



III SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia
Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

Influência do pH, Temperatura e Agitação na Produção de Ácido Hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920.

Nicole Caldas Pan¹, Renan Cantanti Marques¹, Hanny Cristina Braga Pereira¹, Agnes Magri¹ Dieyssi A. Santos¹, Josiane A. Vignoli¹, Maria Antonia P. Colabone Celligoi¹

¹ Universidade Estadual de Londrina - Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Caixa Postal 10011 – CEP 86057-970 Londrina – Pr - E-mail: nicolepan.eq@gmail.com

RESUMO

O número de aplicações na área médica e cosmética atribuídas ao ácido hialurônico (AH) e o seu alto valor agregado justificam estudar as condições de cultivo para a otimização da produção do AH por microrganismos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de AH por *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 por planejamento fatorial utilizando como variáveis o pH (6,0; 6,5; 7,0), a temperatura (34; 37; 40°C) e a agitação do meio de cultivo (100; 150; 200 rpm). A melhor produção de AH obtida foi de 0,251 g.L⁻¹ em pH 7,0, temperatura de 40°C e agitação 200 rpm. Somente o pH e a agitação foram significativos dentro das condições estudadas. Os resultados indicaram que não foi possível atingir o pH ótimo para produção de AH, e que portanto, uma nova faixa de pH deve ser avaliada, buscando o ponto ótimo.

Palavras-chave: Box-behken, Fermentação, Otimização, Parâmetros Físicos.

INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear de alta massa molecular constituído de unidades dissacarídicas repetidas de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina¹. Esse polímero apresenta características hidrofílicas e viscoelásticas que indicam um grande potencial de aplicações médicas, nas áreas de oftalmologia, ortopedia, implante de próteses, cicatrização de feridas, terapia de artrite, prevenção de adesões cirúrgicas e dermatologia, e cosmética, utilizado como um ativo hidratante².

O AH comercial pode ser de origem animal ou produzido por fermentação de *Streptococcus zooepidemicus* do grupo A e C de Lancerfield³, porém a produção microbiana representa uma oportunidade de otimizar o rendimento e a qualidade do produto, por meio da engenharia genética e controle das condições de cultivo, visto que a qualidade dos produtos formados pelos microrganismos vem como resultado das condições de cultivo, como nutrientes, vitaminas, íons, temperatura e pH⁴.

O objetivo deste trabalho foi definir os valores ótimos de pH, temperatura e agitação para a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e Inóculo: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 foi obtido da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústrias (CBMAI) e preservado em meio Brain Heart Infusion (BHI) contendo 50% v/v de glicerol a -80°C. O inóculo foi obtido



através de fermentação em Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL do meio BHI sendo este incubado a 37°C e 150 rpm por 48h.

Condições de Cultivo: As fermentações foram realizadas em *shaker* rotatório por 24 horas em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL do meio contendo (g.L⁻¹): glicose, 20; extrato de levedura, 10; K₂HPO₄, 2,5; NaCl, 2,0 e MgSO₄, 1,5. O inóculo foi de 10%. Para a definição dos parâmetros físicos ótimos para produção foi realizado um planejamento Box-Behnken 3³ incompleto com as variáveis independentes pH (6,0; 6,5; 7,0), temperatura (34; 37; 40°C) e agitação (100; 150; 200 rpm).

Quantificação do Ácido Hialurônico: Após a separação da biomassa do sobrenadante o AH foi obtido por precipitação com etanol e quantificado utilizando o reagente colorimétrico Carbazol pelo método modificado de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991)⁵.

Análise Estatística: A resposta concentração de AH (Y₁) em g.L⁻¹ obtida nos experimentos foi analisada pelo programa Statistica 7.0 para análise de variância (ANOVA) ao nível de significância de 5%, e metodologia de superfície de resposta (MRS) para otimização da produção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior produção de AH obtida foi de 0,251 g.L⁻¹ e ocorreu em pH 7,0; 40°C e 200 rpm. A Tabela 1 apresenta os resultados da produção de ácido hialurônico por *S. zooepidemicus* em meio de glicose.

Tabela 1 – Produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 obtidas do planejamento fatorial Box Behnken 3³ incompleto.

