany, Characterization and Immobilization of a Novel Hyaluronidase Produced by Streptomyces roseofulvus, Egyptian Journal of Botany 60 (2020) 213–224. https://doi.org/10.21608/EJBO.2019.6242.1248.

[14] L. Zhang, T. Toscano Selão, P.J. Nixon, B. Norling, Photosynthetic conversion of CO_2 to hyaluronic acid by engineered strains of the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002, Algal Res 44 (2019) 101702. https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2019.101702.

[15] C. Sunguroğlu, D.E. Sezgin, P. Aytar Çelik, A. Çabuk, Higher titer hyaluronic acid production in recombinant Lactococcus lactis, Prep Biochem Biotechnol 48 (2018) 734–742. https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1508036.

[16] P.L. DeAngelis, W. Jing, R.R. Drake, A.M. Achyuthan, Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from Pasteurella multocida, Journal of Biological Chemistry 273 (1998) 8454–8458. https://doi.org/10.1074/JBC.273.14.8454.

[17] J.E. Woo, H.J. Seong, S.Y. Lee, Y.S. Jang, Metabolic Engineering of Escherichia coli for the Production of Hyaluronic Acid from Glucose and Galactose, Front Bioeng Biotechnol 7 (2019) 496333. https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00351/BIBTEX.

[18] Z. Mao, R.R. Chen, Recombinant Synthesis of Hyaluronan by Agrobacterium sp., Biotechnol Prog 23 (2007) 1038–1042. https://doi.org/10.1021/BP070113N.

[19] A.M.V. Gomes, J.H.C.M. Netto, L.S. Carvalho, N.S. Parachin, Heterologous Hyaluronic Acid Production in Kluyveromyces lactis, Microorganisms 2019, Vol. 7, Page 294 7 (2019) 294. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7090294.

[20] J.H. Im, J.M. Song, J.H. Kang, D.J. Kang, Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by Streptococcus sp. ID9102 via a statistical

Biochem Eng J 32 (2006) 239–243. https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2006.10.011.

[35] L. Liu, G. Du, J. Chen, M. Wang, J. Sun, Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of Streptococcus zooepidemicus, Bioprocess Biosyst Eng 32 (2009) 755–763. https://doi.org/10.1007/S00449-009-0300-6/METRICS.

[36] Z.W. Lai, R.A. Rahim, A.B. Ariff, R. Mohamad, Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by Streptococcus zooepidemicus using oxygen vector and optimum impeller tip speed, J Biosci Bioeng 114 (2012) 286–291. https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2012.04.011.

[37] J.H. Kim, S.J. Yoo, D.K. Oh, Y.G. Kweon, D.W. Park, C.H. Lee, G.H. Gil, Selection of a Streptococcus equi mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid, Enzyme Microb Technol 19 (1996) 440–445. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00019-1.

[38] P. Jeeva, S. Shanmuga Doss, V. Sundaram, G. Jayaraman, Production of controlled molecular weight hyaluronic acid by glucostat strategy using recombinant Lactococcus lactis cultures, Appl Microbiol Biotechnol 103 (2019) 4363–4375. https://doi.org/10.1007/S00253-019-09769-0/METRICS.

[39] L. Liu, G. Du, J. Chen, M. Wang, J. Sun, Influence of culture modes on the microbial production of hyaluronic acid by Streptococcus zooepidemicus, Biotechnology and Bioprocess Engineering 13 (2008) 269–273. https://doi.org/10.1007/S12257-007-0193-7/METRICS.

[40] S.J. Chen, J.L. Chen, W.C. Huang, H.L. Chen, Fermentation process development for hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus ATCC 39920, Korean Journal of Chemical Engineering 26 (2009) 428–432. https://doi.org/10.1007/S11814-009-0072-3/METRICS.

[41] Y. Zhang, J. Dong, G. Xu, R. Han, J. Zhou, Y. Ni, Efficient production of hyaluronic acid by Streptococcus zooepidemicus using two-stage semi-continuous fermentation, Bioresour Technol 377 (2023) 128896. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2023.128896.

[42] Nimrod A, Greenman B, Kanner D, Landsberg M, inventors; Bio Technology General Corp, assignee. Method of producing high molecular weight sodium hyaluronate by fermentation of streptococcus. (1986).

[43] B.M. Yapo, B. Wathelet, M. Paquot, Comparison of alcohol precipitation and membrane filtration effects on sugar beet pulp pectin chemical features and surface properties, Food Hydrocoll 21 (2007) 245–255. https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2006.03.016.

[44] H. Zhou, J. Ni, W. Huang, J. Zhang, Separation of hyaluronic acid from fermentation broth by tangential flow microfiltration and ultrafiltration, Sep Purif Technol 52 (2006) 29–38. https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2006.03.011.

[45] S. Choi, W. Choi, S. Kim, S.Y. Lee, I. Noh, C.W. Kim, Purification and biocompatibility of fermented hyaluronic acid for its applications to biomaterials, Biomater Res 18 (2014). https://doi.org/10.1186/2055-7124-18-6/SUPPL_FILE/2055-7124-18-6.F5.TIF.

[46] T.Y. Won, C. Lee, S.H. Seo, Method for purifying hyaluronic acid, Patent WO2008062998 (2008).

[47] H.A. Akdamar, N.Y. Sariözlü, A.A. Özcan, A. Ersöz, A. Denizli, R. Say, Separation and purification of hyaluronic acid by glucuronic acid imprinted microbeads, Materials Science and Engineering: C 29 (2009) 1404–1408. https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2008.10.038.

approach, J Ind Microbiol Biotechnol 36 (2009) 1337–1337. https://doi.org/10.1007/S10295-009-0618-8.

