



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Crescimento Celular e Produção de Ácido Hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920

**Nicole Caldas Pan¹, Hanny Cristina Braga Pereira¹, Josiane Alessandra Vignoli¹,
Agnes Magri¹, Maria Antonia P. Colabone Celligoi¹**

¹Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Caixa Postal 10-011 – CEP 86.057-970 Londrina – Paraná - E-mail: nicolepan.eq@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento celular e a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. O cultivo foi realizado em batelada em meio BHI (Infusão de Cérebro e Coração) a 37°C, 150 rpm por 24 horas. Amostras foram coletadas a cada 2 horas. A velocidade específica de crescimento microbiano foi de 0,235 h⁻¹, com uma biomassa de 0,613 g.L⁻¹ após 12 horas de cultivo, sendo a produção de ácido hialurônico 0,215 g/L. O maior valor atingido para o polímero foi de 0,229 g.L⁻¹ após 24 horas de cultivo.

Palavras-chave: Ácido Hialurônico, Crescimento Celular, *Streptococcus*

INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é o único glicosaminoglicano não covalentemente associado a um núcleo proteico e não sulfatado (KOGAN et al., 2007). O polímero é não imunogênico e esta característica, associada a sua elevada viscoelasticidade, tem levado à aplicação do ácido hialurônico em cosméticos (ITO, 2014; STERN; MAIBACH, 2008), cirurgias oftalmológicas (KRETZ; LIMBERGER; AUFFARTH, 2014; PRASAD; JAYARAMAN; RAMACHANDRAN, 2010), engenharia de tecidos (COLLINS; BIRKINSHAW, 2013; SU et al., 2014), tratamento de osteoartrite (YU et al., 2014) e sistema de administração de fármacos (BROWN; JONES, 2005; MAYOL et al., 2008).

Comercialmente, o polímero é extraído da crista de galo ou produzido por fermentação microbiana. O ácido hialurônico microbiano é sintetizado como uma cápsula extracelular por *Streptococcus*, em particular *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* (CHONG et al., 2005). A síntese do ácido hialurônico é responsável por 5 a 10% do carbono metabolizado pela bactéria, sendo que as unidades de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina, que constituem as moléculas do polímero, são derivadas de glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, respectivamente (CHONG; NIELSEN, 2003).

A composição do meio de cultivo influencia diretamente no metabolismo de *Streptococcus* que requer meio rico em aminoácidos, nucleotídeos e vitaminas, necessários ao crescimento e produção do polímero (MARCELLIN; CHEN; NIELSEN, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento celular e a produção de ácido hialurônico, por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em meio de Infusão de Cérebro e Coração (Brain Heart Infusion - BHI).

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e Inóculo: *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 foi obtido da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústrias (CBMAI) e mantido em solução salina contendo 50% v/v de glicerol a -80°C . Para obtenção do inóculo, a cultura estoque foi estriada em placas de Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI ágar) e incubadas por 24 horas a 37°C .

Condições de Cultivo: *S. zooepidemicus* foi crescido em Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio BHI líquido (37 g.L^{-1}) a 37°C e 150 rpm. Amostras foram retiradas a cada 2 horas, durante 24 h. O cultivo foi interrompido por centrifugação a $9.956 \times g$ por 15 min, a 4°C . Das amostras foram quantificados o ácido hialurônico e o crescimento celular.

Métodos Analíticos: O crescimento celular foi determinado por turbidimetria a $\lambda=600\text{ nm}$ e correlacionada à curva de biomassa em g.L^{-1} . A quantificação do ácido hialurônico foi em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE), equipado com coluna OHPak SB- 806M HQ 80 \times 300mm (Shodex, Japan) a 40°C , solução de NaNO_3 0,1 M a 1 mL.min^{-1} como fase móvel e detector de índice de refração (Shimadzu RID-10A). O padrão utilizado foi de hialuronato de sódio (Sigma-Aldrich Brasil Ltda).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante o cultivo de *S. zooepidemicus* em meio BHI estão apresentados na Figura 1, onde o crescimento celular apresentou uma fase exponencial de 2 a 8 horas, com velocidade específica de crescimento microbiano de $0,235\text{ h}^{-1}$. Trabalhos de Don e Shoparwe (2010) e Liu et al. (2009), avaliando diferentes meios de fermentação, observaram resultados semelhantes, com fase exponencial de crescimento entre 2 a 8 h de cultivo. A maior biomassa foi de $0,613\text{ g.L}^{-1}$, em 12 horas de cultivo, onde a produção de ácido hialurônico foi de $0,215\text{ g.L}^{-1}$. Após 24 horas, a produção do polímero atingiu $0,229\text{ g.L}^{-1}$. Izawa et al. (2010) em meio à base de leite enriquecido com peptona de soja, obtiveram uma produção de $0,208\text{ g.L}^{-1}$ em cultivo por *S. thermophilus* YIT 2084. A produção de ácido hialurônico acompanhou o crescimento celular e a maior produtividade foi obtida após 8 horas de cultivo, sendo esta de $0,023\text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