	(x ₁)	(x ₂)	(x ₃)	(Y)
Ensaio	pH	Temperatura °C	Agitação rpm	Ác. Hialurônico (g.L ⁻¹)
1	6,0 (-)	34 (-)	150 (0)	0,094
2	7,0 (+)	34 (-)	150 (0)	0,153
3	6,0 (-)	40 (+)	150 (0)	0,000
4	7,0 (+)	40 (+)	150 (0)	0,251
5	6,0 (-)	37 (0)	100 (-)	0,000
6	7,0 (+)	37 (0)	100 (-)	0,071
7	6,0 (-)	37 (0)	200 (+)	0,038
8	7,0 (+)	37 (0)	200 (+)	0,207
9	6,5 (0)	34 (-)	100 (-)	0,119



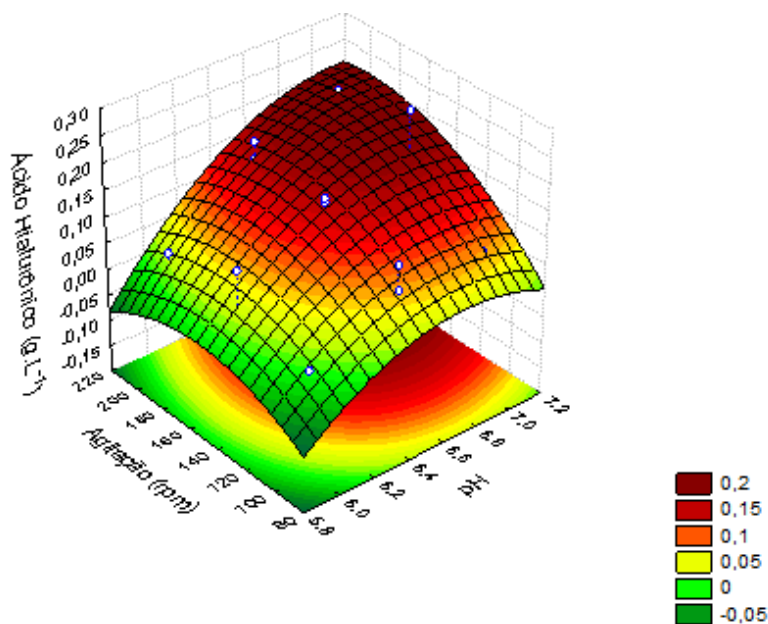
Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

III SIMBBTEC
Londrina 2013

10	6,5 (0)	40 (+)	100 (-)	0,072
11	6,5 (0)	34 (-)	200 (+)	0,146
12	6,5 (0)	40 (+)	200 (+)	0,177
13	6,5 (0)	37 (0)	150 (0)	0,155
14	6,5 (0)	37 (0)	150 (0)	0,146
15	6,5 (0)	37 (0)	150 (0)	0,156

A Figura 1 representa o modelo de produção de ácido hialurônico quando a temperatura foi fixada em 37°C. O modelo quadrático completo obtido pelo software Statistica 7.0 apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,987 e a falta de ajuste não significativa indicando que o mesmo é adequado para a predição da produção de AH, dentro das condições estudadas.

Figura 1 – Superfície de resposta para a produção de ácido hialurônico em função do pH e agitação tendo fixado a temperatura em 37°C.



De acordo com a Tabela 1 observa-se que o aumento do pH de 6,0 para 7,0 eleva a produção de AH como pode ser avaliado comparando o ensaio 1 ao 2. Esses resultados podem ser justificados pelo fato da enzima hialuronato sintase, que catalisa a polimerização de AH, apresentar atividade máxima a pH 7,1⁶. Observando-se a Figura 1 é possível notar que aumentos de pH sugerem aumento de produção de AH e que o ponto ótimo ainda não foi alcançado dentro da faixa de pH selecionada. Quanto a agitação tem-se que a alteração de 100 rpm (ensaio 6) para 200 rpm (ensaio 8) também favoreceu a produção do polímero. Alguns

218



III SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

autores afirmam que é necessária uma agitação vigorosa para melhorar a transferência de massa sendo as moléculas de AH resistentes as forças cisalhantes do agitador em níveis de agitação de até 1000 rpm⁴. A temperatura não apresentou efeito significativo nas condições estudadas.

CONCLUSÕES

Dentro da faixa de estudo selecionada as variáveis pH e agitação influenciaram significativamente a produção do polímero, entretanto uma nova faixa de pH, com valores acima de 7,0, deve ser estudada buscando atingir o ponto ótimo de pH na produção de ácido hialurônico.

REFERÊNCIAS

- (1) CHONG, B. F.; BLANCK, L. Metabolic Engineer of Hyaluronic Acid Production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 66(4), p. 341-351, 2005.
- (2) HOLMSTROM, B. RICICA, J. Production of Hyaluronic acid by a Streptococcal Strain in bath culture. **Appl. Microbiol.** v. 15, p. 1409 – 1413, 1967.
- (3) CHONG, B.F., BLANK, L. **Metabolic Engineering of Hyaluronic Acid Production**. The Department of Chemical Engineering, University of Queensland, St. Lucia, Australia, 1998.
- (4) ARMSTRONG, D.C.; COONEY, M. J.; JOHNS M. R. Growth and amino acid requirement of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 47, p.309-312, 1997.
- (5) FILISETTI-COZZI, T. M.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal Biochem.**; v. 197(1), p.157-62, 1991.
- (6) STOOLMILLER, A. C.; DORFMAN A. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Streptococcus. **Journal of Biological Chemistry**. v. 244, n.2, p.236-246, 1969.