[21] M. V. Shah, S.S. Badle, K.B. Ramachandran, Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway, Biochem Eng J 80 (2013) 53–60. https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2013.09.013.

[22] S.J. Chen, J.L. Chen, W.C. Huang, H.L. Chen, Fermentation process development for hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus ATCC 39920, Korean Journal of Chemical Engineering 26 (2009) 428–432. https://doi.org/10.1007/S11814-009-0072-3/METRICS.

[23] V. Aroskar, V.J. Aroskar, S.D. Kamat, D. V Kamat, Effect of Various Nutritional Supplements on Hyaluronic Acid Production, IIOAB Letters 2 (2013). https://doi.org/10.5195/iioablett.2012.18.

[24] F.F. Chahuki, S. Aminzadeh, V. Jafarian, F. Tabandeh, M. Khodabandeh, Hyaluronic acid production enhancement via genetically modification and culture medium optimization in Lactobacillus acidophilus, Int J Biol Macromol 121 (2019) 870–881. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.10.112.

[25] J. Hoffmann, J. Altenbuchner, Hyaluronic acid production with Corynebacterium glutamicum: effect of media composition on yield and molecular weight, J Appl Microbiol 117 (2014) 663–678. https://doi.org/10.1111/JAM.12553.

[26] I.R. Amado, J.A. Vázquez, L. Pastrana, J.A. Teixeira, Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus, Food Chem 198 (2016) 54–61. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.11.062.

[27] N.P. Arslan, M.N. Aydogan, Evaluation of Sheep Wool Protein Hydrolysate and Molasses as Low-Cost Fermentation Substrates for Hyaluronic Acid Production by Streptococcus zooepidemicus ATCC 35246, Waste Biomass Valorization 12 (2021) 925–935. https://doi.org/10.1007/S12649-020-01062-W/METRICS.

[28] S.G. Rohit, P.K. Jyoti, R.R.T. Subbi, M. Naresh, S. Senthilkumar, Kinetic modeling of hyaluronic acid production in palmyra palm (Borassus flabellifer) based medium by Streptococcus zooepidemicus MTCC 3523, Biochem Eng J 137 (2018) 284–293. https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2018.06.011.

[29] D.C. Armstrong, M.R. Johns, Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by Streptococcus zooepidemicus, Appl Environ Microbiol 63 (1997) 2759–2764. https://doi.org/10.1128/AEM.63.7.2759-2764.1997.

[30] Y. Li, Z. Shi, Y. Shao, M. Wu, G. Li, T. Ma, Temperature-controlled molecular weight of hyaluronic acid produced by engineered Bacillus subtilis, Biotechnol Lett 43 (2021) 271–277. https://doi.org/10.1007/S10529-020-03001-0/METRICS.

[31] J. Liu, Y. Wang, Z. Li, Y. Ren, Y. Zhao, G. Zhao, Efficient production of high-molecular-weight hyaluronic acid with a two-stage fermentation, RSC Adv 8 (2018) 36167–36171. https://doi.org/10.1039/C8RA07349J.

[32] M.R. Johns, L.T. Goh, A. Oeggerli, Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus, Biotechnol Lett 16 (1994) 507–512. https://doi.org/10.1007/BF01023334/METRICS.

[33] A. Zakeri, M.J. Rasaee, Identification of wild type Streptococcus Zooepidemicus and optimization of culture medium and fermentation conditions for production of hyaluronic acid, Biosci Biotechnol Res Asia 13 (2016) 189–198. https://doi.org/10.13005/BBRA/2022.

[34] W.C. Huang, S.J. Chen, T.L. Chen, The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation,

[48] P.N. Hemant, T. Sonal, R. Bondalakunta, Process for the purification of hyaluronic acid salts (HA) from fermentation broth, Patent WO2013132506 (2013).

[49] A.S. Sousa, A.P. Guimarães, C. V. Goncalves, I.J. Silva, C.L. Cavalcante, D.C.S. Azevedo, Purification and Characterization of Microbial Hyaluronic Acid by Solvent Precipitation and Size-Exclusion Chromatography, Sep Sci Technol 44 (2009) 906–923. https://doi.org/10.1080/01496390802691281.

[50] N. Oueslati, P. Leblanc, A. Bodin, C. Harscoat-Schiavo, E. Rondags, S. Meunier, I. Marc, R. Kapel, A simple methodology for predicting the performances of hyaluronic acid purification by diafiltration, J Memb Sci 490 (2015) 152–159. https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2015.04.024.

[51] K. Jagadeeswara Reddy, K. Karunakaran, Purification and characterization of hyaluronic acid produced by Streptococcus zooepidemicus strain, J. BioSci. Biotechnol. 2(3) (2013) 3523-7.

[52] HY. Han, SH. Jang, EC. Kim, JK. Park, YJ. Han, C. Lee, HS. Park, YC. Kim, HJ. Park, inventors; Kolon Life Science Inc, Vacctech Corp, assignee. Microorganism producing hyaluronic acid and purification method of hyaluronic acid. United States patent US 7,575,914. (2009).

[53] J.W. Bracke, K. Thacker, Hyaluronic acid from bacterial culture., United States patent US 4,517,295 (1985).

[54] B.F. Chong, L.M. Blank, R. Mclaughlin, L.K. Nielsen, Microbial hyaluronic acid production, Appl Microbiol Biotechnol 66 (2005) 341–351. https://doi.org/10.1007/S00253-004-1774-4/METRICS.

[55] J.D. de Oliveira, L.S. Carvalho, A.M.V. Gomes, L.R. Queiroz, B.S. Magalhães, N.S. Parachin, Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms, Microb Cell Fact 15 (2016) 1–19. https://doi.org/10.1186/S12934-016-0517-4/TABLES/3.