



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR CULTIVO EM
ESTADO SÓLIDO DE *Streptococcus zooepidemicus* EM BAGAÇO
DE CAJU.**

André Casimiro de Macedo

Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana, *Orientadora*

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Campinas – São Paulo

Fevereiro/2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

M151p Macedo, André Casimiro de

 Produção de ácido hialurônico por cultivo em estados
 sólidos de Streptococcus zooepidemicus em bagaço de caju /
 André Casimiro de Macedo. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

 Orientador: Maria Helena Andrade Santana.

 Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas,
 Faculdade de Engenharia Química.

 1. Ácido hialurônico. 2. Fermentação. 3. Estreptococco.
 4. Metabólitos. 5. Caju. I. Santana, Maria Helena Andrade .
 II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Hyaluronic acid production by solid state cultivation of
Streptococcus zooepidemicus in cashew apple bagasse

Palavras-chave em Inglês: Hyaluronic acid, Fermentation, Streptococcus,
Metabolites, Cashew apple

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Diana Cristina Silva de Azevedo, Reinaldo Gaspar
Bastos, Sílvia Yuko Eguchi, Lucimara Gaziola de la
Torre

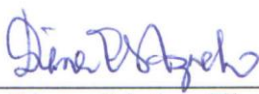
Data da defesa: 28/02/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por **André Casimiro de Macedo** e aprovada em 28 de fevereiro de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Dr^a. Maria Helena Andrade Santana



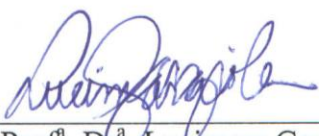
Prof^a. Dr^a. Diana Cristina Silva de Azevedo



Prof^a. Dr^a. Silvia Yuko Eguchi



Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos



Prof^a. Dr^a. Lucimara Gaziola de la Torre

Este Exemplar Corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por **André Casimiro de Macedo** e aprovada pela comissão julgadora em 28 de fevereiro de 2011.



Prof.^a. Dr.^a. Maria Helena Andrade Santana

“Qualquer pessoa que tenha experiência com o trabalho científico sabe que aqueles que se recusam a ir além dos fatos raramente chegam aos fatos em si.”

Thomas Henry Huxley

(Ealing, 1825 — Eastbourne, 1895)

“**D**o lar partem os homens fortes para a conquista do mundo,
e os fracos para seus revezes.”

Doralice Soares Casimiro (1917 -1989)

“**A**os meus pais, **Francisco Fenchine** e **Ana Célia**, à
Alexandre, meu irmão e à memória daqueles a quem muito devo do
que hoje sou e que prematuramente partiram para a casa do Pai
Eterno, dedico estas linhas.”

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Campinas** e ao **Departamento de Processos Biotecnológicos** da **Faculdade de Engenharia Química**, pela oportunidade concedida.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio e financeiro.

À **Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana** (FEQ, UNICAMP), não só pela oportunidade de integrar o grupo de pesquisa de Processos Fermentativos do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (LDPB), mas, sobretudo, pela confiança, compreensão e orientação durante estes seis anos de trabalho, na certeza de que estas linhas não teriam o mesmo valor sem os seus acertados conselhos.

Ao **Prof. Dr. César Costapinto Santana** (FEQ, UNICAMP), na certeza de que seria impossível realizar este trabalho sem o suporte instrumental de seu Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas. A sincera gratidão pela amizade e respeito durante a realização deste trabalho.

À **Dra. Silvia Yuko Eguchi**, pelas contribuições e sugestões ao longo do trabalho, além da participação na banca examinadora.

À colega e amiga **Dra. Aline Pires** (UFRJ), com quem tive o prazer de dividir as alegrias e tristezas que uma fermentação pode proporcionar, na certeza de que lhe devo parte de meu crescimento dentro dos processos fermentativos.

Ao grande amigo e mestre, **Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos** (CCA, UFSCar), não só pelas contribuições e sugestões ao longo do trabalho, mas pelos momentos divertidos no LDPB regados ao café do Gilson.

À **Profa. Dra. Diana C. Silva de Azevedo** (DEQ, UFC), pelas contribuições e pela participação na banca examinadora, na certeza de que todas as suas palavras foram guardadas com carinho por este velho aluno.

À ex-colega e **Profa. Dra. Lucimara G. de la Torre** (FEQ, UNICAMP), pelas observações e participação na banca examinadora.

Aos amigos e professores **Dr. Amaro Gomes Barreto Júnior** (UFRJ) e **Dr. Ivanildo J. da Silva Júnior** (DEQ, UFC), contemporâneos na UNICAMP, companheiros fieis e conselheiros durante parte deste trabalho, na certeza de que estas linhas seriam mais pobres sem as idéias que surgiram durante os “momentos do café”. Minha sincera gratidão.

À querida amiga **Profa Dra. Tirzhá L. Porto Dantas** (UFPR), pela amizade, pelos conselhos acertados e pelo ombro amigo, sobretudo nos momentos em que as incertezas e tristezas eram mais fortes que as certezas e alegrias, minha gratidão e amizade àquela a quem devo parte destas linhas.

À **Ângela Klatil** pela revisão da língua inglesa e que foi essencial na redação de parte deste trabalho.

À **Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria** (CBMAI) e ao **Grupo Investiga**, pela manutenção da cultura microbiana empregada ao longo do estudo.

Ao querido amigo **Gilson Jr.**, técnico do LDPB, pelo suporte técnico, essencial ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Antônio Renato Soares de Casimiro** (DTAL, UFC), com quem muito aprendi sobre biotecnologia e tecnologia das fermentações e a quem devo o aprendizado das *primeiras letras* em fermentação, na certeza de que foram as suas aulas que me fizeram olhar a biotecnologia com olhos mais afetivos.

À tia **Mirian**, com quem aprendi, pelo convívio diário dos cinco anos, que o grande valor de um bom engenheiro não está só na eficácia de suas ações e decisões, mas também na dignidade de seus atos. Meu afeto e minha gratidão.

Aos casais de queridos colegas/amigos **Bia e Edgar, Amanda e Ivan**, que transformaram meus anos em Campinas mais felizes e que me escolheram para participar “*legalmente*” de suas vidas como padrinho da união que acompanhei desde o começo. Minha gratidão e minha amizade.

À Colega **Andréa Shimojo**, com que muito aprendi sobre o ácido hialurônico e na certeza de que as discussões diárias sobre o AH durante o café me farão muita falta.

Aos queridos colegas do laboratório de fermentação, **Felipe, Marina Vieira, Leandro, Fernanda e Marina Brito**, com quem dividi não só discussões técnicas, mas também todo o meu carinho e amizade nestes anos de convivência.

A todos os colegas que passaram pelo LDPB, **Mari, Classius, Amós, Humberto, Silas, Viviane, Pablo, Thais, Giuliana, Patrícia, Rafaela, Danilo, Chris, Sônia, Carol, Thiago e Fernanda**.

Aos colegas que passaram pelo LPCR durante o período deste trabalho, em especial à **Luísa, Alessandra, Anayla, Absolon, Rafael, João Paulo e Carla**.

Aos queridos amigos sempre irmãos ou irmãos sempre amigos **Eugênio, João, Daniel, Goran, Serenotti e Cris**, que sempre alegraram os meus dias nestes anos e a quem devo muito daquilo que hoje sou.

Às minhas queridas tias **Maria e Ivaniza Soares**.

Aos Primos e agregados **Vitor, Lígia, Davi, Ludmila, Ana Maria, Sílvia, Carlos, João Pedro, Guilherme e Mariana** pelo apoio e amizade neste exílio voluntário em Campinas.

Deixo aqui registrado, nessas linhas, a minha gratidão àqueles que, de alguma forma, participaram deste trabalho. Meu respeito e minha gratidão.

RESUMO

Neste trabalho, estudou-se a produção de ácido hialurônico (AH) por cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* em estado sólido com enfoque básico nas alterações inerentes à estímulos na concentração inicial de açúcares (CIA), concentração inicial de ascorbato (CIA_{asc}), vazão de ar e disponibilidade de oxigênio e tamanho de partícula. O primeiro enfoque mostra a comparação entre cultivos em meio líquido (FS) e em estado sólido (FES) e a produção de AH integrada em substrato caju. Cada 1kg de caju pode gerar 761 mg (FES) e 1790 mg (FS) de AH, o que permite além da possibilidade de utilização integral deste resíduo, a produção consorciada para a obtenção de moléculas de AH que podem ser usadas em aplicações biomédicas. A segunda abordagem trata da adição de ascorbato ao meio, que favoreceu os efeitos de despolimerização por oxi-redução causados por radicais hidroxila, alterando a massa molar final do produto obtido, o que explica as menores massas molares obtidas em cultivos em meio de caju quando comparados a meios sintéticos. Na terceira abordagem deste trabalho observou-se os efeitos da CIA, mostrando a influência direta desta variável sobre o metabolismo microbiano e em especial sobre o comportamento da competição entre a formação de AH e a biossíntese celular ($Y_{AH/X}$). O desvio metabólico para a produção de AH em relação à síntese de células é superior para a faixa entre 30-90 g.L⁻¹ em fase líquida (0,61 g.g⁻¹). A quarta e última abordagem traz a importância do oxigênio no cultivo em estado sólido. Como principal resultado, observou-se a grande importância da razão entre vazão de ar/massa de açúcares. A faixa ideal observada foi de 1,27-2,8 L de ar / (g sugars. min), o rendimento $Y_{AH/X}$ foi máximo. Este conjunto de resultados contribui pioneiramente ao processo de produção de AH em FES e para a otimização da sua produção, assim como para um melhor entendimento do mecanismo metabólico do *Streptococcus zooepidemicus*.

Palavras-chave: ácido hialurônico, fermentação, *Streptococcus zooepidemicus*, metabólitos, massa molar, Caju.

ABSTRACT

In this work, hyaluronic acid (HA) production was studied in solid state cultivation (SSF) of *Streptococcus zooepidemicus*, focusing on metabolic changes induced by varying the initial sugar concentration (ICS), initial concentration of ascorbate (ICAsc), volumetric air flow rate, oxygen availability and particle size. The first approach shows the comparison between liquid (SF) and solid state (SSF) culture medium, exploring the HA production by the cashew substrate-integrated. Each 1kg of Cashew can generate 761 mg (SSF) and 1790 mg (SF) of HA, which allows, for the possibility of full utilization of this waste, with production focused on HA molecules that can be used in biomedical applications. The second approach shows that the addition of ascorbate in culture medium favored HA redox depolymerization effects by hydroxyl radicals, altering the molecular weight of the final product. This explains the lower molecular weight obtained from cashew culture medium when compared to synthetic medium. In the third part of this work, we observed the effects of the ISC, showing the direct influence of this variable on the microbial metabolism and, in particular, on the behavior of HA/Biomass Yield ($Y_{AH/X}$). The metabolic deviation for the HA production related to cell synthesis is superior, in the range of 30-90 gL⁻¹ in liquid phase (0.61 g.g⁻¹). The fourth and last approach presents the role of oxygen in solid state cultivation. As the main result, it was observed the importance of the ratio of air flow rate / mass of sugars. The ideal range was between 1.27-2.8 L / air (g sugars. min), for which case $Y_{AH/X}$ was maximum. These pioneering results contribute to the HA production in SSF, as well as to understanding the metabolic mechanism of *Streptococcus zooepidemicus*.

Keywords: *hyaluronic acid, fermentation, Streptococcus zooepidemicus, metabolites, molecular weight, Cashew apple.*

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO	1
Ácido Hialurônico: Características, Aplicações e Produção Fermentativa	1
Objetivo	5
Aspectos Abordados e Estrutura do Trabalho	5
 CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Ácido Hialurônico	9
2.1.1. Breve Histórico	9
2.1.2. Estrutura e Propriedades	10
2.1.3. Comportamento em Solução	10
2.2. Biossíntese Microbiana de Ácido Hialurônico	14
2.2.1. Mecanismo da Biossíntese Celular de Ácido Hialurônico	18
2.2.2. Metabolismo Microbiano na Produção de Ácido Hialurônico	23
2.2.3. Biossíntese Microbiana vs. Extração de Tecidos Animais	28
2.3. Utilização de Resíduos Agrícolas para Produção de Ácido Hialurônico	29
2.3.1. Meios de Cultivo Usados para a Produção de Ácido Hialurônico	29
2.3.2. Utilização de Caju para a Produção de Ácido Hialurônico	33
2.4. Fermentação em Estado Sólido	38
2.4.1. Caracterização do Cultivo	38

2.4.2. Reatores Usados em Fermentação no Estado Sólido.....	41
2.4.3. Fenômenos de Transferência de Massa no Cultivo em Estado Sólido	45
2.4.4. Transferência de Oxigênio em Fermentação em Estado Sólido	49
2.5. Mercado e Aplicações do Ácido Hialurônico	53
2.6. Referências Bibliográficas	56
 CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
3.1. Apresentação.....	71
(Artigo 1) Total Cashew Apple pseudo-Fruit (bagasse and juice) as resource for the production of hyaluronic acid	73
(Artigo 2) Hyaluronic acid depolymerization by ascorbate-redox effect on solid state cultivation of Streptococcus zooepidemicus in cashew apple fruit bagasse	91
(Artigo 3) Metabolic Effects of Initial Sugars Concentration on the Microbial Production of Hyaluronic Acid by Solid State Fermentation in Cashew Apple Bagasse.....	111
(Artigo 4) The Role of Oxygen in the Hyaluronic Acid Production by solid state cultivation of Streptococcus zooepidemicus in Cashew Apple Bagasse.....	131
 CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES.....	155
4.1. Conclusões	155
4.2. Sugestões para Futuros Trabalhos	156

LISTA DE FIGURAS

Figuras do CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Estrutura global da pesquisa desenvolvida destacando a organização dos resultados em textos submetidos à periódicos científicos. 7

Figuras do CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Estrutura do tetrassacarídeo de uma cadeia de ácido hialurônico. Adaptada de Gómez-Alejandre et al. (2000). 11

Figura 2.2. Ocorrência de AH em diferentes tecidos animais e sua concentração (Adaptado de Kogan *et al.*, 2007 e Pires, 2009)..... 11

Figura 2.3. Modelos para o comportamento de AH em Solução (adaptado de Hardingham, 2004)..... 14

Figura 2.4. Estrutura do AH mostrando os hidrogênios axiais formando a face apolar (adaptado de Hascall & Laurent,1997). 15

Figura 2.5. Estrutura de *fita torcida* para o comportamento do AH em solução (adaptado de Hascall & Laurent,1997) 16

Figura 2.6. Modelos de condensação do AH em Solução (adaptado de Cowman *et al.*, 2005) 18

Figura 2.7. Micrografias eletrônicas de células de *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* obtidas no final da fase exponencial de crescimento de uma cultura em biorreator aerado (A) examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (Chong *et al.*, 2005) e (B) examinadas em microscópio eletrônico de varredura (Ogrodowski, 2006)..... 19

Figura 2.8. Esquema simplificado para representação da síntese de AH. (adaptado de Yamada & Kawasaki, 2005 e Weigel, 2004)	20
Figura 2.9. Esquema simplificado para representação da síntese de AH. (adaptado de Yamada & Kawasaki, 2005 e Weigel, 2004)	22
Figura 2.10. Via biossintética para produção de ácido hialurônico por <i>Streptococcus</i> . (Adaptado de Chong <i>et al.</i> , 2005).	25
Figura 2.11. Fluxo metabólico do <i>S. zooepidemicus</i> (adaptado de Chong & Nielsen, 2002)	26
Figura 2.12. Fluxo de carbono baseado em 100 C-mol de glicose consumido. (Adaptado de Chong & Nielsen, 2003).	30
Figura 2.13. Perfil dos aminoácidos classificados como essenciais em diferentes fontes de nitrogênio orgânico provenientes de subprodutos agroindustriais (adaptado de Pires, 2009; Sgarbieri <i>et al.</i> , 1999; Kreider, 2004; Cardinal & Hedrick, 1948).	32
Figura 2.14. Perfil dos aminoácidos majoritários presentes no Suco de Caju (adaptado de Oliveira <i>et al.</i> (2002).	37
Figura 2.15. Reator de Bandejas do Tipo <i>Koji</i> (adaptado de Durand, 2003)	41
Figura 2.16. Reator de tambor rotativo (adaptado de Durand, 2003)	42
Figura 2.17. Reator de misturador horizontal de pás (adaptado de Durand, 2003)	43
Figura 2.18. Reatores do tipo leito fixo em escala laboratorial (adaptado de Durand, 2003).	44
Figura 2.19. Esquema de coluna esterilizável para escala laboratorial(adaptado de Durand, 2003).....	44
Figura 2.20. Fenômenos Macroscópicos que ocorrem em biorreatores.	48
Figura 2.21. Transferência de Oxigênio em Sistemas sólidos porosos.	50
Figura 2.22. Representação geral da teoria do Filme e do transporte de oxigênio em FES.	52
Figura 2.23. Três tipos de aplicações médicas do AH (adaptado de Asari, 2004)	55

Figuras do CAPÍTULO 3

Figuras do Artigo 1

Figure 1. Scheme of the fixed bed column used in the SSF experiments: 1. Primary humidifier, 2. Inlet air tube, 3. Bagasse packed bed, 4. Glass column, 5 outlet air tube, 6. Sterile water. 80

Figure 2. Overview of mass balance for the HA production starting from 1 kg of *in natura* total cashew apple pseudo fruit (CAPF), from which the cashew apple juice and the bagasse were obtained. 85

Figuras do Artigo 2

Figure 1. Scission of the HA chains may be due to β -cleavage of the C-centered radical formed at, for example, C(1) of the glucuronic acid residue.(Soltes *et al.*, 2007) 94

Figure 2. Kinetic profiles of (A) sugars consumption, (B) cells growth and (C) HA production for SSF with forced aeration (1 L. min^{-1}) using a culture medium composed of cashew apple bagasse moistured with the juice supplemented with yeast extract, salts and ascorbate at the concentrations $1.7 (\circ)$ $3 (\square)$ and $10 \text{ mg.L}^{-1} (\blacktriangle)$ 100

Figure 3. Profile of lactate (A) and acetate (B) biosynthesis for SSF with forced aeration (1 L. min^{-1}) using a culture medium composed of cashew apple bagasse moistured with the juice supplemented with yeast extract, salts and ascorbate at the concentrations $1.7 (\circ)$ $3 (\square)$ and $10 \text{ mg.L}^{-1} (\blacktriangle)$ 101

Figure 4. Average and distribution of the hyaluronic acid molecular weight. (A) Representative chromatogram for the molecular weight analysis of the HA produced by SSF in the presence of ascorbate. The two main populations (B) Behavior of the two populations with the increasing concentration of ascorbate $10 \text{ KDa} (\circ)$ and $1 \text{ KDa} (\square)$. (C) M_w distribution for the HA produced in the solid state fermentation. (D) Average M_w behavior with increasing concentration of ascorbate. M_w of 1.7 g.L^{-1} (*in natura*) was $2.5 \times 10^5 \text{ Da}$ 103

Figuras do Artigo 3

Figure 1. Central metabolic pathways in *Streptococcus zooepidemicus* involved in the conversion of glucose to hyaluronic acid and fermentation products through the (a) homolactic and (b) mixed acid metabolisms. HAS, hyaluronate synthase; NOX, NADH oxidase; LDH, lactate dehydrogenase; PFL, pyruvate formate lyase; PDH, pyruvate dehydrogenase; ADH, alcohol dehydrogenase; AK, acetate kinase (Adapted from Chong and Nielsen, 2003b)..... 113

Figure 2. (A) Scheme of the fixed bed column used in SSF experiments: 1. Primary humidifier, 2. Inlet air tube, 3. Comminuted bagasse packed bed, 4. Glass column, 5 outlet air tube, 6. Sterile water. (B) Picture of the columns inside the microbial incubator. 119

Figure 3. The metabolic effects of the initial glucose and fructose concentration on: (A) total sugars consumption and production of (B) HA; (C) cell mass (D) lactic acid (E) acetic acid and (F) $Y_{HA/X}$ Behavior in solid state fermentation using cashew apple bagasse moisturized with the cashew juice at the total sugar concentrations 30g.L^{-1} (15 mg.g^{-1} moist bagasse), 50g.L^{-1} (25 mg.g^{-1} bagasse) and 90g.L^{-1} (45 mg.g^{-1} bagasse). 125

Figure 4. Effects of initial concentration of sugars (glucose and fructose) on HA (A) molecular weight distribution (B) Average M_w 126

Figure 5. Consumption of glucose and fructose along solid state fermentations in cashew apple bagasse, moisturized with cashew apple juice, yeast extract and salts at (A) 30g.L^{-1} total sugars (15 mg.g^{-1}) and (B) 90g.L^{-1} total sugars (45 mg.g^{-1}) 127

Figuras do Artigo 4

Figure 1. (A) Mechanism of oxygen transfer in a porous particle. (B) (1) oxygen in the gas phase diffuses to the liquid phase in a stagnant liquid film and then (2) diffuses into the pore. 134

Figure 2. Characterization of the four groups of solid particles used for the studies of particle size in the production of HA. Sauter mean diameters were determined by the equation for mean $dp = 1/(x_1/dp_1)+(x_2/dp_2)+\dots+(x_n/dp_n)$ using x_i as the mass fractions for each diameter (dp_i) in the particle population (■) 3.20mm, (■) 2.48 mm (□) 1.54mm and (■) 0.67 mm. 136

Figure 3. Effects of particle Sauter mean diameter on the (A) moisture accumulation by the solid phase after 24h of fermentation, (B) global $Y_{HA/X}$ (production of HA related to cell growth), (C) total oxygen consumption in bagasse bed and (D) molecular weight of HA. 143

Figure 4. Images obtained of the cashew bagasse particles by a ophthalmologic slit lamp (A) and 3.20mm (B) 0.67mm showing the greater exposure of water in the surface of particle of 0.67 mm. Scanning electron microscopy micrographies obtained for the same particles (C) 3.20mm highlighting the larger pores into the particles of 3.20mm.and (D) 0.67mm. 144

