

INFLUÊNCIA DA CARDIOLIPINA NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO UTILIZANDO PEPTONA DE SOJA OU EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTES DE NITROGÊNIO EM FERMENTAÇÕES SUBMERSAS

D. S. P. MOREIRA¹, R. C. OLIVEIRA¹, M. H. A. SANTANA¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: daniela.pataro.m@gmail.com

RESUMO – O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear com diversas aplicações nas áreas biomédicas e farmacológicas. Este trabalho teve por objetivo estudar a influência da cardiolipina na produção do AH através de fermentação submersa utilizando o *Streptococcus zooepidemicus* ATTC 39920. O meio de cultura foi composto de glicose (25 g.L⁻¹), como fonte de carbono e peptona de soja ou extrato de levedura, como fontes de nitrogênio e cardiolipina (30 mg.L⁻¹). Cultivos na ausência de cardiolipina foram usados como controle. O desempenho das fermentações foi analisado em termos de concentração celular, concentração de AH e rendimento $Y_{p/X}$ (AH/células). Dos resultados obtidos concluiu-se que a cardiolipina elevou significativamente a produção de AH, principalmente quando a fonte de nitrogênio foi a peptona de soja.

1. INTRODUÇÃO

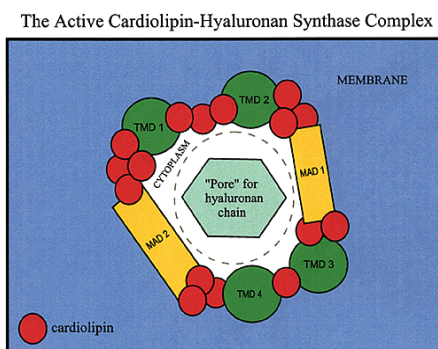
O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo formado por repetidas unidades dissarídicas de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina unidas através de ligações glicosídicas β -1-3 e β -1-4. O ácido hialurônico é um dos componentes da matriz extracelular dos vertebrados e está presente principalmente em cartilagens, cordão umbilical, pele, humor vítreo e fluido sinovial. Devido a sua alta retenção de água, viscoelasticidade e biocompatibilidade, o AH possui diversas aplicações farmacêuticas, médicas e cosméticas.

Bactérias do gênero *Streptococcus* também produzem AH. O AH produzido por via microbiana é puro, biocompatível e apresenta as mesmas propriedades do AH produzido em humanos. Nesses microrganismos o AH é sintetizado no interior das células e excretado através da membrana celular, formando uma barreira que protege a célula do stress causado pelo meio ao qual está exposta.

Na produção do AH, a enzima hialuronidase sintase (HAS) é responsável pela síntese e alongação da cadeia de AH, essa enzima também participa do processo de extrusão do AH através da membrana celular. Como a membrana celular é constituída por uma parte hidrofóbica e uma parte lipídica, Weigel (1998) concluiu que a cardiolipina age juntamente com a enzima HAS na extrusão do AH, ou seja, a parte lipídica da cardiolipina interagiria com a bicamada lipídica da membrana bacteriana e as porções hidrofóbicas da cadeia de AH, enquanto os grupos ácidos da cardiolipina interagiriam com a enzima e as porções

hidrofílicas da cadeia de AH. Assim, os fosfolípidos e as enzimas criariam uma passagem na membrana na forma de poro, através do qual o AH sintetizado seria mais facilmente extrudado. Um esquema da atuação da cardiolipina juntamente com a enzima HAS pode ser visto na Figura 1.

Figura 1 - Modelo para o complexo cardiolipina - hialuronidase sintase (Weigel, 1998).



Nos últimos 10 anos, a indústria farmacêutica e cosmética tem se posicionado contra a utilização de fontes de origem animal em cultivos microbianos por razões de segurança. Pires *et al.* (2010), utilizaram derivados agrícolas em meios de cultura para a produção de AH, o suco de caju em conjunto com o extrato de levedura foi considerado um meio promissor para a produção de AH, com uma concentração de 0,89 g.L⁻¹ em cultivos com aeração natural. Benedini e Santana (2012) demonstraram a eficiência de peptona de soja como fonte de nitrogênio em cultivos com aeração natural utilizando extrato de levedura e glicose como controle.

Considerando o mecanismo proposto por Weigel (1998) e a importância da fonte de nitrogênio na produção do AH, este trabalho foi conduzido de modo a avaliar o efeito da cardiolipina em fermentações com extrato de levedura ou peptona de soja como fontes de nitrogênio.