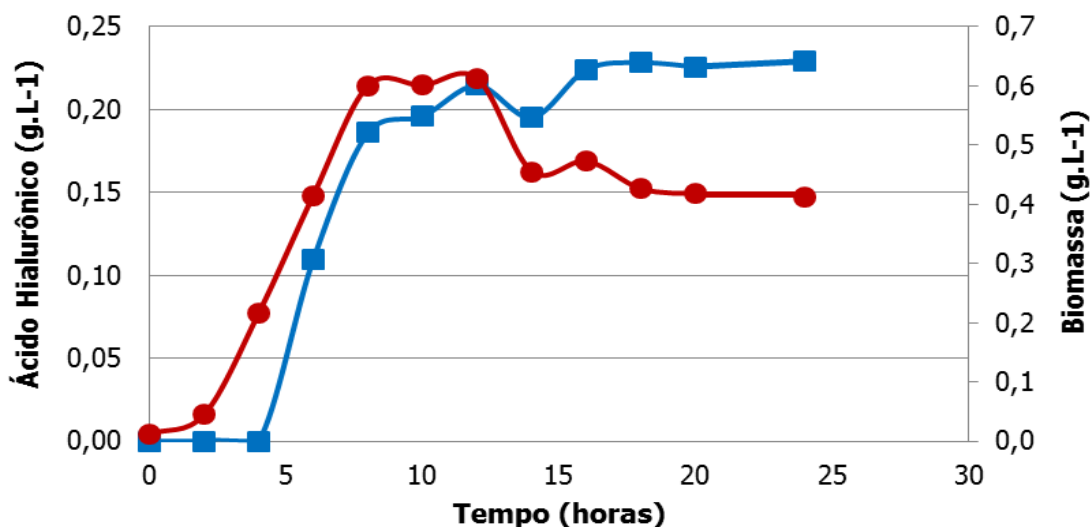


Figura 1 – Cinética de crescimento celular (●) e produção de ácido hialurônico (■) por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em meio Brain Heart Infusion.

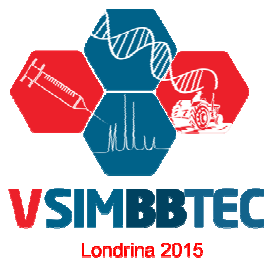
CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 teve a fase de crescimento exponencial entre 2 a 8 horas e a maior produção de ácido hialurônico foi de 0,229 g.L⁻¹. Este resultado se torna de interesse para a escolha do tempo adequado para o preparo do inóculo em diferentes fermentações.

Agências de Fomento: Capes

REFERÊNCIAS

- BROWN, M. B.; JONES, S. A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 19, n. 3, p. 308–18, 2005.
- CHONG, B. F.; BLANK, L. M.; MCLAUGHLIN, R.; NIELSEN, L. K. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 341–351, 2005.
- CHONG, F. B.; NIELSEN, L. K. Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 2, p. 153–162, 2003.
- COLLINS, M. N.; BIRKINSHAW, C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering--a review. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1262–79, 2013.
- DON, M. M.; SHOPARWE, N. F. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 1, p. 95–103, 2010.
- ITO, A. The effects of a hyaluronan lotion with a molecular weight of around 50 - 110 kDa on the aged atrophic skin. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 04, n. 03, p. 150–155, 2014.
- IZAWA, N.; HANAMIZU, T.; SONE, T.; CHIBA, K. Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by *Streptococcus thermophilus* strain YIT 2084 in milk. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 356–60, 2010.



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

- KOGAN, G.; SÖLTÉS, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 1, p. 17–25, 2007.
- KRETZ, F. T. A.; LIMBERGER, I.-J.; AUFFARTH, G. U. Corneal endothelial cell coating during phacoemulsification using a new dispersive hyaluronic acid ophthalmic viscosurgical device. **Journal of Cataract and Refractive surgery**, v. 40, n. 11, p. 1879–1884, 2014.
- LIU, L.; DU, G.; CHEN, J.; ZHU, Y.; WANG, M.; SUN, J. Microbial production of low molecular weight hyaluronic acid by adding hydrogen peroxide and ascorbate in batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 362–367, 2009.
- MARCELLIN, E.; CHEN, W.; NIELSEN, L. K. Microbial hyaluronic acid biosynthesis. In: REHM, B. H. A. (Ed.). **Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives**. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. p. 163–180.
- MAYOL, L.; QUAGLIA, F.; BORZACCHIELLO, A.; AMBROSIO, L.; ROTONDA, M. I. A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and in vitro release properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 1, p. 199–206, 2008.
- PRASAD, S. B.; JAYARAMAN, G.; RAMACHANDRAN, K. B. Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 1, p. 273–83, 2010.
- STERN, R.; MAIBACH, H. I. Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. **Clinics in Dermatology**, v. 26, n. 2, p. 106–22, 2008.
- SU, Z.; MA, H.; WU, Z.; ZENG, H.; LI, Z.; WANG, Y.; LIU, G.; XU, B.; LIN, Y.; ZHANG, P.; WEI, X. Enhancement of skin wound healing with decellularized scaffolds loaded with hyaluronic acid and epidermal growth factor. **Materials science & engineering. C**, v. 44, p. 440–8, 2014.
- YU, C.-J.; KO, C.-J.; HSIEH, C.-H.; CHIEN, C.-T.; HUANG, L.-H.; LEE, C.-W.; JIANG, C.-C. Proteomic analysis of osteoarthritic chondrocyte reveals the hyaluronic acid-regulated proteins involved in chondroprotective effect under oxidative stress. **Journal of Proteomics**, v. 99, p. 40–53, 2014.