Figure 5. Effect of volumetric inlet air flow rate on the production of (A) HA, (B) Biomass and the global yields(C) $Y_{AH/S}$ and (D) $Y_{X/S}$ 145

Figure 6. Effect of volumetric air flow rate on the (A) global yield $Y_{HA/X}$, (B) total oxygen consumption, (C) gas-liquid oxygen transfer coefficient (K_La) at the exponential phase of microbial growth (D) HA Molecular weight. 147

Figure 7. (A) Effects of volumetric air flow rate on the moisture content accumulation in bed(▲), (B) Optical micrography detailing liquid film, (C) Oxygen concentration profiles in liquid film (at 12h fermentation) and (D) Intra-particle oxygen concentration (at 12h fermentation). Air flow rates: 0.4 (○),0.6(■),0.8(▲),1.0(Δ),1.2(○) and 1.8(□) L.min⁻¹. . 148

Figure 8. EffectS of the R ratio (volumetric air flow rate/total sugar mass) on $Y_{HA/X}$. yield. (*) Data obtained at total sugar concentration was constant 45 mg.g⁻¹ (90g.L⁻¹) in liquid phase and air flow rates from 0.4 to 1.4 L.min⁻¹. (**) Values obtained at 1 L.min⁻¹ and 45,25 and 15 mg.g⁻¹ total sugar concentration (90, 50, 30 g.L⁻¹). 149

LISTA DE TABELAS

Tabelas do CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Comparação entre massas molares de AH extraído de diversas fontes. 13

Table 2.2. Composição típica do Suco de Caju (SC) e do Bagaço de Caju (BC). 34

Tabela 2.3 – Aplicações industriais da FES (adaptado de **Raimbault**, 1997). 39

Tabelas do CAPÍTULO 3

Tabelas do Artigo 1

Table 1. Composition of the total cashew apple pseudo-fruit: juice and bagasse. 76

Table 2. Composition of the synthetic medium supplementation (Swann *et al.*, 1990). 78

Table 3. Yield parameters obtained from fermentations of cashew apple pseudo-fruit juice in submerged fermentation (SF) under natural and forced aeration, and in solid fermentation (SSF) using cashew apple pseudo-fruit bagasse. In both cases the culture media were supplemented with yeast extract and salts as proposed by **Swann et al.** (1990) 86

Tabelas do Artigo 2

Table 1. Composition of the synthetic medium supplementation (Swann et al., 1990) 96

Table 2. Yield parameters obtained from the fermentation of cashew apple bagasse (SSF) with different ascorbate concentrations in liquid phase. 102

Tabelas Artigo 3

Table 1. Composition of the total cashew apple pseudo-fruit: juice and bagasse. 116

Table 2. Composition of the synthetic medium (Swann *et al.*, 1990) 117

Table 3. Specific growth rate and yields determined in solid state fermentation using cashew apple bagasse moisturized with the cashew juice at the total sugar concentrations 30g.L⁻¹ (15 mg.g⁻¹ moist bagasse, 50g.L⁻¹ (25 mg.g⁻¹ moist bagasse) and 90g.L⁻¹ (45 mg.g⁻¹ moist bagasse) 126

Tabelas do Artigo 4

Table 1. Composition of the synthetic medium supplementation (Swann *et al.*, 1990).... 135

Table 2. Water Activity as a function of particle Sauter mean diameter 142

NOMENCLATURA

a	Área interfacial para transferência de O ₂
AcCoA	Acetil coenzima A
ADH	Álcool desidrogenase
ADP	Adenosina difsfato
AFM	Microscopia de força atômica
AK	Acetato quinase
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Associação de analistas químicos oficiais
ARD	Derivados agroindustriais
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
C*	Concentração de O ₂ na interface gás-líquido
C/N	Razão carbono nitrogênio
Ca	Cálcio
CAJ	Suco de caju
CAPF	Cashew Apple Fruit

C_L	Concentração média de O ₂ no filme líquido
CLS	Água de maceração de milho
Co	Cobalto
CO₂	Dióxido de carbono
CoASH	Coenzima A
Cu	Cobre
Da	Daltons
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EMP	Via Embden-Meyerhof-Parnas
F6P	Frutose-6-fosfato
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe	Ferro
G6P	Glicose-6-fosfato
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa
HA	Ácido hialurônico
HAS	Hialuronato sintase
HPLC	High performance liquid chromatography
HSPC	Hidrolisado de concentrado protéico de soja
ICP-OES	Espectrometria de emissão por plasma
IGC	Concentração inicial de glicose
K	Potássio
K_L	Coeficiente de transferência de oxigênio na fase líquida
LAB	Bactérias lácticas

LDH	Lactato desidrogenase
MFA	Análise de fluxos metabólicos
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
MQD	Meio quimicamente definido
MW	Massa molar
N	Taxa volumétrica de transferência de oxigênio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídio oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida
NADPH	NAD Fosfato (forma reduzida)
NMR	Ressonância magnética nuclear
NOX	NADH oxidase
PDH	Piruvato desidrogenase
PFL	Piruvato formato liase
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fosfato
P_p	Produtividade de ácido hialurônico
PPi	Pirofosfato
P_x	Produtividade de células
PYR	Piruvato
RNA	Ácido ribonucléico
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho

SF	submerged fermentation
SSF	solid state fermentation
TP	Triose fosfatos
UDP	Uridina difosfato
UDPG	UDP-ácido glicurônico
UDPNAG	UDP-N- acetilglicosamina
UTP	Uridina trifosfato
UV	Ultravioleta
v	Vetor de fluxos metabólicos
WPC	Concentrado protéico de soro de leite
$Y_{Ac/S}$	Coeficiente de rendimento de acetato em relação à glicose
$Y_{EtOH/S}$	Coeficiente de rendimento de etanol em relação à glicose
$Y_{For/S}$	Coeficiente de rendimento de formato em relação à glicose
$Y_{HA/S}$	Coeficiente de rendimento de ácido hialurônico em relação à glicose
$Y_{Lac/S}$	Coeficiente de rendimento de lactato em relação à glicose
$Y_{X/S}$	Coeficiente de rendimento de células em relação à glicose
Zn	Zinco
μ_x	Velocidade específica de crescimento

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Ácido Hialurônico: Características, Aplicações e Produção Fermentativa

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear de alta massa molar pertencente à família dos glicosaminoglicanos e consiste em unidades dissacarídicas polianiónicas de *ácido D-glicurônico* (GlcUA) e *N-acetil-glicosamina* (GlcNAc) unidas alternadamente por ligações β (1 $\rightarrow$ 3) e β (1 $\rightarrow$ 4).

O AH foi descoberto em 1934 por **Karl Meyer** e **John Palmer**, que descreveram o procedimento para isolamento deste glicosaminoglicano procedente do humor vítreo bovino. O nome, ácido hialurônico, originou-se da junção entre o termo grego hialóide (vítreo) e ácido urônico.

Soluções de ácido hialurônico têm consistência gelatinosa, alta viscoelasticidade e alto grau de hidratação devido às suas características estruturais. AH é descrito como um

polieletrólito de esqueleto enovelado e estrutura semi-rígida, que ocupa um grande volume hidrodinâmico. Mesmo em baixas concentrações (1 mg.L^{-1}), as suas cadeias são capazes de interagir formando redes. Esta substância está presente em vários tecidos conjuntivos de animais e possui importantes funções como flexibilidade e manutenção da estrutura dos tecidos. Alguns órgãos são particularmente ricos em ácido hialurônico, tais como o cordão umbilical, fluido sinovial e o humor vítreo. Na pele e em cartilagens, a sua função é ligar-se à água, manter a tonicidade e elasticidade dos tecidos. Nos fluidos das articulações, serve como lubrificante, proporcionando proteção às células.

O AH é não-imunogênico e, portanto, possui um grande potencial de aplicações nas indústrias cosmética, médica e farmacêutica, incluindo hidratantes para a pele, preenchedores faciais, tratamento de osteoartrite, cirurgia oftalmológica, cicatrização de ferimentos, prevenção de adesão de cirurgias, oncologia e liberação controlada de fármacos.

O mercado mundial para o AH de grau médico corresponde a aproximadamente 1 tonelada por ano, sendo comercializado a U\$ 40.000-60.000 kg^{-1} . O volume do mercado de AH empregado no setor cosmético é cerca de 10 a 20 vezes superior, enquanto o preço se encontra na faixa de U\$ 1.000-2000. kg^{-1} , dependendo da qualidade do produto final.

O AH pode ser extraído do fluido sinovial, pele, tendões, do corpo vítreo dos olhos, do cordão umbilical e de crista de galo. Porém, a associação deste biopolímero de origem animal a antígenos limita as suas aplicações na área médica, e é esta atual preocupação e restrição quanto ao uso de materiais de origem animal para aplicações biomédicas, conferindo aos processos fermentativos de produção do AH uma alternativa cada vez mais atrativa e confiável.

Em geral, os processos fermentativos para produção de AH envolvem microrganismos do gênero *Streptococcus* do grupo C de Lancefield, em particular *Streptococcus equi sub. equi* e *Streptococcus equi sub. Zooepidemicus*. Sob condições controláveis, este grupo de organismos pode produzir AH em maiores rendimentos pela imposição de otimizações ao processo. Os polímeros resultantes de ambas as fontes apresentam a mesma estrutura química daqueles encontrados em animais, podendo diferir apenas com relação à massa molar.

O processo de produção em via fermentativa apresenta também um aspecto importante em relação aos processos de extração, que é a obtenção de um produto livre de característica antigênica, tornando os esforços na sua purificação menos onerosos.

O meio de cultura é fundamental para o desempenho de microrganismos em processos fermentativos. *Streptococcus* dos grupos A e C apresentam requerimentos nutricionais fastidiosos com relação a nitrogênio orgânico. De modo geral, os meios incluem extrato de levedura, peptonas ou hidrolisado de caseína como fonte de nitrogênio e fatores de crescimento.

Visando a redução de contaminações oriundas de fontes animal no cultivo de *Streptococcus zooepidemicus*, este trabalho propõe a utilização de substrato vegetal de caju (*Anacardium occidentale L.*) para a produção de AH em via fermentativa. O caju é uma fruta tropical, cuja produção, no Brasil, está concentrada no Nordeste. A agroindústria do caju no Nordeste produz cerca de 217 toneladas de castanha e 2 milhões de toneladas de pseudofruto por ano. Mesmo apresentando uma grande potencialidade como matéria-prima para diversas aplicações, o pseudofruto do caju tem cerca de 90% da sua produção descartada a cada ano, em função da sua alta perecibilidade. Outra justificativa para esse

desperdício é o fato da comercialização ou aproveitamento do pedúnculo não ser o principal negócio para a agroindústria do caju e sim o processamento e comercialização da amêndoa.

Dados para o mercado mostram que o consumo de suco de caju oscila em torno de 40 mil toneladas, o que ainda é muito discreto em relação à produção. Este consumo é limitado simplesmente ao mercado interno.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2004, o Brasil possuía 691.331 ha destinados à colheita de caju. Esta área está distribuída, prioritariamente, pelas regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste do país, sendo a região Nordeste a que apresenta a maior área disponível ao plantio de caju (688.562 ha).

Com relação à produção agrícola nacional, a agroindústria do caju representa pouco mais de 1% da área plantada no Brasil. Dado significativo quando comparamos à cana-de-açúcar, um dos mais importantes e significativos produtos agrícolas nacionais, que contribui com pouco mais de 9 % da área plantada no Brasil.

Este aspecto confirma o grande potencial econômico para aproveitamento dessa matéria-prima com uso de processos alternativos e que possibilitem a agregação de valor ao produto final obtido por estes processos, visto que grande parte dessa produção é desperdiçada como resíduo da agroindústria.

Considerando as potencialidades do caju como matéria-prima e sua disponibilidade, foi estudada neste trabalho a utilização integral do caju como substrato, com especial ênfase à produção por processos fermentativos em estado sólido e à caracterização do AH produzido por via fermentativa com meio de cultura à base de caju, em continuidade aos

trabalhos anteriormente desenvolvidos no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos da FEQ/UNICAMP.

1.2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo fundamental o estudo da produção de AH por cultivo no estado sólido ou fermentação em estado sólido (FES) de *Streptococcus zooepidemicus*, além da caracterização do biopolímero produzido.

1.3. Aspectos Abordados e Estrutura do Trabalho

Este trabalho aborda quatro aspectos fundamentais do processo de produção de AH em FES (Figura 1.1) apresentados neste texto sob a forma de artigos científicos. Os quatro aspectos são:

- i. Viabilidade da produção de AH através do cultivo em estado sólido de *Streptococcus zooepidemicus*. Esta abordagem é apresentada na comparação entre a produção de AH com substrato caju em meio líquido e meio sólido. Além de mostrar a viabilidade na produção, o principal objetivo desta abordagem é demonstrar o aproveitamento integral desta fonte de baixo custo.
- ii. Efeitos resultantes da presença de ascorbato no meio líquido. A principal diferença encontrada por **Pires et al.** (2010) em seu trabalho comparativo entre a produção de AH em meio sintético e a produção em suco de caju foi a menor massa molar do AH obtido do cultivo em suco. Uma das explicações que aqui é proposta para explicar este fenômeno é a presença, no suco de caju, de moléculas como o ascorbato, que promovem a evolução de espécies reativas de oxigênio e provocam cisão nas ligações entre os monômeros. Além da explicação do mecanismo este

artigo apresenta a possibilidade de modulação da produção de AH de baixa e média massa molar, de grande importância para aplicações na sinalização de células e liberação controlada, com a presença natural de ascorbato no suco.

- iii. Alterações metabólicas decorrentes da concentração inicial de açúcares no meio de cultivo para a produção de AH. Estudos preliminares deste grupo de pesquisa (**Pires et al.**, 2010 e **Pires e Santana**, 2010) mostraram que a presença de açúcares em altas concentrações levam à inibição catabólica. O trabalho prévio, que compara a produção por fermentação em estado sólido e por fermentação submersa, mostrou que nenhum comportamento inibitório é evidente quando o substrato caju, que apresenta altas concentrações de açúcares, glicose e frutose, (próxima a 90 g.L^{-1}) é utilizado. O objetivo desta abordagem é, portanto, apresentar as alterações metabólicas inerentes à relação entre a concentração de açúcares e os desvios da biossíntese microbiana para a produção de AH, uma vez que estas duas vias que competem pela mesma fonte de carbono.
- iv. Papel do oxigênio na produção de AH. Como consequência dos primeiros estudos comparativos entre a produção por fermentação em estado sólido e por fermentação submersa, um dos aspectos que torna estes dois processos diferentes é a disponibilidade de oxigênio à célula. Em processos em estado sólido, a transferência ocorre em um menor volume de líquido (filme em volta da partícula), o que favorece a disponibilidade de oxigênio às células, ao contrário do que ocorre em fermentação submersa. Outra vertente desta abordagem é a comprovada relação entre a transferência de oxigênio e o estímulo à produção de AH, que forma uma cápsula protetora contra os efeitos tóxicos do oxigênio às células.

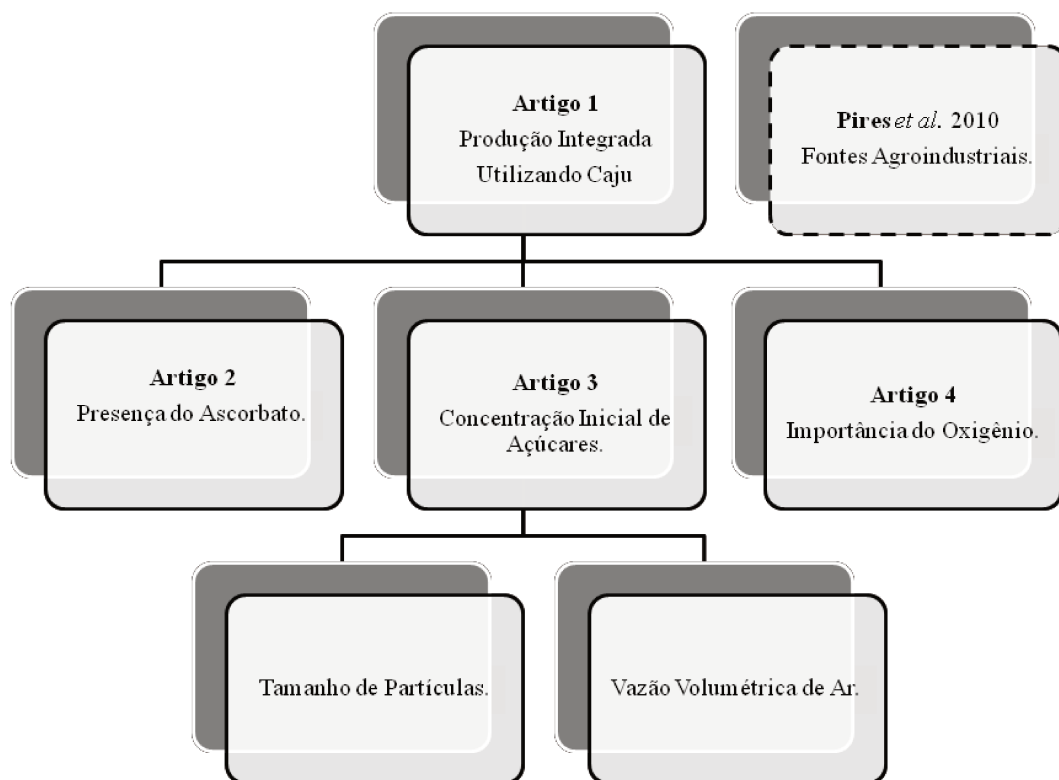


Figura 1.1. Estrutura global da pesquisa desenvolvida destacando a organização dos resultados em textos submetidos a periódicos científicos.

Além dos quatro aspectos abordados nos textos submetidos a periódicos científicos, uma patente foi submetida à INOVA/UNICAMP como finalização dos estudos em FES para a produção de AH. Neste documento técnico, comunicamos e solicitamos a propriedade intelectual de uma unidade escalonável modular de leito fixo, que reproduz as condições de uma coluna de leito fixo de escala laboratorial. Portanto esta unidade minimiza os efeitos dispersivos e pode ser usada, além de piloto para o desenvolvimento destes processos, também em como módulo experimental para reprodução de ensaios em condições diversas.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ÁCIDO HIALURÔNICO

2.1.1. BREVE HISTÓRICO

Em 1934, **Karl Meyer** e seu assistente, **John Palmer**, trabalhando no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Oftalmologia da Universidade de Columbia, descreveram o procedimento para isolamento de um novo glicosaminoglicano procedente do humor vítreo de boi. Em seu trabalho, **Meyer** e **Palmer** apresentam esse novo composto como um polissacarídeo que continha ácido urônico e um amino-açúcar, mas não apresentava nenhum sulfoéster. **Meyer** e **Palmer** propuseram o nome *Ácido Hialurônico* para aquela substância, nome que veio da junção entre o termo grego *hialóide* (vítreo) e ácido urônico (**Laurent**, 2002 e **Yamada** et al., 2005).

Poucos anos mais tarde, em 1937, **Kendall**, **Heidelberger** e **Dawson** observaram a semelhança entre um polissacarídeo da cápsula de *Streptococcus* do grupo A hemolítico e o ácido hialurônico, sendo este o primeiro relato da produção microbiana desta biomolécula.

Na década seguinte à descoberta, **Meyer** e outros colaboradores dedicaram-se ao isolamento de AH de tecidos animais incluindo fluido sinovial, pele, cordão umbilical e crista de galo em um procedimento original de preparo que incluía remoção de proteínas por desnaturação ou digestão proteolítica e, então, uma precipitação dos polissacarídeos com álcool ou acetona. No entanto, as preparações originais retinham muita proteína e este fato gerou discussões sobre a complexação entre esta biomolécula e proteínas sobretudo nos anos 60-70.

O marco da história do AH, no entanto, está nos anos 50, quase 20 anos depois de sua descoberta, quando a sua estrutura foi elucidada por **Karl Meyer** e seus assistentes. Naquela década e na seguinte (50-60), o foco principal dos estudos eram as propriedades do AH e seu complexo comportamento em solução, que mesmo em baixas concentrações representavam um desafio naqueles anos. Muitos trabalhos enfocaram medidas biofísicas de espalhamento de luz (“*light scattering*”), osmometria, viscosidade e sedimentação para fornecer subsídios a modelos de comportamento (**Hardingham**, 2004).

2.1.2. ESTRUTURA E PROPRIEDADES

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear de alta massa molar constituído de unidades dissacarídicas de ácido *D-glicurônico* e *N-acetilglicosamina* unidos por uma ligação glicosídica $\beta(1-3)$. As unidades dissacarídicas são linearmente polimerizadas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ (**Lapcik Jr. et al.**, 1998), conforme demonstrado na Figura 2.1.

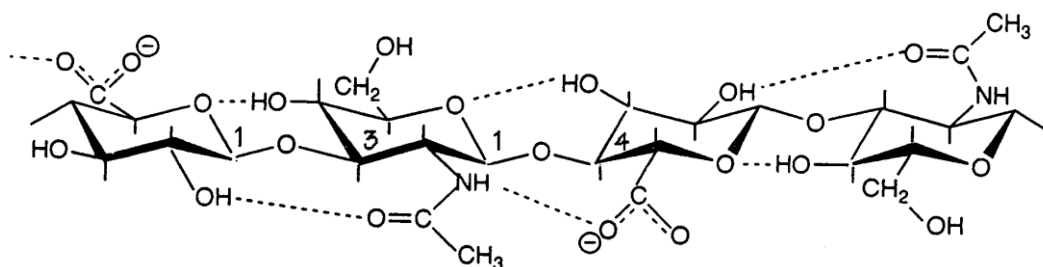


Figura 2.1. Estrutura do tetrassacarídeo de uma cadeia de ácido hialurônico. Adaptada de Gómez-Alejandre *et al.* (2000).

O AH pertence a um grupo de polissacarídeos denominados “polissacarídeos do tecido conjuntivo”, “mucopolissacarídeos” ou “glicosaminoglicanos”, grupo que inclui também o sulfato de condroitina, sulfato de dermatana e heparina (**Lapcik Jr. *et al.***, 1998).