2. OBJETIVO

Estudar os efeitos da cardiolipina na produção do ácido hialurônico por fermentação submersa utilizando o *Streptococcus zooepidemicus*, em meios de cultura contendo glicose como fonte de carbono e peptona de soja ou extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

Uma cepa do microrganismo *Streptococcus equi*, *subsp. zooepidemicus* ATCC 39920, obtida através da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) como cultura liofilizada, foi mantida congelada a -80 °C, em ampolas contendo glicerol (10%) como crioprotetor.

3.2. Inóculo

Uma ampola contendo a cultura de *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus* ATCC 39920 foi descongelada e semeada em placas de Petri contendo agar e peptona de soja (67g.L^{-1}) (Benedini e Santana 2013) e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. As colônias foram transferidas das placas de Petri para frascos Erlenmeyer (50 mL) contendo 10 mL de meio de cultura. Esses frascos foram incubados sob agitação (150 rpm) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 12 h. Em dois dos frascos Erlenmeyer o cultivo foi conduzido com glicose e peptona de soja e nos outros dois com extrato de levedura e glicose. A razão glicose : nitrogênio utilizada foi de 4,3 : 1 para todos os cultivos.

3.3. Fermentação

O inóculo foi transferido a 10% v/v para os frascos Erlenmeyer (250 mL), contendo as mesmas concentrações de glicose, peptona de soja ou extrato de levedura. A cardiolipina foi adicionada na concentração $30,0\text{ mg.L}^{-1}$. No total foram realizadas 8 fermentações. Todos os frascos foram incubados a 150 rpm, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 h. Ao final deste período foram coletadas amostras para as análises em triplicata.

3.4. Separação e Purificação do AH

O caldo fermentado foi centrifugado a 3200 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante isento de células foi tratado com etanol a 1.5:1 v/v (etanol : caldo). A solução foi refrigerada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h para a precipitação do AH, e em seguida foi centrifugada novamente a 3200 rpm durante 20 minutos. Uma solução de NaCl 0.15 mol.L^{-1} foi adicionada ao AH precipitado. O processo de precipitação com etanol e centrifugação da solução refrigerada foi realizado por mais duas vezes consecutivas.

3.5. Métodos Analíticos

Crescimento celular: O crescimento celular foi determinado em triplicata de acordo com o método gravimétrico. Ao final da fermentação, uma amostra contendo 10 mL do caldo fermentado foi retirada e centrifugada em tubo previamente seco e pesado. Após a centrifugação o caldo residual foi separado e as células lavadas com água deionizada e centrifugada mais duas vezes. Finalmente, as células foram secas e pesadas para o método gravimétrico.

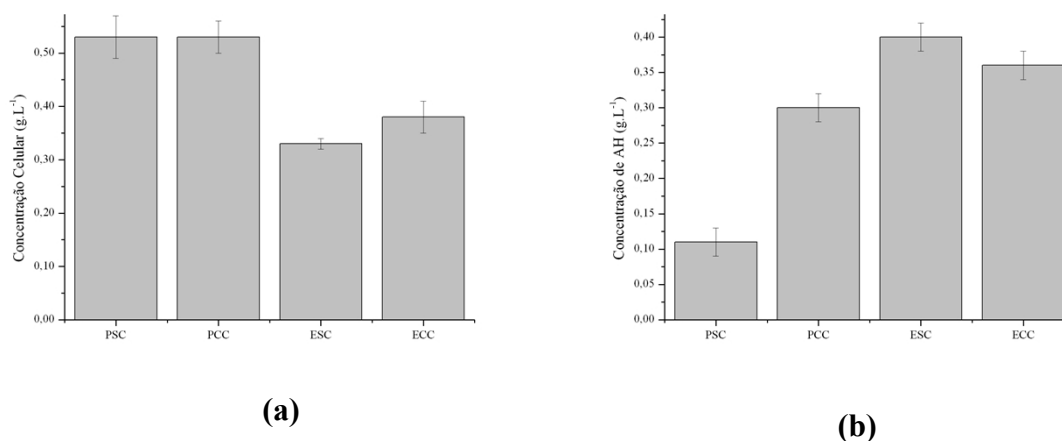
Concentração de AH: Foi aplicado o método turbidimétrico para determinar o teor de ácido hialurônico no caldo fermentado como descrito por Chen e Wang (2009). Hialuronato de sódio (Hylumed TM) da Genzyme Corporation (Cambridge, MA, EUA) foi utilizado como padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados finais de concentração celular e concentração de AH representam a média aritmética da duplicata dos cultivos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