O AH é uma molécula estruturalmente simples, no entanto o número de unidades dissacarídicas repetidas presentes em sua estrutura pode exceder 30.000.000, característica que lhe confere massas molares da ordem de 1×10^7 Da ou até mesmo superiores a este valor. Esta importante característica físico-química atribui ao AH propriedades hidrodinâmicas particulares e que o tornam uma molécula complexa e com ampla aplicabilidade nos campos médicos e cosméticos (**Kogan *et al.***, 2007).

O AH é um componente essencial na maior parte dos tecidos de organismos vertebrados (Figura 2.2.). Deste modo, diversos tecidos animais são utilizados como fonte para isolamento e produção de AH de alta massa molar. Entretanto, o AH comercialmente disponível é prioritariamente originário de processos de extração a partir de crista de galo e do cordão umbilical, por serem estes os tecidos onde o AH é mais abundante. (**Adam & Ghosh**, 2001).

Além de estar presente em tecidos animais, o ácido hialurônico também é encontrado em procariotos, principalmente em *Streptococcus* dos grupos A e C de Lancefield, que sintetizam

esse composto naturalmente como parte de sua cápsula externa (**Armstrong & Johns, 1997** e **Wessels *et al.*, 1991**).

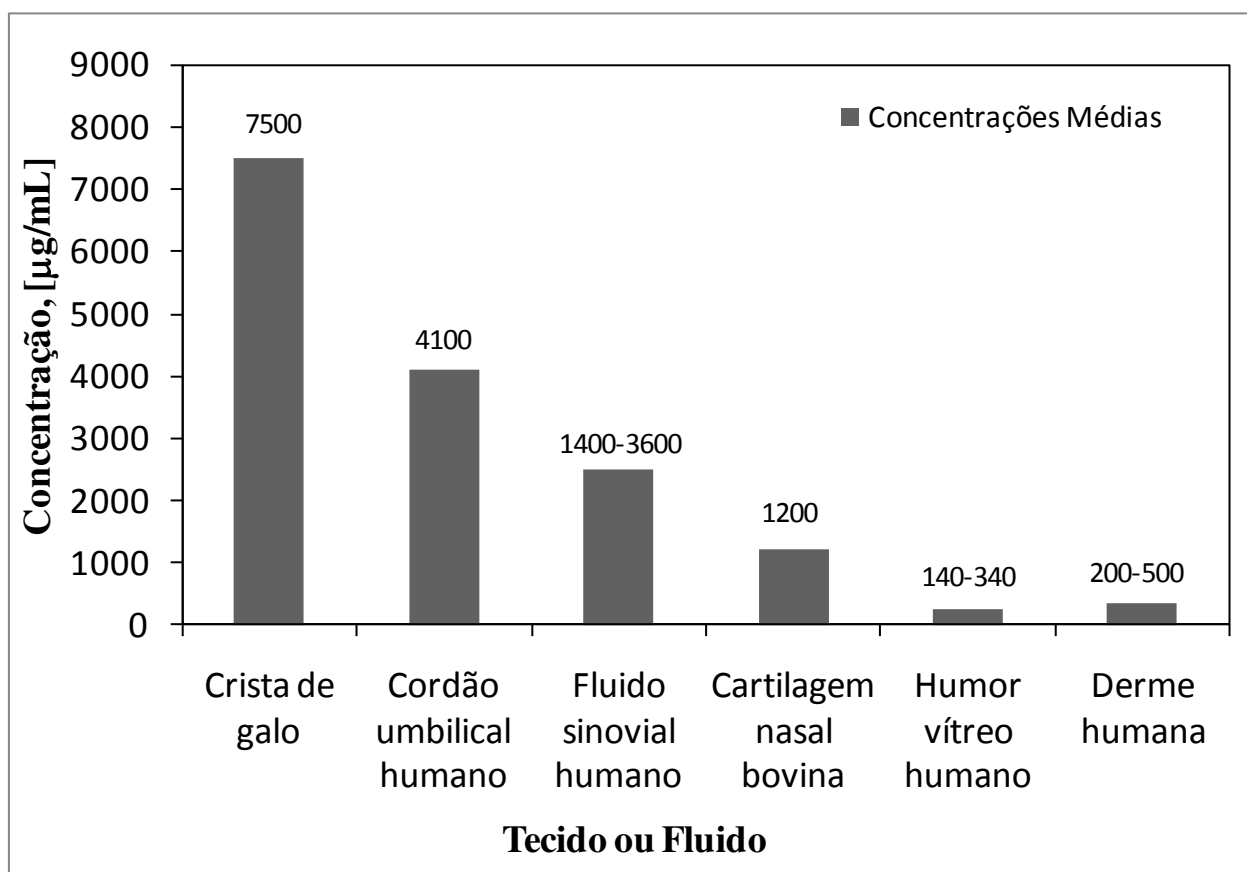


Figura 2.2. Ocorrência de AH em diferentes tecidos animais e sua concentração (Adaptado de Kogan *et al.*, 2007 e Pires, 2009).

O AH normalmente encontrado em tecidos animais possui a mesma estrutura química em relação ao produzido por fermentação microbiana, no entanto uma grande diferença entre estas duas fontes de AH, como cita **Cooney *et al.* (1999)**, é a massa molar do biopolímero.

A Tabela 2.1 apresenta a variação da massa molar de HA de acordo com a fonte de sua obtenção.

Tabela 2.1 - **Comparação entre massas molares de AH extraído de diversas fontes.**

Fonte	Massa Molar (Da)
Fluido sinovial	1,0 - 8,0 × 10 ⁶
Cordão umbilical	3,6 - 4,5 × 10 ⁶
Crista de galo	12 - 14 × 10 ⁶
Humor vítreo bovino	0,38-2,08 × 10 ⁶
Fermentação microbiana	2,4-3,4 × 10 ⁶

(Adaptada de **Ogrodowski**, 2006; **Adam e Ghosh**, 2001; **Iqbal et al.**, 1997.)

Há, no entanto, restrições ao AH extraído e purificado de tecidos animais, segundo **Chong** (1998), que são:

- i. Redução da massa molar após os processos de extração e purificação;
- ii. Dificuldades de isolamento de moléculas com alto peso molar devido à formação de complexos com proteoglicanos;
- iii. Controle da massa molar do polímero;
- iv. Questões éticas e argumentos morais à utilização bioquímica dessa substância devido ao risco de infecções virais.

2.1.3. COMPORTAMENTO EM SOLUÇÃO

Soluções de AH apresentam propriedades viscoelásticas e a base biofísica de seu comportamento não-ideal tem sido fonte de muitos estudos.

Em soluções diluídas, o AH comporta-se como um novelo aleatório e rígido. A presença de segmentos conectados age em oposição ao enrijecimento da cadeia. Em soluções concentradas, os segmentos rígidos e enrolados mostram-se interligados e formam soluções viscoelásticas. A presença de segmentos conectados pode levar à formação de uma rede e, conseqüentemente, à formação de géis (**Hardingham**, 2004).

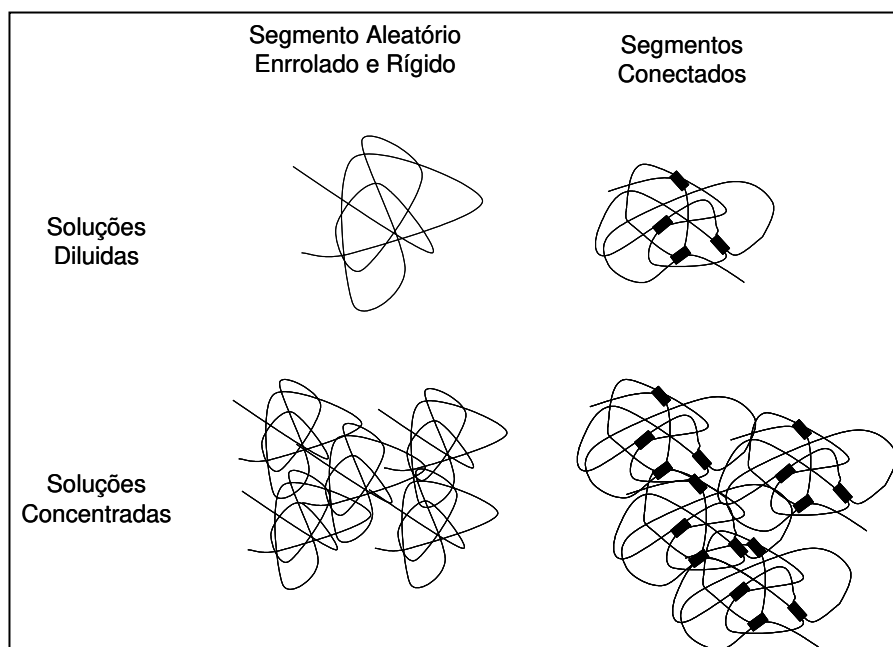


Figura 2.3. Modelos para o comportamento de AH em Solução (adaptado de **Hardingham**, 2004)

O seu comportamento em solução aquosa, portanto, é bem peculiar e a sua rigidez pode ser justificada, em parte, devido às ligações de hidrogênio entre sacarídeos adjacentes, combinado com algum efeito de repulsão eletrostática mútua entre grupos carboxila (**Hardingham**, 2004). Os átomos axiais de hidrogênio (indicados na Figura 2.4) formam uma face apolar, relativamente hidrofóbica, enquanto as cadeias equatoriais dão forma a uma face mais polar, mais hidrofílica, criando, desse modo, uma estrutura de torção (Figura 2.5). Conseqüentemente, uma molécula de AH apresenta uma estrutura randômica e expandida em soluções fisiológicas, ocupando um grande espaço (**Hascall & Laurent**, 1997).

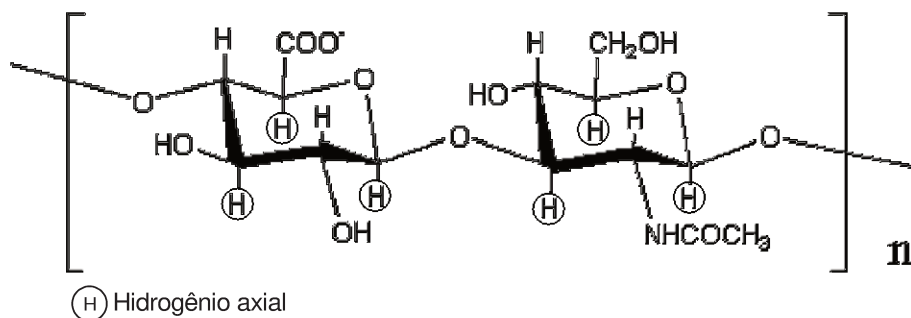


Figura 2.4. Estrutura do AH mostrando os hidrogênios axiais formando a face apolar (adaptado de **Hascall & Laurent**, 1997).

Assim, as interações entre as moléculas da água e os grupos carboxila e N-acetila conferem ao polímero a capacidade de retenção de água e certa rigidez conformacional, limitando, assim, a sua flexibilidade.

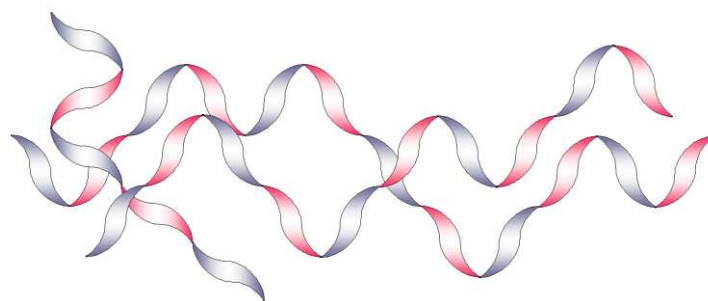


Figura 2.5 – Estrutura de *fita torcida* para o comportamento do AH em solução (adaptado de **Hascall & Laurent**,1997).

A Figura 2.5. mostra o AH em solução. As cores azul e vermelha alternadas representam a estrutura da fita com faces hidrofílicas (azul) e hidrofóbicas (vermelha). A estrutura do domínio de AH tem interessantes e importantes consequências: moléculas menores como a água, eletrólitos e nutrientes podem difundir livremente através do solvente dentro do domínio. Entretanto, moléculas maiores como proteínas podem ser parcialmente excluídas do domínio devido a seu tamanho hidrodinâmico em solução.

Cowman et al. (2005) sugerem que as funções biológicas do AH estão vinculadas à existência de inúmeras conformações e de interações específicas. É provável que as conformações sejam afetadas pelo ambiente, pela ação de forças como força iônica e interações específicas do íon, constante dielétrica local, efeitos de exclusão de volume exposição a forças mecânicas, e presença substâncias que proporcionem interação (por exemplo, proteínas e aos lipídios).

Em pH 7,0 a molécula de AH comporta-se como um poliânion, onde os grupos carboxílicos estão predominantemente ionizados, haja visto o pK destes grupos presentes nos

resíduos de ácido D-glicurônico variarem entre 3,0 e 4,0, dependendo das condições iônicas (**Hascall e Laurent**, 1997).

Balazs e Laurent (1951) observaram no AH o padrão de viscosidade característico a polieletrólitos, também verificando uma distância aproximada de 1 nm entre as cargas ionizadas dos grupos carboxílicos presentes nos resíduos de ácido D-glicurônico, cargas que são influenciadas pela força iônica e pelo pH do ambiente, implicando, assim, nas formas das cadeias e na sua interação com as moléculas vizinhas. As cadeias de AH sofrem contração com o aumento da força iônica e redução de pH, segundo afirma **Cleland** (1968), ao demonstrar o comportamento polietrolítico desta biomolécula.

O raio de giro do AH, segundo os estudos de **Laurent** (1957) em viscosidade e espalhamento de luz para o hialuronato de sódio em água e hialuronato de cetilpiridina em metanol, depende do solvente empregado e diminui à medida que as cargas se estabilizam. Quando o grau de ionização é zero, ou seja, quando a cadeia está colapsada, o pK do polímero, obtido por extrapolação, foi estimado por **Reed** e colaboradores (1989) como 2,9.

Estudos das propriedades de soluções de AH purificado fornecem uma vista de conformações moleculares relevantes ao comportamento hidrodinâmico e suas propriedades mecânicas. (**Fouissac et al.**, 1993)

Cowman et al. (2005), através de microscopia de força atômica, elucidaram o comportamento do AH microbiano em faixas de massa molar entre 10^5 a 10^6 Da e discriminaram inúmeras estruturas para estas duas classes de AH, baixa e alta massa molar.

Como resultado, **Cowman et al.** (2005) mostram prováveis formas para condensação do AH (Figura 2.6).

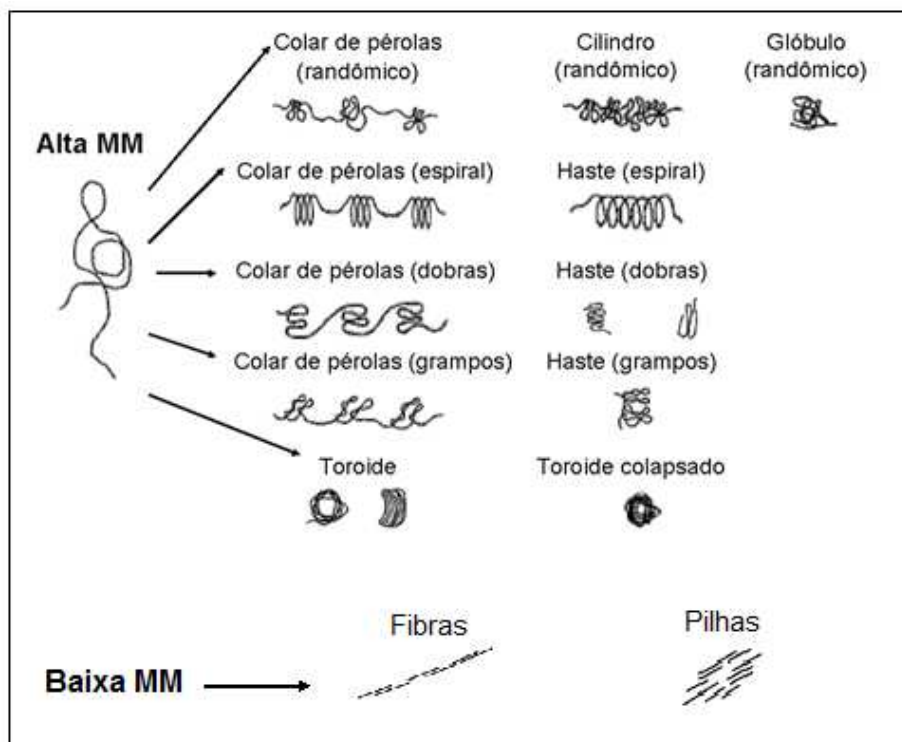


Figura 2.6 – Modelos de condensação do AH em Solução (adaptado de **Cowman *et al.*, 2005**)

2.2. BIOSÍNTESE MICROBIANA DE ÁCIDO HIALURÔNICO

2.2.1. MECANISMO DA BIOSÍNTESE CELULAR DE ÁCIDO HIALURÔNICO

O AH é sintetizado no interior da membrana plasmática como um polímero capsular linear. A enzima responsável pela síntese desse glicosaminoglicano é a hialuronato sintase (HAS) (Yamada & Kawasaki, 2005).

A cápsula de AH é produzida como um fator de virulência por bactérias Gram-positivas, catalase negativa, anaeróbias facultativas com algumas estirpes aerotolerantes, que não esporulam e produzem ácido lático como subproduto do catabolismo de glicose (**Chong et al.**, 2005). Segundo **Schmidt et al.** (1996) e **Wessels et al.** (1991), a cápsula protege a bactéria do sistema imune de organismos superiores que não a reconhecem como um corpo estranho.

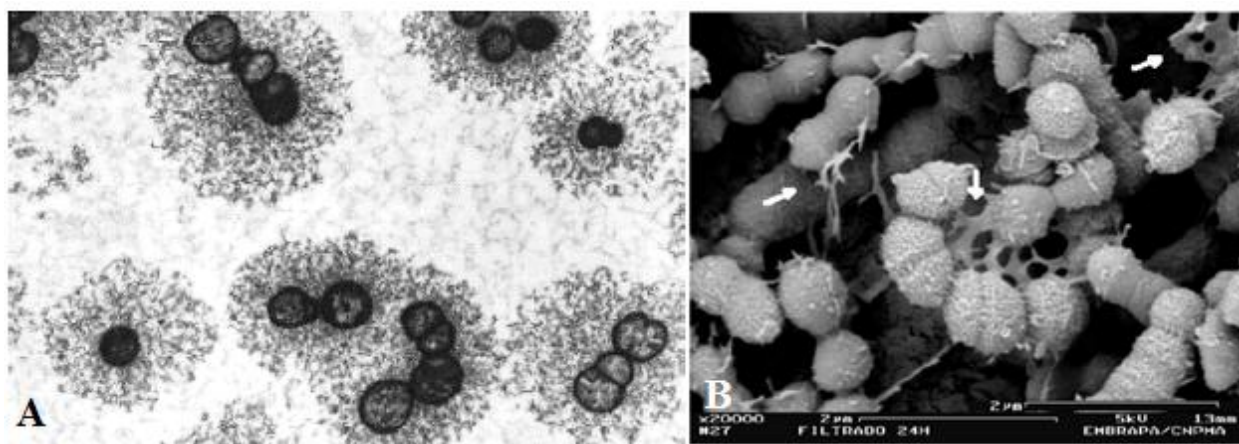


Figura 2.7. Micrografias eletrônicas de células de *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* obtidas no final da fase exponencial de crescimento de uma cultura em biorreator aerado (A) examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (**Chong et al.**, 2005) e (B) examinadas em microscópio eletrônico de varredura (**Ogrodowski**, 2006).

HAS é uma enzima de difícil solubilização e purificação, assim, foi preciso um intervalo de 65 anos desde a identificação do AH e a primeira purificação de uma sintase ativa, que aconteceu em 1999 (**Weigel**, 2004).

A síntese de AH ocorre na extremidade redutora por transferência alternada dos substratos UDP-GlcNAc e UDP-GlcAc para o UDP-hialuronato. Esse mecanismo difere das

sínteses de glicopeptídios e proteoglicanos, os quais são alongados na extremidade não redutora (**Prehm**, 1984).

O primeiro modelo teórico para a biossíntese de AH propunha que três sítios ativos estavam envolvidos na transferência de açúcares dos precursores para o terminal não redutor da cadeia alternadamente (**DeAngelis**, 1999).

DeAngelis (1999) afirma que o mecanismo de controle do tamanho da cadeia ainda não é conhecido.

Yamada & Kawasaki (2005) e **Weigel** (1998) apresentaram em seus estudos um modelo teórico para a síntese e alongação da cadeia do AH no interior da membrana plasmática, que é apresentado na Figura 2.8.

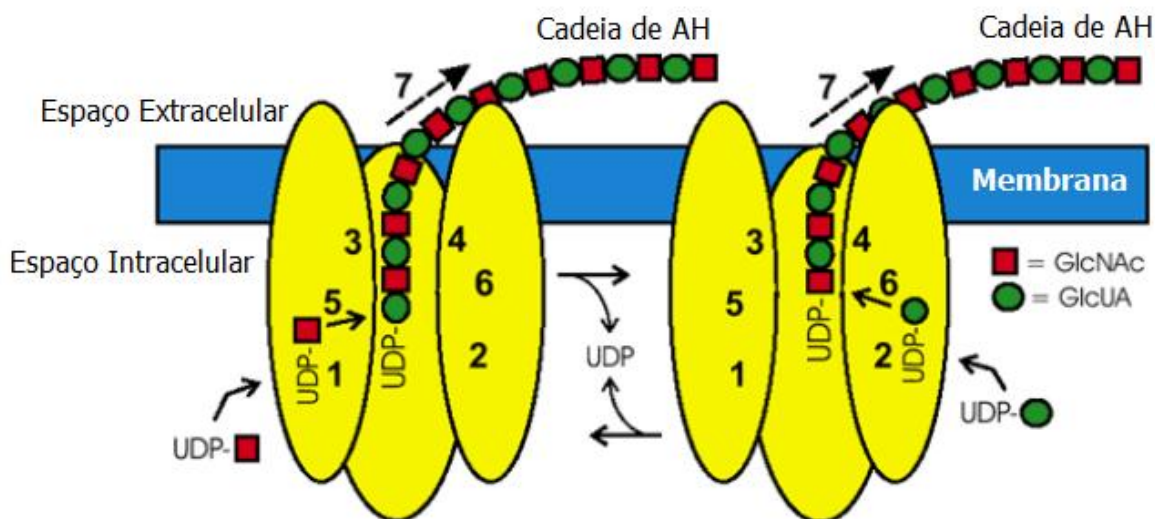


Figura 2.8. Esquema simplificado para representação da síntese de AH. (adaptado de **Yamada & Kawasaki**, 2005 e **Weigel**, 2004)

A figura 2.8 apresenta 3 momentos fundamentais no mecanismo de síntese do AH com as seguintes etapas:

i. Lado esquerdo da Figura 2.8.:

(1) UDP-GlcNAc começa a se ligar para a formação da cadeia de AH-GlcUA-UDP intracelular;

(3) AH-GlcUA-UDP é montado;

(5) AH-GlcUA-UDP: UDP-GlcNAc, β -1,3(AH-GlcUA) transferase

ii. Lado Direito da Figura 2.8.:

(2) UDP-GlcUA começa a se ligar para a formação da cadeia de AH-GlcNAc-UDP intracelular;

(4) AH-GlcNAc-UDP é montado;

(6) AH-GlcNAc-UDP: UDP- GlcUA, β -1,3(AH-GlcNAc) transferase;

iii. Extrusão do AH mostrado em (7).

Uma das questões mais polêmicas e não respondidas envolvendo os mecanismos de biossíntese de AH é conciliar a habilidade de síntese e também extrusão do AH pela sintase, que é uma proteína única complexada com fosfolipídios. Uma hipótese, no entanto, foi levantada por **Weigel** (2004) na tentativa de explicar este fenômeno, que se relaciona à elongação das cadeias de AH. A esta suposição, **Weigel** (2004) chamou de **hipótese do pêndulo**, que pode ser mostrada na Figura 2.9 e tem duas etapas básicas. Na primeira etapa, o crescimento das cadeias de AH são mostrados dentro do espaço celular e na segunda etapa a adição de açúcares é repetida e a cadeia de AH atravessa o poro no complexo HAS-Proteína-Lipídio.

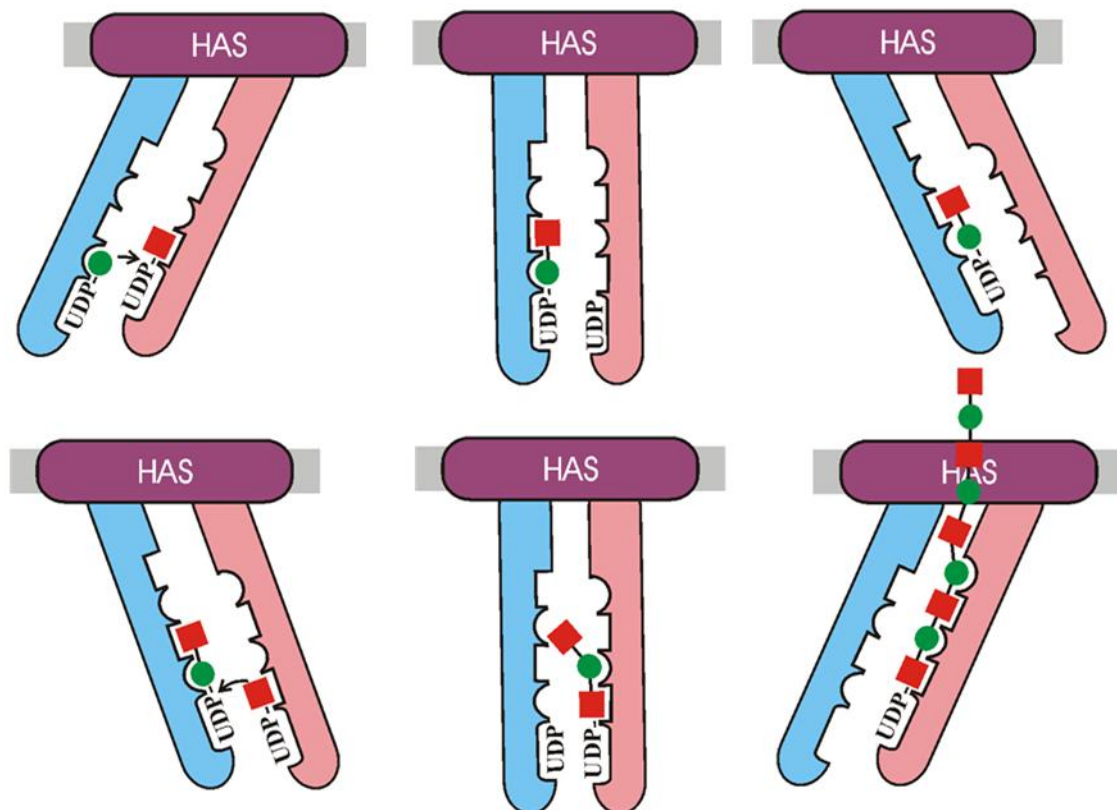


Figura 2.9. Esquema simplificado para representação da síntese de AH. (adaptado de **Yamada & Kawasaki**, 2005 e **Weigel**, 2004)

A HAS tem dois domínios funcionais que agem como "braços". Cada braço contém um sítio de ligação para um dos UDP-açúcar, um sítio ativo de uma das glicosiltransferases, e um local obrigatório para o doador de AH-UDP. (como mostrado na parte esquerda e direita Fig. 2.8). Os sítios de ligação para o AH-UDP interagem com vários açúcares na cadeia do ácido hialurônico e esses sítios individuais nos dois braços são compensados em relação ao seu registro

para ligação da cadeia de ácido hialurônico. Cada “braço” pode movimentar-se em três posições funcionalmente diferentes (como uma transferase ativa, inativa e ativa como um acceptor), assim, enquanto um braço age como transferase, o outro serve como um acceptor. A movimentação dos braços é provocada pelas mudanças conformacionais envolvidas nos processos energéticos ligados à UDP-açúcar e é esta movimentação que é capaz de transferir a molécula de braço a braço até que ele seja extrudado para o espaço extracelular através do poro no complexo HAS-Proteína-Lipídio.

2.2.2. METABOLISMO MICROBIANO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO

Chong & Blank (1998) descreveram a rota metabólica para a síntese de AH por *Streptococcus* (Figura 2.10).

O ácido D-glicurônico e a N-acetil glicosamina são derivados da glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato. Assim, segundo a rota metabólica para o *Streptococcus*, a primeira reação é a que leva à glicose-6-fosfato. α -fosfoglicomutase converte a glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato em uma reação reversível. UDP-glicose fosforilase catalisa a reação de UTP e glicose -1-fosfato para a produção de UDP-glicose. UDP-ácido glicurônico é obtido por oxidação específica do grupo álcool do UDP-glicose através da ação da UDP-glicose desidrogenase. A rota originada da frutose-6-fosfato é envolvida na produção de amino-açúcares. Grupos amino transferidos da glutamina para a frutose-6-fosfato por uma amidotransferase levam à glicosamina-6-fosfato. Grupos acetila transferidos por uma acetiltransferase formam N-acetil glicosamina-6-fosfato.

Rearranjo de grupos fosfato por mutase geram a N-acetil glicosamina-1-fosfato a partir de N-acetil glicosamina-6-fosfato. Por fim, a pirofosforilase adiciona UDP para obtenção de UDP-N-acetilglicosamina. A participação de UTP nestas reações geram doadores glicosil ativados que podem ser polimerizados em AH por AH sintase (**Chong et al.**,2005).

A biossíntese do polímero é dispendiosa para o microrganismo com relação ao consumo de energia e de carbono (**Chong & Nielsen**, 2003). Um total de 4 moles de ATP é consumido para produzir 1 mol da unidade dissacarídica de AH, sendo 2 moles consumidos nas duas reações mediadas pela glicoquinase para fornecer as hexoses precursoras fosforiladas para cada ramificação da via biossintética e os outros 2 moles de ATP utilizados para regenerar os doadores UTP. A reação de oxidação catalisada pela UDP-glicose desidrogenase gera 2 moles de NADH para cada 1 mol de AH sintetizado.

Além de fornecer os precursores para a síntese de AH, essas duas vias fornecem também constituintes da parede celular como peptideoglicano e ácidos teicóicos. Assim, para produção de grandes quantidades de AH pelas células, é necessário que esses metabólitos sejam mantidos em níveis adequados para que também possam sustentar o crescimento celular (**Widner et al.**, 2005).

Armstrong (1997) observou uma relação negativa entre a velocidade específica de crescimento e a produtividade específica de AH e sua massa molar. Entretanto, essa relação (negativa) só ocorre quando a inibição do crescimento não se associa com baixa assimilação da fonte de carbono. Quando as condições são suficientes para inibir o consumo de glicose, primeiro a produtividade e, em seguida, a massa molar diminuem. Esse comportamento permite inferir que a produção de AH compete por fontes limitadas com a síntese de massa celular.

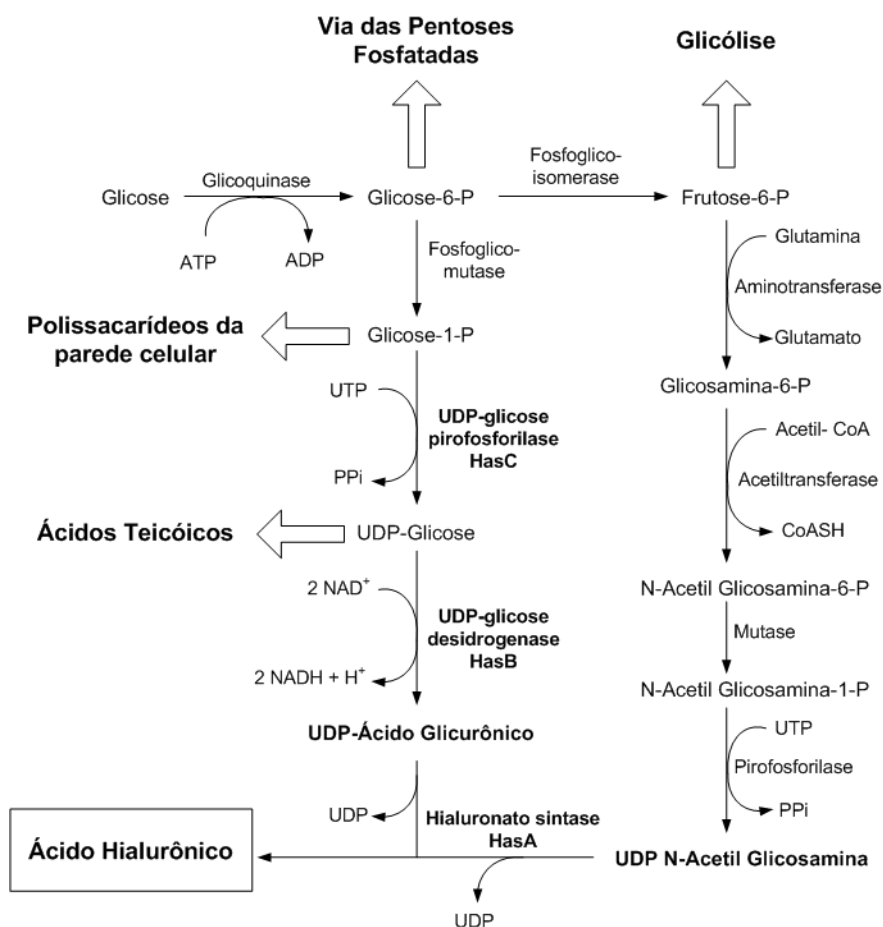


Figura 2.10. Via biossintética para produção de ácido hialurônico por *Streptococcus*. (Adaptado de Chong *et al.*, 2005).

Chong & Nilsen (2002) propuseram o modelo de fluxo metabólico para o metabolismo de carbono em *Streptococcus zooepidemicus*. Esses autores estimaram os fluxos intracelulares e validaram a consistência de suas medições na determinação dos metabólitos. A estrutura base do modelo proposto foi composta das seguintes rotas: Embden-Meyerhof-Parnas (v1-v5), pentose fosfato (v12 e v13) e as reações responsáveis pela fermentação observada em *S. zooepidemicus*. Os produtos metabólicos (lactato, formato, acetato e etanol) são produzidos pelo lactato desidrogenase (LDH, v6), piruvato formato liase (PFL, v7), acetato quinase (AK, v10) e álcool desidrogenase (ADH, v9). Sob condições aeróbicas, a enzima piruvato desidrogenase (PFH, v8)

supostamente domina a conversão do piruvato a acetil-CoA devido à extrema sensibilidade do PFH ao oxigênio (Figura 2.11).

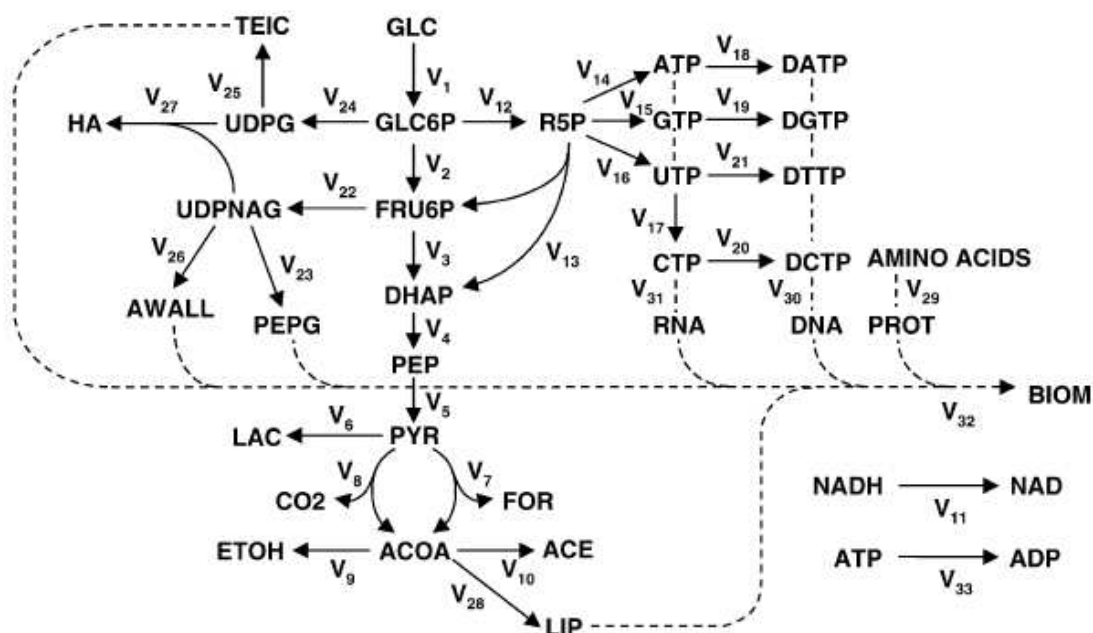


Figura 2.11 – Fluxo metabólico do *S. zooepidemicus* (adaptado de Chong & Nielsen, 2002) .

V_1	$GLC(E) + PEP \rightarrow GLC6P + PYR$
V_2	$GLC6P \rightarrow FRU6P$
V_3	$FRU6P + ATP \rightarrow 2DHAP + ADP$
V_4	$DHAP + NAD + ADP + PI \rightarrow PEP + NADH + ATP$
V_5	$PEP + ADP \rightarrow PYR + ATP$
V_6	$PEP + NADH \rightarrow \underline{LAC} + NAD$
V_7	$PYR + CoA \rightarrow \underline{FOR} + ACoA$
V_8	$PYR + CoA + NAD \rightarrow ACoA + NADH + CO_2$
V_9	$ACoA + 2NADH \rightarrow \underline{ETOH} + CoA + 2NAD$
V_{10}	$ACoA + 2NADH \rightarrow \underline{ACE} + CoA + ATP$
V_{11}	$2NADH + O_2 \rightarrow 2NAD + 2H_2O$
V_{12}	$GLC6P + 2NADP \rightarrow R5P + 2NADPH + CO_2$
V_{13}	$3R5P \rightarrow 2FRU6P + DHAP$
V_{14}	$A + R5P + 4ATP \rightarrow ATPN + 4ADP + PPI$
V_{15}	$G + R5P + 4ATP \rightarrow GTP + 4ADP + PPI$
V_{16}	$U + R5P + 4ATP \rightarrow UTP + 4ADP + PPI$
V_{17}	$UTP + GLN + ATP \rightarrow CTP + GLU + ADP + PI$
V_{18}	$ATPN + NADPH \rightarrow DATP + NADP$
V_{19}	$GTP + NADPH \rightarrow DGTP + NADP$
V_{20}	$UTP + NADPH \rightarrow DGTP + NADP$
V_{21}	$ATPN + MTHF + 2ATP + NADPH \rightarrow UDPNAG + GLU$ $+ CoA + PPI$
V_{22}	$FRU6P + GLN + ACoA + UTP \rightarrow DTTP + DHF + 2ADP +$ $+ NADP + PPI$
V_{23}	$UDPNAG + PEP + 3,5ALA + GLU + LYS + 8ATP + NADPH \rightarrow PEPG +$ $+ 2UTP + 8ADP + 7PI + NADP$
V_{24}	$GLC6P + UTP \rightarrow UDPG + PPI$
V_{25}	$UDPG + 3DHAP + 3NADH + 5ATP \rightarrow TEIC + 3NAD + 5ADP + UTP + 2PPI$
V_{26}	$UDPNAG + 2G6P + 2NADPH + 3ATP \rightarrow AWALL + UTP + 2NADP + 3ADP + 2PPI$
V_{27}	$UDPG + UDPNAG + 2NAD + 2ATP \rightarrow \underline{HA} + 2UTP + 2NADH + 2ADP$
V_{28}	$23,9ACoA + 2,1DHAP + 0,65UDPG + 43,5NADPH + 24,3ADP + 2,1NAD \rightarrow LIP +$ $+ 23,9CoA + 43,5NADP + 24,3ADP + 2,1NAD + 0,65UTP + 1,1PPI + 2,2PI + 2,1H_2O$
V_{29}	$100AMINAc + 430,6ATP \rightarrow 100PROT + 430,6ADP + 430,6PI$
V_{30}	$29DATP + 29DTTP + 21DGTP + 21DCTP + 137,2ATP \rightarrow 100DNA + 137,2ADP + 137,2PI + 10PPI$
V_{31}	$26,2ATPN + 21,6UTP + 32,2GTP + 20CTP + 40ATP \rightarrow 100RNA + 40ADP + 40PI + 100PPI$
V_{32}	$86,7PROT + 2PEPG + 1,6TEIC + 0,7AWALL + 1,1DNA + 7,6RNA + 0,5LIP \rightarrow \underline{100BIOM}$
V_{33}	$ATP \rightarrow ADP + PI$

Reações do fluxo metabólico do *S.zooepidemicus* (adaptado de **Chong & Nielsen** , 2002).

Chong & Blank (1998) ainda observaram que a massa molar do AH produzido na fermentação é inversamente relacionada com a taxa de crescimento celular da bactéria. A afirmação de **Chong & Blank** apóia-se, também, na observação de que a parede celular de bactérias gram positivas é construída a partir de um dissacarídeo que contem um dos precursores da síntese do AH, o N-acetil-glocasamina, que une-se por meio de ligações β 1-4 ao N-acetilmuramico, formam a molécula glicano que varia no comprimento (de 5 a 30 unidades) dependendo do tipo de bactéria utilizada (**Navarre et al.**, 1999).

Portanto, a taxa específica de produção do AH ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) aumenta com a diminuição da taxa de crescimento específica, de modo que maiores taxas de produção podem ser atribuídas a maiores taxas de polimerização através da AH sintase.

2.2.3. BIOSÍNTESE MICROBIANA VS. EXTRAÇÃO DE TECIDOS ANIMAIS

Como é mencionado no item 2.1.2 deste capítulo, a obtenção do ácido hialurônico puro a partir de fontes animais apresenta algumas desvantagens, duas destas, certamente as mais significativas são:

- i. Necessidade de purificação laboriosa, uma vez que esse produto encontra-se usualmente misturado com outros mucopolissacarídeos e proteínas;
- ii. Redução de sua massa molar, devido à degradação das cadeias nos procedimentos complexos requeridos para a purificação.

Além destas duas questões tecnológicas destes processos de extração, questões mais profundas relacionadas com a crescente resistência à utilização de materiais de origem animal em

produtos biomédicos devido ao risco de infecções virais, assim, embora inicialmente tenham sido empregados tecidos animais para produção de materiais utilizados clinicamente com a aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA), ultimamente esta substância de alta massa molar secretado como cápsula microbiana tem sido oferecido por diversas indústrias, o que se deve também à grande semelhança nas características de massa molar do AH microbiano com o AH de tecidos animais.

2.3. UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO

2.3.1. MEIOS DE CULTIVO USADOS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO

Streptococcus são bactérias lácticas nutricionalmente fastidiosas e que requerem meio de cultivo rico para crescimento (**Armstrong et al.**, 1997). Em condições anaeróbias, o principal produto fermentativo derivado do catabolismo de glicose é o ácido láctico, com baixos níveis de formato, acetato e etanol. A Figura 2.11 apresenta as vias metabólicas centrais envolvidas na conversão de glicose a AH e outros metabólitos por *Streptococcus zooepidemicus*.