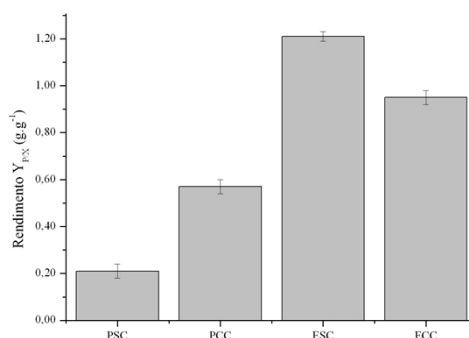
A Figura 2 (a) mostra a influência da cardiolipina na concentração celular e a Figura 2 (b) na concentração de AH. Os resultados mostram claramente um aumento da concentração de AH com a adição de cardiolipina no meio de cultura contendo peptona de soja, comparado ao meio contendo extrato de levedura. Os efeitos da cardiolipina na concentração celular foram menos expressivos.

Figura 2 – (a) Concentração celular e (b) Concentração de AH. Legendas: PSC (Peptona de soja sem cardiolipina), PCC (Peptona de soja com cardiolipina), ESC (Extrato de levedura sem cardiolipina) e ECC (Extrato de levedura com cardiolipina).



Em ambos os casos os resultados mostram que quanto maior a concentração celular, menor a produção de ácido hialurônico. Isso ocorre devido a utilização da energia para o crescimento celular em detrimento da produção do AH, nesse caso o extrato de levedura apresentou melhores resultados em termos de rendimento, que representa a quantidade de AH produzida em relação às células ($Y_{P/X}$). A Figura 3 exibe a influência da cardiolipina no rendimento $Y_{P/X}$.

Figura 3 – Influência da cardiolipina no rendimento $Y_{P/X}$. Legendas: PSC (Peptona de soja sem cardiolipina), PCC (Peptona de soja com cardiolipina), ESC (Extrato de levedura sem cardiolipina) e ECC (Extrato de levedura com cardiolipina).



Com relação ao rendimento $Y_{p/X}$, o meio de cultura contendo peptona de soja e glicose exibiu um aumento de aproximadamente 3 vezes com a adição de cardiolipina em relação ao controle (Figura 3). O meio de cultura contendo extrato de levedura e glicose resultou em uma queda de rendimento $Y_{p/X}$ de aproximadamente 16% com a adição de cardiolipina em relação ao controle.

Comparando os resultados dos dois meios de cultura utilizados, podemos observar uma nítida vantagem do extrato de levedura em relação a peptona de soja em termos de rendimento na produção de AH (Figura 3). Esta vantagem pode estar relacionada à concentração de aminoácidos livres presentes no extrato de levedura, sendo este um parâmetro importante para a produção de AH segundo Armstrong *et al.* (1997). No entanto, a utilização de fontes vegetais de meio de cultura pode proporcionar vantagens para a purificação e comercialização do AH, principalmente para aplicações farmacêuticas. Além disso a massa molar, um parâmetro muito importante na produção de AH deve ser futuramente avaliada na presença das duas fontes de nitrogênio utilizadas neste trabalho e da cardiolipina.

5. CONCLUSÃO

A utilização de cardiolipina em meio de cultura contendo peptona de soja e glicose, aumentou a produção de AH em fermentação submersa utilizando o *Streptococcus zooepidemicus*.

6. NOMENCLATURA

AH – Ácido hialurônico
ECC – Extrato de levedura com cardiolipina
ESC – Extrato de levedura sem cardiolipina
HAS – Hialuronidase sintase
PCC – Peptona de soja com cardiolipina
PSC – Peptona de soja sem cardiolipina

7. REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, D. C.; COONEY, M. J.; JOHNS, M. R. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 47, p. 309–312, 1997.
- BENEDINI, L. J.; SANTANA M. H. A. Effects of vegetables peptones on the microbial production and purity of hyaluronic acid. State University of Campinas. (MSc. Thesis), 2012.
- BENEDINI, L. J.; SANTANA M. H. A. *Effects of soy peptone on inoculums preparation of Streptococcus zooepidemicus for production of hyaluronic acid. State University of Campinas.*(MSc. Thesis). 2013.
- CHEN, Y. H.; WANG, Q. Establishment of CTAB Turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth. *Carbohydrate Polymers*. 78, p. 178–181, 2009.
- PIRES, A. M. B.; MACEDO, A. C.; EGUCHI, S. Y.; SANTANA, M. H. A. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource Technology*. v. 101. p. 6506–6509, 2010.
- WEIGEL, P. H. *Bacterial Hyaluronan Synthases: Glycoforum - Hyaluronan Today*. Original Issue August 15, 1998. Disponível em: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html>>.