A maior parte do carbono é recuperado como produtos de fermentação e baixos níveis recuperados em biomassa, como é característico à bactérias lácticas, que têm as suas necessidades biossintéticas supridas principalmente pela fonte de nitrogênio orgânico, como é mostrado na Figura 2.12

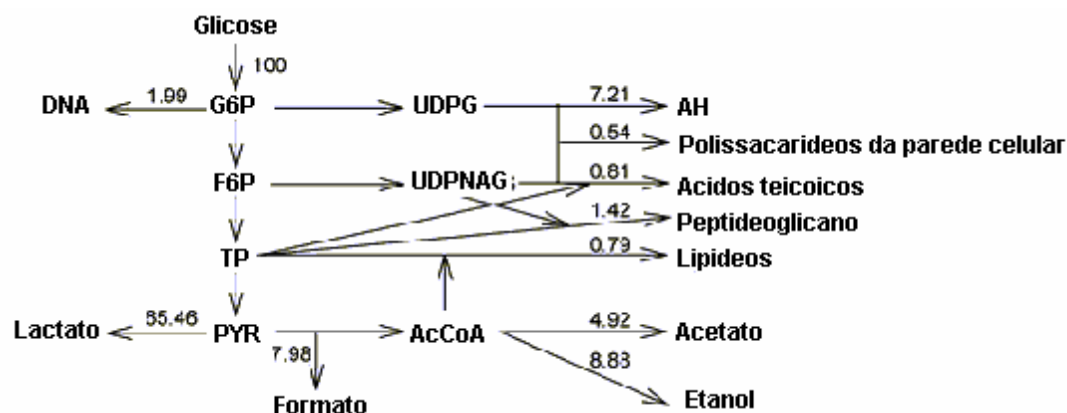


Figura 2.12. Fluxo de carbono baseado em 100 C-mol de glicose consumido. (Adaptado de Chong & Nielsen, 2003).

Os fluxos da Figura 2.12 foram estimados a partir das alterações nas concentrações de metabólitos durante a fase exponencial de crescimento, utilizando modelo de fluxo metabólico.

Sendo então microrganismos exigentes nutricionalmente, geralmente são cultivados em meios complexos contendo extrato de levedura ou extrato animal, peptona e soro.

A fonte de carbono mais comum nos diversos trabalhos envolvendo produção de AH por fermentação é a glicose (Chong & Nielsen, 2003; Cooney *et al.*, 1999; Armstrong *et al.*, 1997; Armstrong & Johns, 1997; Kim *et al.*, 1996; Johns *et al.*, 1994; Akasaka *et al.*, 1989; Holmstrom & Ricica, 1967; Thonard *et al.*, 1964).

Fontes de nitrogênio orgânico são consideradas essenciais para um bom crescimento das células, visto que existem evidências que esses componentes fornecem grande parte do carbono para biossíntese celular (**O'Regan et al.**, 1994).

Além de fornecerem parte do requerimento de carbono, os suplementos em nitrogênio orgânico também vinculam-se, segundo **Armstrong et al.** (1997), aos requerimentos quanto aos 11 aminoácidos essenciais (além da glutamina) para o *Streptococcus zooepidemicus*, que são arginina, lisina, cisteína, isoleucina, tirosina, metionina, histidina, valina, fenilalanina, leucina e triptofano.

Pires et al. (2010) avaliou suplementos de nitrogênio orgânico em meios de cultivo de origem vegetal para *Streptococcus zooepidemicus*. Foram testados resíduos agroindustriais como Hidrolisado Protéico de Soja, Concentrado Proteico de soro de leite e suco de caju, selecionados com base nos requerimentos nutricionais descritos por **Armstrong et al.** (1997) com relação aos aminoácidos essenciais presentes nestas fontes.

A Figura 2.13 apresenta o perfil dos aminoácidos essenciais em diferentes fontes de nitrogênio orgânico provenientes de subprodutos agroindustriais estudados por **Pires et al.** (2010).

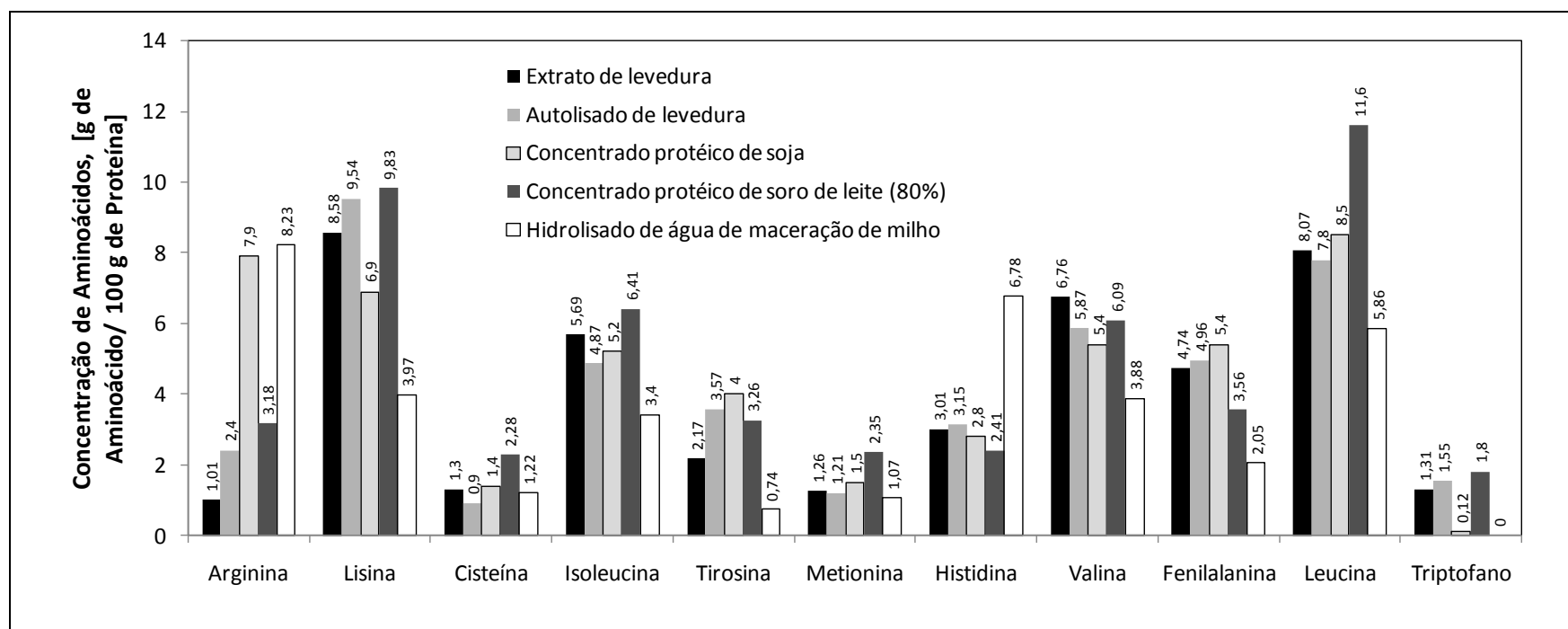


Figura 2.13. Perfil dos aminoácidos classificados como essenciais em diferentes fontes de nitrogênio orgânico provenientes de subprodutos agroindustriais (adaptado de **Pires, 2009; Sgarbieri et al., 1999; Kreider, 2004; Cardinal & Hedrick, 1948**).

Como resultado de seu trabalho, **Pires et al.** (2010), demonstrou que o suco de caju foi o mais promissor para a produção de AH em massa molar média (10^4 Da) que serve para aplicações biomédicas. O concentrado protéico de soro de leite e Concentrado protéico de soja foram efetivos para o crescimento celular. A suplementação Água de maceração de milho não influenciou a produção de AH nos diversos meios.

2.3.2. UTILIZAÇÃO DE CAJU PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO

Além de demonstrar a factibilidade de utilização de fontes agroindustriais, um ponto que agrega grande importância ao trabalho de **Pires et al.** (2010) é apresentar o caju como uma matéria prima de grande significância à produção de AH, quando comparada aos meios convencionais sintéticos e outras fontes agroindustriais. O caju, além de ser uma fonte renovável e de baixo custo, também contorna problemas com contaminação por proteínas animais.

O Caju (*Anacardium occidentale* L.) desperta o interesse para processos fermentativos não só pelos aspectos econômicos (também referenciados no capítulo 1) mas também pelo seu conteúdo nutricional em açúcares (glicose e frutose), vitaminas, minerais e aminoácidos (**Campos et al.**, 2002). O suco tem sido usado em processos fermentativos em meio líquido para a produção de dextrana, ácido láctico, manitol e oligossacarídeos (**Honorato et al.**, 2007, **Rabelo et al.**, 2009), bem como o bagaço em fermentação no estado sólido para a produção de enzimas, (**Pinto et al.**, 2001, **Rodrigues et al.**, 2007, **Alcântara et al.**, 2010) usando fungos filamentosos em ambos os processos, na produção de Oligossacarídeos prebióticos usando *Leuconostoc mesenteroides* (**Rabelo**, 2008) e também na produção de bioetanol (**Gondim**, 2009)

A composição tradicionalmente apresentada para o caju compilada de diversas fontes na literatura é apresentada na Tabela 2.2.

Table 2.2 – Composição típica do Suco de Caju (SC) e do Bagaço de Caju (BC).

Parameters	SC ^a	BC ^b	References
pH	3.8-4.2	4.01	Morton and Dowling (1987) ^a , Campos et al. (2002) ^a Matias et al. (2005) ^b
Acidez (g Ac. Cítrico/100g)	0.35	1.34	Moura Fé et al., (1972) ^a Matias et al. (2005) ^b
Sólidos Solúveis (°Brix)	7.4	12.0	Campos et al. (2002) ^a Matias et al. (2005) ^b
Açúcares Redutores (g/L)* ou (mg/100g)**	107*	6.84**	Souza et al. (2002) ^a Matias et al. (2005) ^b
Açúcares Totais (g/L)* ou (mg/100g)**	111*	7.68**	Matias et al. (2005) ^b
Proteínas (%)	0.92	1.83	Matias et al. (2005) ^b
Vitamina C (mg/100g)	158,26	-	Moura Fé et al., (1972) ^a
Taninos x 10 ³ (g/L)	0,06	-	Campos et al. (2002) ^a
Lipídeos (%)	-	0.38	Matias et al. (2005) ^b
Fibras (%)	-	33.10	Matias et al. (2005) ^b
Umidade (%)	-	78.76	Matias et al. (2005) ^b
Atividade de Água, a _w	-	0.8	Alcântara et al. (2009) ^a

Além da composição característica como é apresentada na tabela 2.2., **Oliveira et al.** (2002) apresentam na composição oito aminoácidos livres majoritários detectados no suco de caju (Figura 2.14). Dentre estes, a alanina e a serina parecem ser os aminoácidos-chave para a identificação do suco de caju, uma vez que permaneceram majoritários ao longo do período da safra.

Pela figura 2.14., observa-se que dos 11 aminoácidos essenciais para a produção de AH descritos no trabalho de **Armstrong et al.** (1997), 3 estão presentes no suco de caju, são eles a fenilalanina, a leucina e a tirosina.

Para a produção de AH, o trabalho pioneiro de **Oliveira** (2004) apresentou a utilização de suco de caju como meio de cultura visando à substituição do meio BHI (*Brain Heart Infusion*), recomendado pela ATCC para o cultivo de *S. zooepidemicus*. Desse modo, pode-se eliminar a presença de antígenos que, por ventura, possam estar nos meios de cultura de origem animal, reduzindo, assim, as contaminações no produto.

Os experimentos de **Oliveira** apresentam resultados da suplementação do meio de suco de caju puro com BHI, para o preparo do inóculo, nas concentrações de 10,20,30 e 37 g/L, sendo que, nesta última o cultivo foi feito, também, por 24 horas.

Dessa forma, observa-se que a crescente adição de BHI ao meio de cultivo gera um aumento na concentração celular final.

A suplementação com extrato de leveduras também é proposta por **Oliveira** como alternativa ao uso do BHI. Os significativos resultados de seu trabalho mostram que, semelhante

ao que ocorre com o BHI, a concentração celular cresce com a crescente adição de extrato de levedura ao meio de suco de caju.

Macedo (2007) também apresentou o estudo da produção do AH em substrato de caju considerando a sua total utilização como meio líquido para processos submersos e o bagaço como meio para processos no estado sólido (suporte/substrato). **Macedo** observou o incremento na produção de AH em processos submersos com utilização de sistemas aerados e agitados em relação aos processos conduzidos sem aeração em frascos de Erlenmeyer. Assim, os processos de produção de AH por fermentação mostraram que o crescimento e a produção de AH são influenciados pelas condições de aeração do meio; processos conduzidos em ausência de aeração forçada apresentaram resultados para crescimento celular e evolução de biomassa inferiores aos obtidos em sistemas agitados e aerados. O favorecimento das condições de aeração do meio, observados em ensaios em reator mostram que a produtividade em células aumenta em aproximadamente 65% e a produtividade em AH em 77% em processos conduzidos com suplementação de oxigênio quando comparados a processos sem aeração forçada. Ensaios comparativos entre processos conduzidos com suco de caju in natura e clarificado mostram que a redução dos taninos no suco clarificado não produz diferenças expressivas na produtividade ou crescimento celular (em torno de 6%). Com relação à produção do AH em cultivo em estado sólido, estudos preliminares conduzidos em reatores de leito fixo apresentados também neste trabalho mostram que há factibilidade da produção deste biopolímero através desse tipo de processo. Valores obtidos para a produção de AH em FES chegaram a 0,0070 g de AH/ g de bagaço de caju.

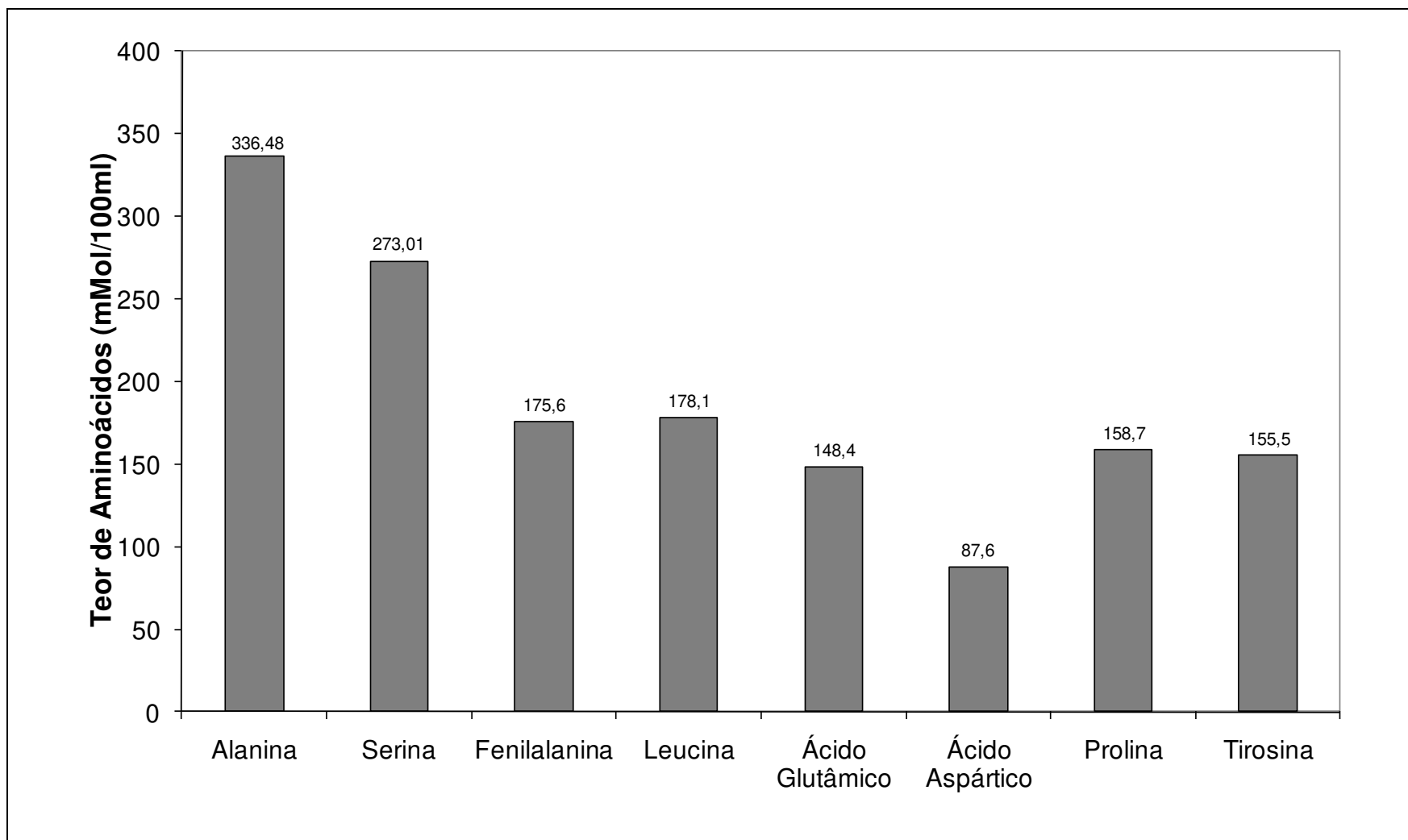


Figura 2.14. Perfil dos aminoácidos majoritários presentes no Suco de Caju (adaptado de **Oliveira et al.** (2002)).

2.4. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

2.4.1. CARACTERIZAÇÃO DO CULTIVO

O cultivo em estado sólido ou fermentação em estado sólido (FES) é caracterizado pelo crescimento de microrganismos sobre uma matriz sólida, ou seja, suporte insolúvel, na ausência ou perto da ausência de água livre (**Pandey**, 2003; **Raghavarao et al.** 2003; **Gutiérrez-Correa & Villena**, 2003).

Atualmente, a técnica de fermentação semi-sólida tem sido extensamente explorada devido às vantagens oferecidas principalmente no cultivo de fungos filamentosos (**Hasan**, 2002). Segundo afirma **Pandey** e colaboradores (2002) e reforça **Hasan** (2002), nos últimos dez anos tem havido crescente desenvolvimento da FES com aplicação em diversas áreas, como bioremediação e biodegradação de compostos tóxicos, detoxificação biológica de resíduos agroindustriais tóxicos, biotransformação de resíduos de plantações para enriquecimento nutricional e para obtenção de produtos biologicamente ativos como metabólitos secundários, incluindo micotoxinas (aflatoxina e ocratoxina), biopesticidas (endotoxinas bacterianas), hormônios de crescimento de plantas (ácido giberélico), promotor de crescimento (zearalelona), antibióticos (penicilina, cefalosporina, cefamicina C, oxitetraciclina, iturin, surfactin e monodern), drogas imunossupressivas (ciclosporina A), ácidos orgânicos, compostos aromáticos alimentares e diversas enzimas. A maioria das aplicações citadas envolvem a utilização de resíduos agroindustriais como substrato, apesar de alguns usarem suportes inertes para cultivo.

Tabela 2.3 – Aplicações industriais da FES (adaptado de **Raimbault, 1997**)

Aplicações	Exemplos
Alimentos Fermentados	Koji, Tempeh, Ragi, Attieke, queijos
Bioconversão de Resíduos	Bagaço de cana, polpa de café
Aditivos de Alimentos	Flavorizantes, Corantes, óleos essenciais
Bioinseticidas	Beauveria, Metarhizium, Trichoderma
Produção de Enzimas	Amilases, Celulases, Proteases, Pectinases e Xilanases
Fármacos	Penicilina e Probióticos
Produção de Ácidos Orgânicos	Ácido Cítrico, Fumárico, Gálico, Láctico, Giberélico
Fermentação Alcoólica	Schwanniomyces sp., Malteação
Metabólitos Fúngicos	Hormônios e Alcalóides

Há aspectos importantes que devem ser considerados no desenvolvimento geral de um bioprocesso em FES. Esses incluem seleção de microrganismos e substratos adequados, otimização dos parâmetros de processo, isolamento e purificação do produto.

Seleção de um substrato adequado é outro ponto chave da FES. Em FES, o material sólido não é solúvel, agindo, em muitos casos, como suporte e fonte de nutrientes. O material sólido pode ser de origem natural tal como resíduos agroindustriais ou um suporte inerte impregnado de solução nutriente (**Pandey et al.**,2000; **Ooijkaas et al.**,2000; **Pandey**, 2003). **Durand** (2003) menciona que matrizes usadas como suporte nos processos em estado sólido podem variar na sua composição, tamanho, resistência mecânica, porosidade e capacidade de retenção de água.

Sistemas em estado sólido apresentam diversas vantagens em relação aos cultivos submersos. Como vantagens biológicas cita-se a baixa demanda de água, utilização de substratos insolúveis em água e fontes de carbono pouco usuais e a similaridade com o ambiente natural de muitos microrganismos. Podemos citar como vantagens de processo a alta produtividade volumétrica, facilitada recuperação de produtos e reduzidas exigências energéticas. No entanto, esses sistemas podem apresentar alguns problemas como o surgimento de gradientes de temperatura, umidade, oxigênio e nutrientes. Além disso, estes processos apresentam desvantagens tais como a utilização apenas de microrganismos que desenvolvam-se em baixos níveis de umidade e atividade de água, dificuldades na medida e controle de parâmetros, necessidade de elevados inóculos, pré-tratamento do substrato e dificuldades no escalonamento do processo (**Ooijkaas et al.**,2000; **Bastos**, 2006).

Mencionando a classificação teórica baseada na atividade de água, somente fungos e leveduras seriam adequados aos processos de fermentação em estado sólido. Devido ao elevado requerimento de atividade de água, pensava-se que culturas bacterianas não fossem adequadas a esses processos. No entanto, a experiência tem demonstrado que culturas bacterianas podem ser bem controladas e manipuladas em FES (**Pandey**, 2003).

2.4.2. REATORES USADOS EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

Os tipos mais comuns de biorreatores usados em cultivo em estado sólido, segundo **Durand** (1997), **Mitchell et al.** (2000) e conforme reafirma **Bastos** (2006), são do tipo bandeja, leito fixo, agitados e de leito fluidizado gás-sólido.

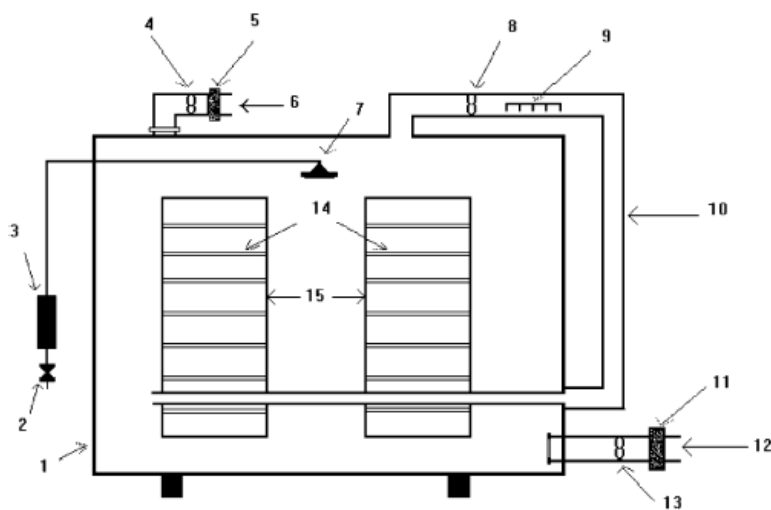


Figura 2.15. Reator de Bandejas do Tipo *Koji* (adaptado de **Durand**, 2003)

Biorreatores de bandeja são caracterizados pela simplicidade de sua configuração, uma vez que o substrato é disposto em bandejas que normalmente são perfuradas para a

facilitação da convecção do ar. Neste tipo de biorreator não há aeração forçada nem agitação mecânica, por isto se utiliza finas camadas de substrato com o intuito de controlar o aquecimento metabólico e para a manutenção das condições aeróbias (**Robinson & Nigam**, 2003; **Durand**, 2003 ; **Bastos**, 2006).

Na Figura 2.15, apresentada acima, adaptada de **Durand** (2003), observamos uma configuração típica para reatores do tipo bandeja usados no processo *Koji*, onde observamos (1) uma sala Koji, (2) válvula de água, (3) tubo de UV, (4,8,13) sopradores, (5,11) filtros de ar, (6) saída de ar, (7) umidificador, (9) aquecedor, (10) recirculação de ar, (12) entrada de ar, (14) bandejas e (15) suportes para as bandejas.

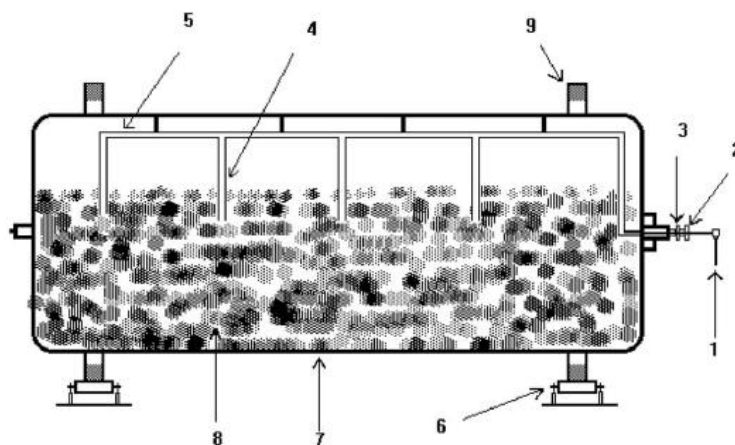


Figura 2.16. Reator de tambor rotativo (adaptado de **Durand**, 2003)

Reatores agitados podem apresentar duas configurações peculiares:

- i. Reatores de tambor rotatório e
- ii. Reatores estáticos.



Na figura 2.17, **Durand (2003)** apresenta um sistema típico para reatores com

Em reatores de leito fixo (figura 2.18 e 2.19) a aeracção forçada é promovida através

em plástico, com controle de temperatura feita em por meio de banho termostático ou através de camisas nas colunas (**Durand,2003; Bastos 2006**).

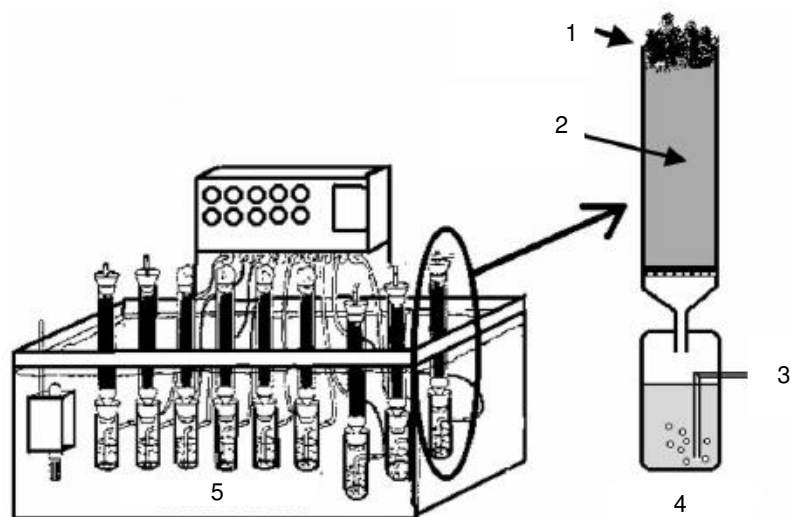


Figura 2.18. Reatores do tipo leito fixo em escala laboratorial (adaptado de **Durand, 2003**).

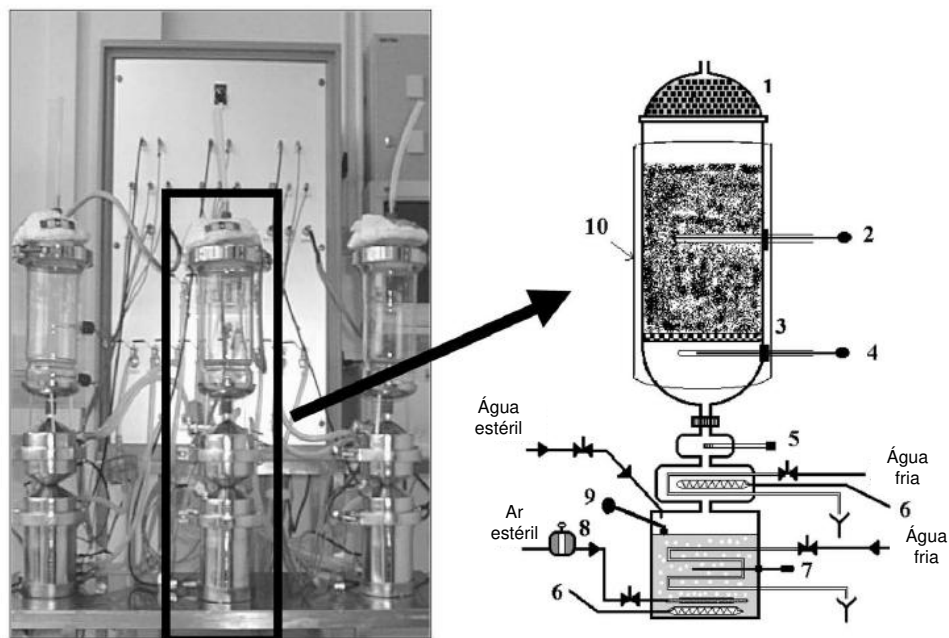


Figura 2.19. Esquema de coluna esterilizável para escala laboratorial(adaptado de **Durand, 2003**).

2.4.3. FENÔMENOS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA NO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

O cultivo em estado sólido é caracterizado como um sistema heterogêneo, de maneira que possui algumas limitações, em especial limitações quanto ao transporte de massa e calor, podendo, assim, comprometer a produtividade (**Gowthaman et al.**, 1993; **Bastos**, 2006). Observa-se, portanto, que as características desses fenômenos de transferência, conforme ressalta **Bastos** (2006), estão intimamente ligados à natureza do substrato e do microrganismo, condutividade térmica, difusividade efetiva, porosidade e teor de umidade do substrato sólido.

O crescimento dos microrganismos é dependente da difusão interpartícula e intrapartícula dos gases (O_2 e CO_2) como também de enzimas, nutrientes e produtos do metabolismo.

Para **Raghavarao et al.** (2003), os fenômenos que ocorrem em sistemas reacionais dessa espécie podem ser classificados como:

- i. Fenômenos macroscópicos e
- ii. Fenômenos microscópicos.

Macroscopicamente (figura 2.20), os processos de transferência de massa incluem:

- i. O fluxo de ar no biorreator que traz como conseqüências mudanças na temperatura e nas concentrações de O_2 , de CO_2 e de água;
- ii. A convecção natural, a difusão e a condução que ocorrem na direção normal ao fluxo de ar durante a aeração;
- iii. Condução de calor através da parede do biorreator;
- iv. Efeitos de cisalhamento causados pela mistura dentro do biorreator que inclui aspectos da manutenção da integridade das partículas sólidas.

Apesar desses fenômenos apresentarem importantes contribuições para os balanços de massa e energia, não necessariamente apresentam-se com a mesma intensidade em todos os tipos de biorreatores, segundo afirma **Mitchell** e colaboradores (2000).

Mitchell e colaboradores (2000) apresentam o resumo dos principais fenômenos que ocorrer dentro de um reator de FES.

Os vários fenômenos de transferência de massa e de energia que ocorrem dentro do leito em FES estão relacionados entre si. Há duas abordagens para a descrição destes fenômenos, na primeira delas, os fenômenos relacionados a um leito estático são tratados considerando um sistema homogêneo e com uma única fase. Na segunda abordagem, o ar e a fase sólida são tratadas como fases distintas.

O leito é o sítio onde ocorre o crescimento microbiano e, portanto, é o local onde acontecem os fenômenos relacionados ao metabolismo destes microrganismos. Dentre estes fenômenos, destacam-se a produção de calor, água e as mudanças de composição pela produção de metabólitos. Inerente aos fenômenos metabólicos observa-se a condução deste calor formado, em resposta aos gradientes de temperatura, com a energia que flui de regiões mais quentes para regiões mais frias; a difusão dos componentes da fase gasosa (O_2 , CO_2 e vapor d' água) que acontece nos espaços inter-partículas em resposta aos gradientes de concentração; a transferência de calor e massa por convecção, que ocorre em leitos forçosamente aerados, e que correspondem ao carregamento de massa e energia formada pela movimentação da fase gasosa no leito; evaporação da água formada com a remoção de energia da fase sólida na forma de entalpia de vaporização.

Além dos fenômenos internos ao leito microscopicamente ocorrem fenômenos de transferência de massa e energia que estão vinculados ao domínio da partícula e não apenas do leito como uma fase contínua e homogênea. Assim todas as transferências de calor e massa são peculiares à cada partícula do leito como um subsistema particular.

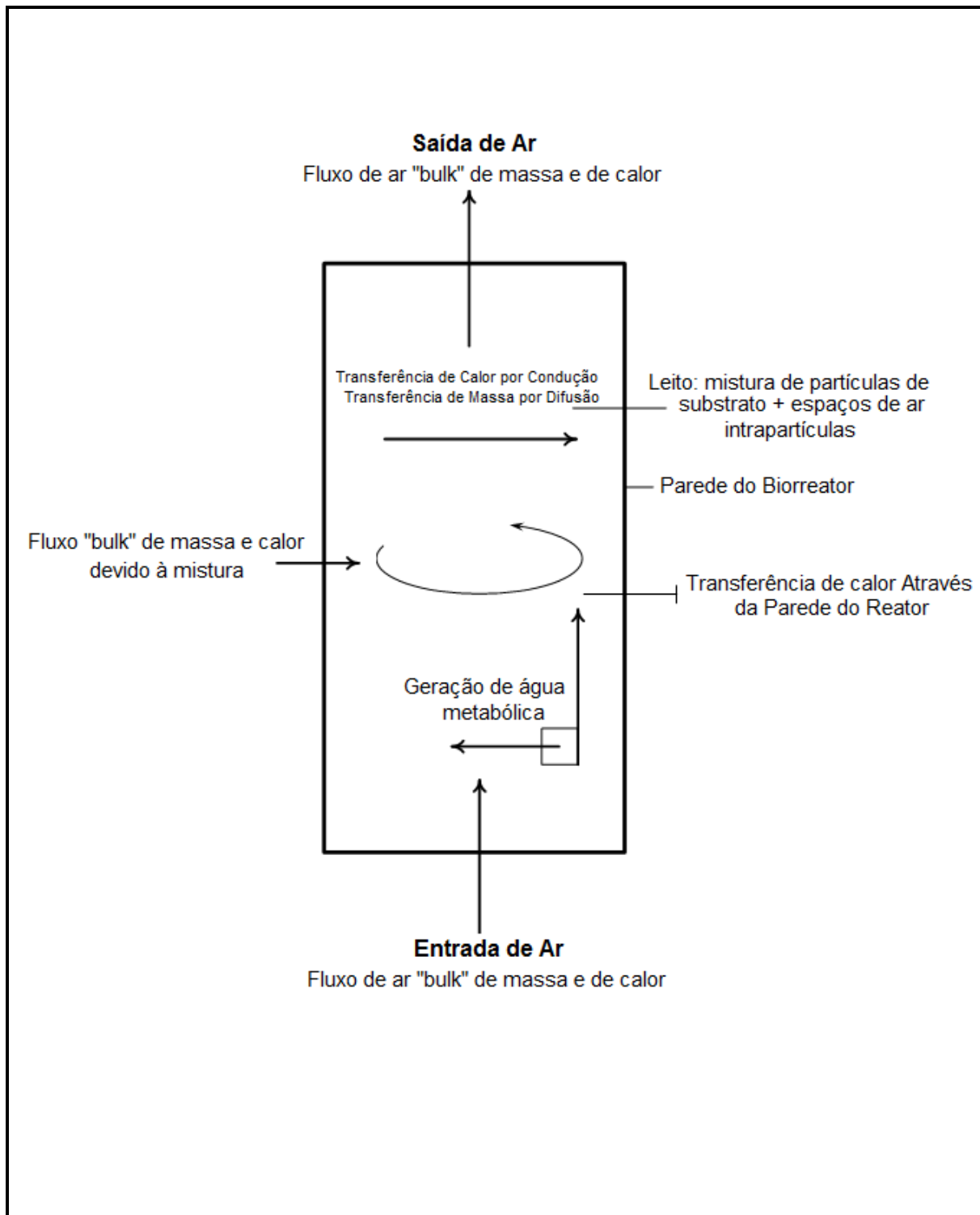


Figura 2.20. Sumário Representativo dos Fenômenos Macroscópicos que ocorrem em biorreatores(adaptado de **Mitchell** e colaboradores, 2000).

Microscopicamente, observamos que os microrganismos crescem na região úmida na superfície dos substratos sólidos. No caso de sistemas fúngicos, durante o crescimento, as hifas penetram na partícula em busca de nutrientes, o que acarreta difusão de solutos do interior da partícula (**Mitchell et al.**, 2000; **Bastos**, 2006). No caso de sistemas bacterianos, o crescimento se dá no meio líquido que está estagnado em volta da partícula e na região intraparticular embebida por líquido em um meio estagnado intraparticular.

2.4.4. TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A forma mais prática de aumentar o metabolismo aeróbio é facilitando a transferência de Oxigênio da fase gasosa para os microrganismos via aumento da área de interface entre a fase gasosa e o biofilme. A área interfacial pode ser aumentada através da redução do tamanho das partículas ou pré-tratamento do substrato (**Oostra et al.**, 2001).

Assim, em processos que ocorrem sob aerobiose, a transferência de oxigênio é um dos fenômenos mais importantes para o crescimento e manutenção do microrganismo durante esses processos.

O coeficiente global de transferência de massa (gás-líquido), o K_La , portanto, é uma variável de grande importância na descrição destes processos, conforme menciona **Poughon** e colaboradores (2003).

Nos cultivos em estado sólido, são raros os trabalhos que abordam este tema de maneira quantitativa, mesmo que a transferência de oxigênio seja um fator limitante em alguns sistemas reacionais, conforme observa **Bastos** (2006).

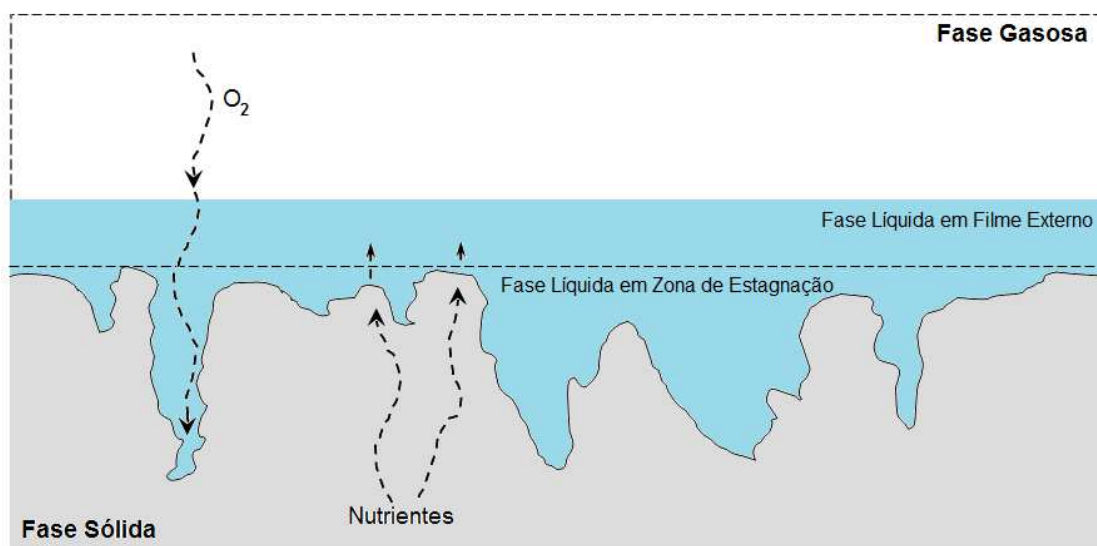


Figura 2.21. Transferência de Oxigênio em Sistemas sólidos porosos.

Os microrganismos crescem no interior ou na superfície de partículas porosas. Há formação superficial de um filme líquido delgado.

De uma forma geral, a transferência de oxigênio nesses processos está associada a três domínios de ocorrência (Figura 2.21). Há uma etapa inicial de transferência de oxigênio do domínio gasoso para o domínio líquido no filme externo à partícula. A segunda etapa está associada ao transporte no líquido estagnado nas reentrâncias e poros do sólido, constituindo uma zona de estagnação. Dessa forma, menciona **Thibault et al.** (2000), o oxigênio é transferido por convecção da fase gasosa para o filme estagnado e por difusão molecular através do filme e nos poros do substrato sólido. **Thibault et al.** (2000)

comprovam que o coeficiente de transferência de massa convectivo não influencia na transferência de oxigênio em cultivos sobre substratos sólidos.

Bastos (2006) assume a afirmação de **Thibault et al.** (2000) e considera apenas a transferência difusiva de oxigênio através do filme líquido em seu sistema.

Doran (1997) mostra que a taxa global de transferência de oxigênio pode ser expressa por:

$$N=K_La(C^*-C_L) \quad \text{(Equação 2.1)}$$

Onde N é a taxa volumétrica de transferência de oxigênio; K_L é o coeficiente de transferência de oxigênio na fase líquida; a é a área interfacial para transferência de O_2 ; C^* é a concentração de O_2 na interface gás-líquido e C_L é a concentração média de O_2 no filme líquido.

Há, no entanto que se fazer a assertiva de que o K_La deve ser usado com muito cuidado, visto que devido a presença de organismos no filme líquido, os perfis de concentração de oxigênio são fruto da difusão e do consumo.

A teoria do filme poderá ser aplicada para caracterizar a transferência de oxigênio. O balanço gasoso no biorreator poderá ser usado, segundo **Thibault et al.** (2000), para estimar o K_La , visto que o método dinâmico, aplicado a fermentação submersa não pode ser aplicado em FES.

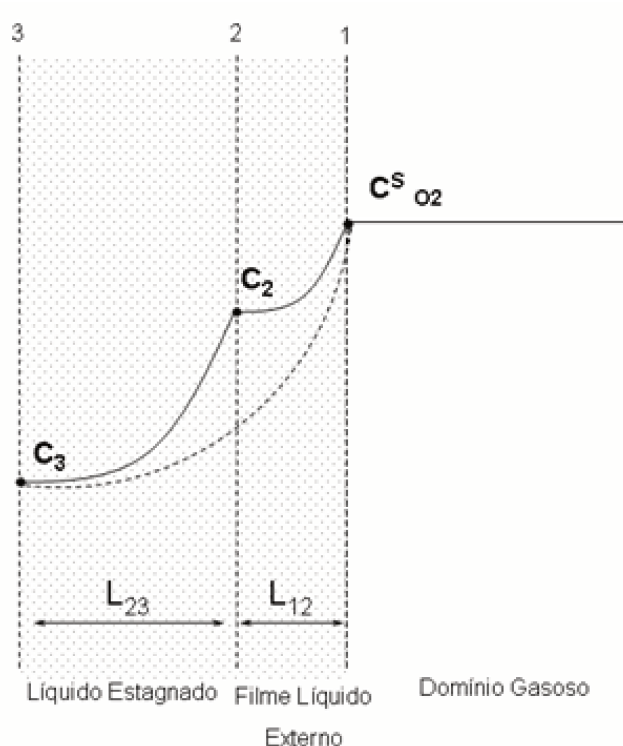


Figura 2.22 – Representação geral da teoria do Filme e do transporte de oxigênio em FES.

Considerando a teoria do filme (figura 2.22), e observando a figura que mostra a transferência de oxigênio no sólido poroso intumescido, podemos considerar a existência de 2 interfaces que descrevem o sistema em questão.

- 1- gás/líquido em filme externo;
- 2- líquido/líquido na zona de estagnação.

Continuamente, a assertiva desta hipótese assumida é que essas duas regiões 1-2 e 2-3 fazem parte do mesmo conteúdo de líquido disponível à transferência de oxigênio.

Onde C_{sO_2} é a concentração da solubilidade de oxigênio no meio líquido; C_2 é a concentração de oxigênio no filme externo e C_3 é a concentração de oxigênio no interior do sólido intumescido. Há portanto que se destacar a difusão do oxigênio inicialmente no filme líquido externo e a difusão no líquido estagnado no interior do sólido.

Assim, A taxa global de transferência de O_2 nesse caso ficará sendo resultado de uma função direta do coeficiente global de transferência de oxigênio e da diferença entre as concentrações C_{sO_2} e C_3 .

$$N = K_L a (C_{sO_2} - C_3) \quad (\text{Equação 2.2})$$

2.5. MERCADO E APLICAÇÕES DO ÁCIDO HIALURÔNICO

2.5.1. APLICAÇÕES DO ÁCIDO HIALURÔNICO

O AH tem sido usado em diversas especialidades médicas, entre as quais dermatologia, ortopedia, otorrinolaringologia e oftalmologia (Soll,2004). Na dermatologia, o AH tem sido empregado no tratamento de úlceras crônicas de pele, acelerando a cicatrização dessas lesões. Em ortopedia, o AH vem sendo utilizado no preenchimento de articulações acometidas por osteoartrose e por artrite (Soll,2004; Goa & Benfield, 1994). Em otorrinolaringologia, tem sido utilizado como adjuvante na cicatrização de perfurações timpânicas (Goa & Benfield, 1994). Na oftalmologia, o uso de AH já é bem difundido

como substância viscoelástica para utilização em cirurgias intraoculares, principalmente na cirurgia de catarata (**Belkin et al.**,1996; **Soll**, 2004). Entretanto, novas aplicações oftalmológicas têm sido propostas para esse mucopolissacarídeo (**Soll**,2004).

Balazs (2004) classifica os usos médicos do AH como:

- i. **Viscocirurgia:** para proteger tecidos delicados e fornecer espaço durante manipulações cirúrgicas como em cirurgias oftalmológicas;
- ii. **Viscoaumento:** para preencher e aumentar espaços em tecidos como a pele, músculos esfíncter e tecidos vocais;
- iii. **Viscosseparação:** para separar superfícies do tecido conjuntivo traumatizadas por procedimentos cirúrgicos ou injúria, no intuito de prevenir adesões e formação excessiva de cicatrizes;
- iv. **Viscossuplementação:** para substituir ou suplementar fluidos de tecidos, como substituição do fluido sinovial em artrite aguda, e para aliviar dores.
- v. **Viscoproteção:** para proteger superfícies saudáveis, feridas ou injuriadas de desidratação ou agentes ambientais prejudiciais, e para promover a cura de tais superfícies.

Asari (2004), no entanto, classifica o AH de acordo com três grandes grupos de aplicações médicas, aplicações que exploram as suas características físico-químicas, nas aplicações que se baseiam nas funções biológicas da célula e as aplicações que exploram ambas as características.

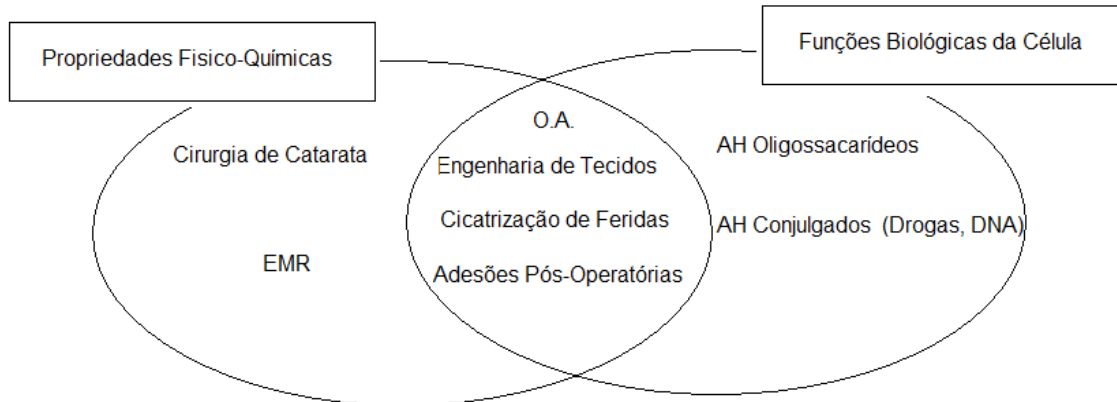


Figura 2.23 – Três tipos de aplicações médicas do AH (adaptado de **Assari**, 2004)

Assari apresenta as aplicações do AH com base em suas propriedades viscoelásticas como: cirurgia de catarata e ressecção endoscópica da mucosa, àquelas relacionadas com as funções biológicas celulares como as aplicações de oligossacarídeos de AH em tumores e as aplicações que envolvem as duas características como tratamento da osteoartrite, engenharia de tecidos, cicatrização de feridas e usos em condutas pós-operatórias para evitar adesão.

O primeiro produto a base de AH no mercado foi Healon®, extraído de crista de galo fabricado em 1979 pela *Biotrics, Inc.* (Arlington, MA) e posteriormente pela *Pharmacia*, Suécia, agora *Pfizer* (Nova Iorque, EUA). Atualmente, diversas preparações de variadas massas molares são disponíveis, incluindo uma combinação entre o AH e o sulfato de condroitina. (**Chong et al.**, 2004).

Além das aplicações clássicas do AH em oftalmologia, diversas outras maneiras de utilizá-lo nesta área foram desenvolvidos nos últimos anos. A mais recente aplicação e também a que tem ganhado mais notoriedade é a terapia gênica ocular, como alternativa promissora para o tratamento de diversas afecções oculares. Tem-se investigado a eficácia da aplicação de AH como carreador de genes para córnea e conjuntiva. **De la Fuente *et al.*** (2008), estudaram o mecanismo de ação de nanopartículas de baixa citotoxicidade preparadas a partir de AH e de quitosana com essa finalidade. A interação do AH com o receptor CD44 parece exercer papel importante no fluxo de partículas para o meio intracelular, favorecendo o uso dessa substância para o carregamento de genes da superfície ocular para as células corneais e conjuntivais.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, N.; GHOSH, P. Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial. *Inflammation Research*, v. 50, p.294-299, 2001.
- AEBISCHER, P., GODDARD, M., MOLDAUER, J. G., MULHAUSER, P. J., RATHBUN, A. M., SANBERG, P. R., VASCONCELLOS, A. V., WARNER, N. F.

- Implantable Therapy System and Methods. United States Patent n. 6,179,826.
January 30, 2001.
- AKASAKA, H., KOMASAKI, H., ARAI, T. Fermentation method for producing
hyaluronic acid. United States Patent n. 4,801,539, 1989.
- AKASAKA, H.; SUSUMU, S.; YANAGI, M.; FUKUSHIMA, S.; MITSUI, T.. Journal of
the Society of Cosmetic Chemists Japan, v.22, p.35-42, 1988.
- ALCÂNTARA, S. R.; ALMEIDA, F. de A. C.; SILVA, F. L. H. da; GOMES, J. P.
Isotermas de adsorção do pedúnculo seco do caju. Revista Brasileira de Engenharia
Agrícola e Ambiental, v.13, n.1, p.81-87, 2009.
- ALTMAN, R. D., ROLAND, M. A randomized clinical trial of intra-articular sodium hyaluronate in
patients with osteoarthritis of the knee. American Journal of Orthopedics. v.28, n.11, 1999.
- ARMSTRONG, D.C. The molecular weight properties of hyaluronic acid produced
Streptococcus zooepidemicus. 1997. Queensland: University of Queensland, 1997.
(PhD. Thesis).
- 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.
- ARMSTRONG, D.C.; JOHNS. M.R. Culture conditions affect the molecular weight
properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Applied and
Environmental Microbiology, v. 63, n. 7, p. 2759–2764, 1997.

- ASARI, A., Medical application of hyaluronan. In Chemistry and Biology of Hyaluronan. Edited by Garg, H.G. and Hales, C.A. Elsevier Ltd, Harvard Medical School, Boston. pp. 457-458., 2004.
- BALAZS, E.A. Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use. In: GARG, H.G.; HALES, C.A. Chemistry and biology of hyaluronan. 1. ed. Oxford: Elsevier, p.415-455, 2004.
- BALAZS, E.A.; LAURENT, T.C. Viscosity function of hyaluronic acid as a polyelectrolyte. Journal of Polymer Science, v.6, p.665-667, 1951.
- BASTOS, R.G., Transferencia de oxigenio no cultivo em estado solido de *Dreschlera (Helminthosporium) monoceras*, 165p. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006. (Tese de Doutorado)
- BEATY, N.B.; TEW, W.P.; MELLO, R.J. Relative molecular weight and concentration determination of sodium hyaluronate solutions by gel-exclusion high-performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry, v.147, p.387-395, 1985.
- BELKIN M, SAVION N, LANDSHMAN N, inventors. Preparations for the treatment of eyes. United State Patent 5510329. 1996 April 23
- BLANK, L.M.; MCLAUGHLIN, R.L.; NIELSEN, L.K. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. Biotechnology and Bioengineering, v. 90, n. 6, p. 685-693, 2005.
- BORZANI, W., AQUARONE, E., LIMA, U. A., SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial. Editora Edgard Blucher Ltda. Volume 2. 1a Edição 2001.

- BRANDT, K. D.; MICHALSKI, J.; BLOCK, J. A.; CALDWELL, J. R. Clinical Experience with Orthovisc in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee. Anika Therapeutics. 1999.
- BROWN, K. K., RUIZ, L. C., RINJ, I. Ultrapure hyaluronic acid and method of making it. United States Patent n. 4,782,046, 1988.
- CAMPOS, D. C. P., SANTOS, A. S., WOLKOFF, D.B., MATTA, V. M., CORRÊA, L. M. C., COURI, S., Cashew apple juice stabilization by micro filtration. Desalination, 148 (1): 61-65, 2002.
- CHONG, B.F., BLANK, L. Metabolic Engineering of Hyaluronic Acid Production. The Department of Chemical Engineering, University of Queensland, St. Lucia, Australia, 1998.
- 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, B.F.; NIELSEN, L.K. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. Journal of Biotechnology, v. 100, p. 33-41, 2003.
- CLELAND, R.L. Iic polysaccharides. II. Comparison of polyelectrolyte behavior of hyaluronate with that of carboxymethyl cellulose. Biopolymers, v. 6, n.11, p.1519-1529, 1968.
- COONEY, M.J.; GOH, L.-T.; LEE, P. L.; JOHNS, M. R. Structured model-based analysis and control of the hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*:

- physiological implications of glucose and complex-nitrogen-limited growth. *Biotechnology Progress*, v. 15, p. 898-910, 1999.
- DAY, A. J.; SHEEHAN, J. K.. Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Current Opinion in Structural Biology*, v.11, p.617–622, 2001.
- DE LA FUENTE M, SEIJO B, ALONSO MJ. Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49(5):2016-24, 2008.
- DEANGELIS, P.L. Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases. *Glycobiology*, v. 12, n. 1, p. 9R-16R, 2002.
- DISCHE, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. *Journal of Biological Chemistry*, v.167, p.189-198, 1946.
- DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. Edition Academic Press, 1995, 417 p.
- DOUGHERTY, B., A., RIJN, I. Molecular Characterization of hasB from an Operon Required for Hyaluronic Acid Synthesis in Group a Streptococci. *Journal of Biological Chemistry*. V.268, n.10, p.7118-7124. April, 1993.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, V. 13. p.113-125. 2003.
- DURAND, A., RENAUD, R., MARATRAY, J.,ALMANZA, S. The INRA-Dijon reactors: Designs and applications. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B.K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALES, G. *Advances in Solid State Fermentation*. Proceedings of

the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation. Montpellier, França.
p.75-92. 1997.

ELLWOOD, D. C., EVANS, C. G. T., DUNN. G. M., MCINNES, N., YEO, R. G.
Production of hyaluronic acid. United States Patent n.5,563,051. October 8,1996.

EVANKO, S.; WIGHT, T. Intracellular hyaluronan:. In: Hyaluronan synthesis, function,
catabolism. Disponível em:
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA20/HA20E.html>. Acesso em
13 jul. 2006.

FOUISSAC, E.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Shear-rate, concentration, molecular weight,
and temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte.
Macromolecules, v.26, p.6945–6951, 1993.

GOA, KL, BENFIELD, P., Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a
surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound
healing. Drugs.; 47(3):536-66,1994

GOLDENHEIM, P., LACOUTURE, P., DONIGI-GALE, D., CHASIN, M., SACKLER, R.
Prolonged Anesthesia in Joints and Body Spaces. United States Patent n.6,248,345.
June 19, 2001.

GÓMEZ-ALEJANDRE, S., SÁNCHEZ, E., ABRADELO, C., REY-STOLLE, M. F.,
HERNÁNDEZ-FUENTES, I. Partial Specific Volume of Hyaluronic acid in Different
media and conditions. International Journal of Biological Macromolecules. v.27, p.287-
290, 2000.

- GOWTHAMAN, M.K.; RAGHAVA RAO, K.S.M.S.; GHIDYAL, N.P. & KARANTH, N.G. Estimation of K_{La} in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. *Process Biochemistry*. V.30, p.9-15. 1995.
- GOWTHAMAN, M.K.; RAGHAVA RAO, K.S.M.S.; GHILDYAL, N.P. & KARANTH, N.G. Gas concentration and temperature gradients in a packed bed solid-state fermentor. *Biotechnology Advances*. V. 11, p. 611–620. 1993.
- GUITIÉRREZ-CORREA, M. & VILLENA, G.K. Surface adhesion fermentation: a new fermentation category. *Rer. peru biol*. V. 10 (2), p.113-124, 2003.
- HANEY, A.F., DOTY, E. A Barrier Composed of Chemically Cross-linked Hialuronic Acid (Incert) Reduces Postoperative Adhesion Formation. *Fertility and Sterility*. v.70, n.1, p.145-151, July, 1998.
- HARDINGHAM, T. Solution properties of hyaluronan. In: GARG, H.G.; HALES, C.A. *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2004. p.1-19.
- HASAN, S.D.M. Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* obtida por fermentação em estado sólido. Tese de Doutorado FEQ – UNICAMP. Campinas, 2002.
- HASCALL, V.C.; LAURENT, T.C. Hyaluronan: structure and physical properties. Disponível em: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>. Acesso em: 11 ago. 2005.

- HASEGAWA, S., NAGATSURU, M., SHIBUTANI, M., YAMAMOTO, S., HASEBE, S.,
Productivity of concentrated hyaluronic acid using maxblend fermentor. J Biosci
Bioeng 88, 68–71, 1999.
- HOLMSTRÖM, B., RICICA, J. Production of hyaluronic acid by a *Streptococcal* strain in
batch culture. Applied Microbiology, v.15, p.1409-1413, 1967.
- HONORATO, T. L., RABELO, M. C., PINTO, G. A. S., RODRIGUES, S., Produção de
ácido láctico e dextrana utilizando suco de caju como substrato. Ciência e Tecnologia de
Alimentos, 27, 787–792, 2007.
- HUANG, W.C., CHEN, S.J. and CHEN, T.L. The role of dissolved oxygen and function of
agitation in hyaluronic fermentation. Biochem. Eng. J., v.32, p.239-243, 2006.
- HUMPHREY, A.E., TAGUCHI, H. Dynamic Measurement of Volumetric Oxygen
Transfer Coefficient in Fermentation Systems. Journal Ferm. Technol. V.44, n.12,
p.881-889, 1966.
- IQBAL, Z.; MIDGLEY, J.M.; WATSON, D.G.; KARDITSAS, S.D.; DUTTON, G.N.;
WILSON, W. Determination of molecular weight of hic acid in bovine vitreous humour
ad Healon[®] by high performance gel permeation chromatography and its
depolymerization with ascorbic acid. *Pharm. World Sce*, v.19, n.5, p.246-250, 1997.
- JERNBERG, G. R. Surgical Implant and Method for Controlled Release of
Chemotherapeutic Agents. United States Patent n. 5,290,271. March 1, 1994.
- JOHNS, M.R.; GOH, L.T.; OEGGERLI, A. Effect of pH, agitation and aeration on
hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. Biotechnology Letters, v.
16, n. 5, p. 507-512, 1994.

- KENDALL, F.E., HEIDELBERGER, M., DAWSON, M. H. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic *Streptococcus*. Journal of Biological Chemistry. v.118, p.61-69, 1937.
- KIM, J., YOO, S., OH, D., KWEON, Y., PARK, D., LEE, C., GIL, G. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. Enzyme and Microbial Technology, v.19, p.440-445, 1996.
- KOGAN, G.; SOLTES, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnology Letters, v.29, p.17-25, 2007.
- LANCEFIELD, R.C. A serological differentiation of human and other groups of streptococci. Journal of Experimental Medicine, v.59, p.141-158, 1933.
- LAPCIK JR., L.; LAPCIK, L.; DE SMEDT, S.; DEMEESTE, J.; CHABRECEK, P. Hyaluronn: preparation, structute, properties and applications. Chemical Reviews, v. 98, n.8, p.2663-2684, 1998.
- LAURENT, T.C. "The tree": hyaluronan research in the 20th century. Disponível em: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA23/HA23.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 2005.
- LONSANE, B.K.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZALES, G.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M.M. Scale-up strategies for solid state fermentation system. Process Biochemistry, V.27, p.259-273, 1992.

- M.K. COWMAN, S. MATSUOKA, Experimental approaches to hyaluronan structure. Carbohydr. Res. 340, 791–809, 2005.
- MACEDO, A.C., Estudo da produção de ácido hialurônico por fermentação de *Streptococcus zooepidemicus* em substrato de caju (*Anacardium occidentale* L.), Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil, 2007.
- MATIAS, M. F. O.; OLIVEIRA, E. L.; GERTRUDES, E.; MAGALHÃES, M. M. A. Use of fibres obtained from cashew (*Anacardium occidentale*, L) and guava (*Psidium guajava*) fruits for enrichment of food products. Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v. 48, p. 143-150, 2005. Edição especial.
- MITCHELL, D.A.; DO, D.D.; GREENFIELD, P.F. & DOELLE, H.W. A semimechanistic mathematical model for growth of *Rhizopus oligosporium* in a model solid-state fermentation system. Biotechnology and Bioengineering, V.38, p.353-362. 1991.
- MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; STUART, D.M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. Process Biochemistry, V. 35, p. 1211-1255. 2000.
- MITCHELL, D.A.; PANDEY, A.; SANGURASAK, P. & KRIEGER, N. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid state fermentation. Process Biochemistry, V.35, pp.167-178. 1999.
- MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F. & KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. Biochemical Engineering Journal, V. 36, p. 1-11. 2002.

- MORTON, J.F., DOWLING, C.F., Fruits of warm climates, Creative Resources Systems, pp 239–240. ISBN: 0961018410, 1987.
- MOURA FÉ, J. A.; HOLANDA, L. F. F.; MARTINS, C.B. Característica químicas do hipocampo do caju (*Anacardium occidentale*, L.) Ciência Agronômica, Fortaleza, v. 2. n.2. p.109-112, 1972.
- NIMROD, A.; GREENMAM, B.; KANNER, D.; MOSHE, B. AND LANDSBERG, Y. Method of producing high molecular weight sodium hyaluronate by fermentation of streptococcus. United State Patent: 4,780,414, 1988.
- O'REGAN, M.; MARTINI, I.; CRESCENZI, F.; DE LUCA, C.; LANSING, M. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.*, v.16, p.283-286, 1994.
- OGRODOWSKI, C.S. Produção de ácido hialurônico por *Streptococcus*: estudo da fermentação e caracterização do produto. 2006. 103p. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006. (Tese de Doutorado).
- OGRODOWSKI, C.S.; HOKKA, C.O.; SANTANA, M.H.A. Influência da relação C/N e da adição de lisozima no rendimento e propriedades do ácido hialurônico produzido por fermentação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 25., 2004, Porto Alegre. Anais. Porto Alegre: AIDIS, 2004. p. 1-8, 1.
- OLIVEIRA, A.H. S. Produção e Caracterização do ácido hialurônico obtido por fermentação do suco de caju com *Streptococcus zooepidemicus*. 2004. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (Dissertação de Mestrado).

- OOIJKAAS, L.P.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J. & RINZEMA, A. Growth and sporulation stoichiometry and kinetics of *Coniothrium minitans* on agar media. Biotechnology and Bioengineering. V.69, n.3, p.292-300. 2000b.
- OOIJKAAS, L.P.; WEBER, F.J.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. Trends in Biotechnology, V.18. p.355-360. 2000a.
- OOSTRA, J.; COMTE, E.P.I.; VAN DER HEUVEL, J.C.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. Biotechnology and Bioengineering, V.75, n.1, p.13-24. 2001.
- PAIVA, F.F. de A.; SILVA NETO, R.M.; PESSOA, P.F.A. de P. Minifábrica de processamento de castanha de caju. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. 22p. (Circular Técnica, 7).
- PANDEY, A. & RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. Enzyme Microbiology Technology, V.14, p.486-488. 1992.
- PANDEY, A. Solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal. V.13.p.81-84. 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. & MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-Bioprocesses and products. Process Biochemistry, V.35, p.1153-1169. 2000.

- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON & NIGAM, P. Solid-state fermentation in biotechnology. Fundamentals and Applications. Asiatech Publishers, INC. New Delhi. 2001
- PAULA PESSOA, P. F. A. de. Importância Econômica da Cajucultura. Fortaleza: EMBRAPA CNPAT, 2003.
- 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.
- PIRES, A. M. B., SANTANA, MARIA H. A. . Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* , p. 1-10, 2010.
- POUGHON, L.; DUCHEZ, D.; CORNET, J. F.; DUSSAP, C. G. k_{La} determination: comparative study for a gas mass balance method. *Bioprocess and biosystems engineering*. 25(6):341-8,2003.
- PREHM, P. Hyaluronan. In: VANDAMME, E.J.; DE BAETS, S.; STEINBUCHER, A. *Biopolymers: biology, chemistry, biotechnology, applications*. v.5. Polysaccharides I. Polysaccharides from prokaryotes. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. p. 379-404.
- PREHM, P. Hyaluronan. In: VANDAMME, E.J.; DE BAETS, S.; STEINBUCHER, A. *Biopolymers: biology, chemistry, biotechnology, applications*. v.5. Polysaccharides I. Polysaccharides from prokaryotes. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. p. 379-404.

- RABELO, M. C. ; FONTES, C.P.M.L. ; RODRIGUES, S., Enzyme synthesis of oligosaccharides using cashew apple juice as substrate, *Bioresource Technology*, V. 100, P. 5574-5580, 2009.
- RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V. & KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. V.13, p.127-135. 2003.
- RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALES, G. Advances in Solid State Fermentation. Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation. Montpellier, França. p.75-92. 1997.
- SCOTT, J.E.; CUMMINGS, C.; BRASS, A.; CHEN, Y. Secondary and tertiary structures in aqueous solution: a C-13 NMR study. Proceedings of the National Academy of Sciences., v.96, p.4850-4855, 1999.
- ŠOLTÉS, L.; MENDICHI, R.; KOGAN, G.; SCHILLER, J.; STANKOVSKÁ, M.; ARNHOLD, J. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. *Biomacromolecules*, v.7, p. 659-668, 2006.
- SOUZA, P.A., MENEZES, J.B., ANDRADE, J.C., FREITAS, D.F., MENDONÇA, V.S., Caracterização química de pedúnculos de caju ‘CCP – 76 em diferentes estágios de desenvolvimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, 2001, Belém, PA. Anais... Belém: SBF, 2001. 1 CD-ROM.
- STEEF, J.F. Rheological methods in food engineering. 2. ed. Michigan: Freeman Press, 1996. p.1-91

- SUZUKI, M., ISHGAKI, K., OKADA, M., ONO, K., KASAI, S., IMAMORI, K. (2001),
Intraarticular Preparation for the Treatment of Arthropathy. United States Patent n.
6,197,326.
- SWANN, D. A.; SULLIVAN, B. P.; JAMIESON, G.; RICHARDSON, K. R.; SINGH, T.
Biosynthesis of hyaluronic acid. United States Patent: 4,897,349, 1990.
- THIBAUT, J.; POULIOT, K.; AGOSIN, E. & PÉREZ-CORREA, R. Reassessment of the
estimation of dissolved oxygen concentration profile and K_{La} in solid state
fermentation. *Process Biochemistry*. V. 36, p. 9-18. 2000.
- THIBAUT, J.; POULIOT, K.; AGOSIN, E. & PÉREZ-CORREA, R. Reassessment of the
estimation of dissolved oxygen concentration profile and K_{La} in solid state
fermentation. *Process Biochemistry*. V. 36, p. 9-18. 2000.
- THONARD, J. C., MIGLIORE, S. A., BLUSTEIN, R. Isolation of hyaluronic acid from
broth cultures of *Streptococci*. *Journal of Biological Chemistry*, v.239, p.726-728,
1963.
- THONARD, J. C., MIGLIORE, S. A., BLUSTEIN, R. Isolation of hyaluronic acid from
broth cultures of *Streptococci*. *J. Biol. Chem.*, v.239, p.726-728, 1963.
- VOGEL, H.C.; TODARO, C.L. Fermentation and biochemical engineering handbook:
principles, process design, and equipment. 2. ed. New Jersey: Noyes Publications,
1997. 801 p.
- WESSELS, M.R., MOSES, A.E., GOLDBERG, J.B., DICESARE, T.J., Hyaluronic acid
capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 1;88(19):8317–8321, 1991

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. APRESENTAÇÃO

Este capítulo traz os diversos enfoques desta pesquisa, suas respectivas metodologias científicas e seus resultados discutidos à luz de trabalhos recentemente publicados e que trazem abordagens importantes à produção de AH. Como mencionado no capítulo 1 desta tese, estas abordagens são aqui apresentadas na forma de artigos submetidos a periódicos científicos selecionados de acordo com a afinidade do periódico e com o aspecto abordado.

3.2. PERIÓDICOS E ARTIGOS

3.2.1. Total Cashew Apple pseudo-Fruit (bagasse and juice) as resource for the production of hyaluronic acid . Artigo submetido à *Biotechnology and Applied Biochemistry* (editado pela *Wiley-Blackwell*).

3.2.2. Hyaluronic Acid Depolymerization by Ascorbate-Redox Effect on solid State Cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in Cashew Apple Fruit Bagasse. Artigo Submetido à *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (editado pela *Springer*).

3.2.3. Metabolic Effects of Initial Sugars Concentration on the Microbial Production of Hyaluronic Acid by Solid State Fermentation in Cashew Apple Bagasse. Artigo Submetido à *Applied Biochemistry and Biotechnology* (editado pela *Springer*).

3.2.4. The Role of Oxygen in the Hyaluronic Acid Production by solid state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in Cashew Apple Bagasse . Artigo Submetido à *Process Biochemistry* (editado pela *Elsevier*).

TOTAL CASHEW APPLE PSEUDO-FRUIT (BAGASSE AND JUICE) AS RESOURCE FOR THE PRODUCTION OF HYALURONIC ACID

André Casimiro de Macedo¹, Ivanildo J. Silva Jr.², Celio L. Cavalcante Jr.², Diana C. S.
Azevedo² and Maria H. A. Santana^{1*}

¹Laboratory of Development of Biotechnological Processes
School of Chemical Engineering, University of Campinas-UNICAMP
13083-852, Campinas-SP, Brazil

²Federal University of Ceará, Center of Technology, Chemical Engineering Department, Campus do Pici, Bl.
709, Fortaleza – CE, 60455-760, Brazil.

SUMMARY – The performance of the total cashew apple (CAPF) was evaluated in solid state (SSF) and submerged (SF) fermentations, for the production of hyaluronic acid (HA) by *Streptococcus zooepidemicus*. The bagasse was previously comminuted up to a Sauter mean diameter 0.67 mm, dried (to 30% moisture) and moisturized (to 50% moisture) by adding a mixture of cashew apple juice, yeast extract and salts at the same composition of the medium used in SF. SSF was performed in fixed bed columns (modified *Raimbault* columns) under forced aeration. The SFs were carried out in Erlenmeyer flasks (500 mL) and in a 3L batch bioreactor. Results showed appreciable HA yields related to total sugars (glucose+fructose), which were 0.159 gg⁻¹ (SSF) and 0.025 gg⁻¹ (SF). Each 1kg of total CAPF yielded 761.25 mg (SSF) and 1790 mg (FS), which were quantified after HA recovery from three consecutive precipitations with ethanol. The average HA molecular weights were 1.83x10⁴ Da (SF- natural aeration in flasks), 2.52x10⁴ Da (SF- forced aeration in bioreactor) and 1.60x10⁵ Da (SSF), which are within the required range for valuable pharmaceutical and cosmetic applications. These results point to the HA production from CAPF as promising and economically viable, given that a high aggregated value polysaccharide can be produced from a non-significant cost substrate (about 90% of CAPF production is lost in the field after removing the nut), added to the environmental benefits. Moreover, the HA from vegetable resources is safe and preferable by consumers.

Key-words: hyaluronic acid, agricultural resources derivatives, fermentation, *Streptococcus zooepidemicus*.

* Corresponding author: Phone.: +55 19 3521 3921; Fax: +55 19 3521 3890

E-mail address: mariahelena.santana@gmail.com

1. INTRODUCTION

Agricultural resources are the most suitable, low cost substrates for microbial cultivation even so their complex composition. Besides their renewable nature, and valuable source of nutrients, agricultural resources avoid the risk of chemical contamination common to synthetic substrates [1,2].

The cashew apple pseudo-fruit (CAPF) (*Anacardium occidentale L.*) is valuable for the production of high value-added products, due to its known content of reducing sugars (glucose and fructose), vitamins, minerals and some aminoacids [3]. The juice has been used in submerged fermentation (SF) for the production of dextran, lactic acid, mannitol, and oligosaccharides [4,5], as well as enzymes had been produced from the bagasse in solid state fermentations (SSF) [6,7]. Filamentous fungi were used in both processes. Prebiotic oligosaccharides were also obtained using *Leuconostoc mesenteroides* cultivated in cashew apple bagasse [5].

Hyaluronic acid (HA) is a linear polysaccharide with high molecular weight composed of disaccharide units of D-glucuronic acid (GlcUA) and N-acetylglucosamine (GlcNAc) joined alternately by β -1-3 and β -1-4 glycosidic bonds [8]. Due to its high viscoelasticity and ability to retain large volumes of water, HA has been of great value for the cosmetic and medical industries [9]. The final products containing HA present high

aggregated value, ranging from US\$ 2,000 to 60,000/kg , regarding the above mentioned applications.

Fermentation has been the preferred source of HA, when considering the risk of viral contamination present in the HA from animal tissues, mainly roost combs and umbilical cords, not to mention the high costs required for its purification [10]. Furthermore, fermentation processes allow the optimization of product yield and better control of culture conditions [9].

In our previous article, we evaluated the main components or supplements of the culture media obtained from agricultural resources derivatives (ARDs), for the production of HA by *Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 39920). The studied main components were hydrolysate soy protein concentrate, whey protein concentrate and cashew apple juice (CAJ). Corn steep liquor was also evaluated as a supplement. They were selected based on the amino acids requirements of *Streptococcus zooepidemicus*, as well as the qualitative and quantitative variability of amino acids in the different sources. The fermentations were carried out in Erlenmeyer flasks. Comparatively, among the evaluated ARDs, only CAJ proved to be a promising medium for the production of HA, with average molecular weight in the magnitude order of 10^4 Da, which finds applications in the biomedical and healthcare fields [11]. CAJ contains the glucose and fructose sugars which may benefits the HA production. From the metabolic pathways in *Streptococcus zooepidemicus* involved in the conversion of glucose to HA, the activated nucleotide sugar units, UDP-glucuronic acid (UDPG) and UDP-N-acetylglucosamine (UDPNAG), are derivatives of glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate, respectively [12].

Besides the valuable composition of CAPF juice, the bagasse is rich in fibers with high water activity, which benefit the microbial growth in SSF [7]. As far as we know, the HA production in SSF has not been described in the literature yet. Table 1 shows the composition of CAPF juice and bagasse.

Table 1 - Composition of the total cashew apple pseudo-fruit: juice and bagasse

Parameters	Juice	Bagasse	References
pH	3.8-4.2	4.01	[13], [3], [14]
Acidity (g Ac. Citric/100g of the sample)	0.35	1.34	[15], [14]
Soluble Solids (°Brix)	7.4	12.0	[3], [14]
Reducing Sugars (g/L)* or (mg/100g)**	107*	6.84**	[16], [14]
Total Sugars (g/L)* or (mg/100g)**	111*	7.68**	[16], [14]
Proteins (%)	0.92	1.83	[16], [14]
C Vitamin (mg/100g)	158,26	-	[15]
Total Tannins x 10 ³ (g/L)	0,06	-	[3]
Lipids (%)	-	0.38	[14]
Fibers (%)	-	33.10	[14]
Moisture (%)	-	78.76	[14]
Water Activity, a _w	-	0.8	[7]

Considering the above mentioned aspects, the present study focuses on the production of HA from the total CAPF. The bagasse was used in SSF, moisturized with the juice, yeast extract and salts as supplements. The same compositions of juice and supplements were used in the SF under natural and forced aeration. Air was continuously supplied in SSF. The performance of the processes was compared with focus on the yields, molecular weights, productivity and the amounts of HA produced from 1kg cashew apple pseudo-fruit through SF and SSF. Finally, the viability of utilization of the total CAPF as a resource for HA production was analyzed.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Microorganism. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) as a lyophilized culture kept in ampoules.

2.2. Culture Maintenance and Inoculum Preparation. The stock culture was maintained frozen in *Brain Heart Infusion* (BHI) broth containing 10% glycerol and glass beads. The inoculum for SFs was prepared in two steps: initially five glass beads were transferred to a 50 mL Erlenmeyer flask containing 25 mL of the culture medium and incubated at 37°C for 24 hours. Later on, the medium was transferred to 500 mL Erlenmeyer flasks, containing 250 mL of the fresh culture medium, and incubated under reciprocal shaking at 150 rpm, 37°C, during 10 h. The same media were used in the two steps of the inoculum preparation

and in the fermentations. The inoculum for SSF was prepared in one step only: ten glass beads were transferred to each tube containing 10 mL of the culture medium and incubated at 37°C for 12 hours.

2.3. Culture Media

The culture media based on CAJPF were prepared using commercial cashew apple CAJU GAIA® (Itaueira Agropecuária S/A, Russas, Ceará, Brazil) at harvesting season.

2.3.1. Liquid medium. The liquid medium was prepared from the cashew apple juice *in natura*, containing around 45 g.L⁻¹ glucose and 45 g.L⁻¹ fructose concentrations and supplemented with yeast extract and salts according Swann *et al.* [17], except for the glucose (Table 2). The pH was adjusted to 7.5 with NaOH (0.1 M). The liquid medium was sterilized by microfiltration through 0.22 µm cellulose acetate membranes and used in the SF assays.

Table 2 – Composition of the synthetic medium supplementation (Swann *et al.*, 1990).

Component	Concentration (g.L ⁻¹ deionized water)
Glucose	45.0
Yeast extract	60.0
K ₂ SO ₄	1.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0
Na ₂ SO ₄ .12H ₂ O	0.2
CaCl ₂ .2H ₂ O	5.0*
FeSO ₄ .7H ₂ O	5.0*
MnSO ₄ .4H ₂ O	1.0*
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.0*
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1*
H ₃ PO ₄	1.0 mL

* mg.L⁻¹ deionized water

2.3.2. *Solid medium.* After extraction of the juice through crushing, the bagasse was comminuted using a multipurpose food processor (850W - Arno Multichief MPAI), getting solid particles with a Sauter mean diameter of 0.67 mm. The particles were dried until 30% moisture. The content of total sugars in the moist bagasse was 45 mgg^{-1} . Due to the low amounts of total sugars and nitrogen, the bagasse was supplemented with the liquid medium described in 2.3.1, until a final moisture content of 50%. The solid medium was sterilized by U.V. radiation during 1 hour.

2.4. *Fermentation.* The SFs were carried out in two types of processes: one in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 250 mL of medium, under agitation and natural aeration, and the other, under forced aeration, was conducted in a 3 L batch bioreactor (BioFlo III, New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ., USA) using an operating volume of 2.5 L. The media were inoculated with 10% v/v. The agitation rate and temperature adopted in the bioreactor were 250 rpm and 37°C , respectively. The bioreactor was sparged with a continuous air supply (2 vvm) and the culture pH was not controlled during the cultivation.

The fermentations in flasks were conducted in duplicate and the pH, cell mass, total sugars and HA (molecular weight and concentration) were determined for each flask at the initial and final times. The fermentation in the bioreactor was carried out during

24 h. The analyses were performed in triplicate.

The SSF was carried out in a system composed of six fixed bed columns (modified *Raimbault* columns) with 3 cm diameters, which were packed with bagasse (3 cm fixed bed height), and coupled to a primary humidifier. Each column was fed with air at 1 L. min^{-1} .

The air was supplied by an air compressor. The columns were maintained at 37 °C inside a controlled temperature microbial incubator. Figure 1 illustrates the set up of a column used in the SSF.

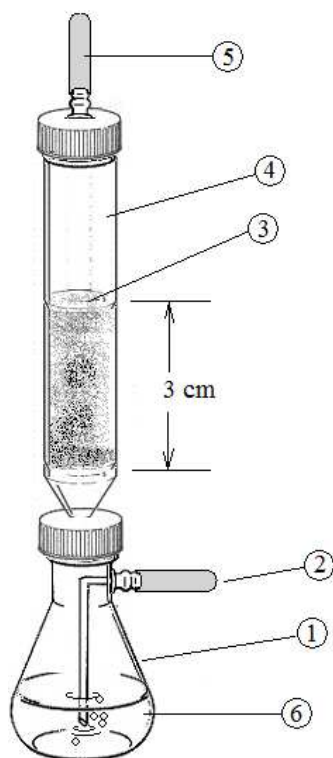


Figure 1. Scheme of the fixed bed column used in the SSF experiments: 1. Primary humidifier, 2. Inlet air tube, 3. Bagasse packed bed, 4. Glass column, 5 outlet air tube, 6. Sterile water.

2.5 Recovery of HA

The recovery of HA from FS was started by centrifugation of the fermented medium at 3200 rpm for 20 minutes. The cell free supernatant was treated with ethanol in a proportion 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down, remaining at 4°C

during 1 hour for the precipitation of HA. The precipitated HA was re-dissolved in a 0.15 mol.L⁻¹ sodium chloride solution. Three steps of precipitation and re-dissolution were performed to increase the yield of the precipitated HA.

For SSF, the products were extracted from bagasse through one stage lixiviation using 10 mL of Milli-Q water during 1h. The obtained extract was centrifuged for cell separation and the HA was precipitated according to the same protocol described for SF.

2.6. Analytical Methods

2.6.1. Cell growth. The cell growth was determined by cell dry weight according to the gravimetric method. To this end, 10 mL of the culture broth was microfiltered through 0.2 µm cellulose acetate membranes (Sartorius, Goettingen, Germany) which was dried to constant weight at 60°C.

2.6.2. HA concentration. The HA concentration was determined by the carbazol reagent [18]. Sodium hyaluronate (HylumedTM) from Genzyme Corporation (Cambridge, Massachusetts, USA) was used as a standard.

2.6.3. Total Sugar Content. Total sugar concentration was determined by HPLC reverse phase with a Hicrom C18 (250mm x 4.6mm) column and a refractive index detector (Shimadzu RID-6A). Acetonitrile-water (20:80 v/v) was used as isocratic mobile phase at a 0.5 mL.min⁻¹ of flow rate.

2.6.3. HA molecular weight. The average molecular weight of HA was determined by size exclusion chromatography. It was used a Shimadzu chromatography system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), containing a (35 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P column guard

(Phenomenex, Torrance, California, USA) mounted in series with a (300 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P6000 column of the gel filtration (Phenomenex, Torrance, California, USA) and a refraction index detector. (Shimadzu RID-6A). The analysis conditions were: injected sample of 20 μL , sodium nitrate 0.1 mol.L^{-1} as the mobile phase, flow rate of 1.0 mL.min^{-1} and 25°C temperature, as suggested by the column manufacturer. Dextrane (American Polymer Standards, Mentor, Ohio, USA) with molecular weight ranging from 10^3 to 10^6 Da was used as a standard for the calibration curve as described by Balke *et al.* [19].

2.7. Statistical analysis

The variance was analysed by ANOVA method and the media compared by Tukey test at 5% probability ($p < 0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Comparative analysis of the fermentations

Results from the SFs and SSF fermentations are presented in Table 3. Data compare the performance of the fermentations in terms of maximum specific cell growth rate, production of HA, yield of HA/total sugars (glucose + fructose), average molecular weight of the HA produced and total sugar consumption.

As expected, the forced aeration in the bioreactor increased the specific cell growth rate, μ_x , compared with the SF under natural aeration. The production of HA was also increased with forced aeration, as a consequence of the defense mechanism of the

Streptococcus cells (*Lancerfield* groups A and C). Under the oxygen tension, an external capsule of HA is produced in order to maintain the cell viability [8,20]. Under forced aeration the production of HA ($2.24 \pm 0.12 \text{ gL}^{-1}$) exceeded by two times the concentration of SF under natural aeration ($0.84 \pm 0.077 \text{ gL}^{-1}$). Statistically there was no difference between the yields $Y_{X/S}$ and $Y_{HA/S}$ in liquid medium with either forced or natural aeration (Table 3).

The performance of SSF was similar to the one of SF with natural aeration, in terms of μ_x and HA production. However, the yields $Y_{X/S}$ and $Y_{HA/S}$ were about 10 times higher to SSF than to SFs under forced or natural aeration. Besides the oxygen stress caused by forced aeration, the smaller volume of water in the liquid film on the surface and pores of the solid in SSF, produces a better dispersion and availability of oxygen stimulating the production of HA, as analyzed by Hasegawa *et al.* [21] and Huang *et al.* [22].

According to Chong and Nielsen [12], the HA production and biomass synthesis compete for the same energy sources from the culture medium, so there is a metabolic regulatory mechanism between growth and protection of these cells by the HA capsule. This competition is quantified by the $Y_{AH/X}$ yield, which remained constant in all of the studied processes, according to Tukey test at 5% probability (Table 3). The productivity of HA increased with the availability of oxygen in liquid medium. Assuming the density of the liquid medium used in SF around 1 gmL^{-1} , the highest productivity was observed in SSF, where the availability of oxygen to the microorganism is more favored.

Besides the important role of the oxygen in the productivity of HA, its availability also influenced the molecular weight (M_w) of HA. The average M_w s of HA for both SFs were around 10^4 Da, while for SSF they were of one order magnitude higher (10^5 Da).

Comparing to the average M_w of the HA produced in synthetic medium (10^7 Da) [11,23], we could see that smaller polymer chains were produced from CAPF (10^5 Da or 10^4). This is probably due to the presence of ascorbic acid in CAPF (Table 1), which induces depolymerization and breaks the chains, reducing the M_w of HA as reported by Liu *et al.* [24].

The metabolic effects of the sugars glucose and fructose, the ascorbate concentration in the medium, as well as the oxygen transfer in SSF, allows to design strategies for increasing the microbial production of HA from CAPF. Studies of these aspects are ongoing in our laboratory.

Figure 2 summarizes the production of HA from 1Kg of CAPF, in a global balance of the analyzed processes. Considering SSF and forced aeration FS, a total of 2.55 g of HA could be produced from 1kg of CAPF, being 1.79 g from the juice and 761 mg from the bagasse.

These data show the feasibility of HA production from total CAPF through both SSF and SF processes. In terms of treatment of the raw material, the comminution and drying processes represent additional treatments for SSF. However, the higher HA concentration from SSF eliminates the concentration step or the first precipitation in a diluted medium as usual.

Finally, the economical viability of HA production from CAPF could be also justified by the high aggregated value of the polymer, ranging from US\$ 2000 to 60,000 kg⁻¹, depending on its purity and MW. The HA average M_ws from either the juice or bagasse have important applications in cosmetic and pharmaceutical formulations, in free form or as matrices of micro and nano spheres or capsules. HA with M_w of 10⁴ Da is potent in the following mechanisms: cell signalization when derivatizing proteins or other compounds [25]; prolongation of the life time in the blood stream, similar to the polyethyleneglycol [26], and also increase the extent of solubilization of hydrophobic drugs in water [27]. Nano and microparticles from 10⁴ or 10⁵ Da HA produce gradual delivery of drugs, with important benefits in therapies [28].

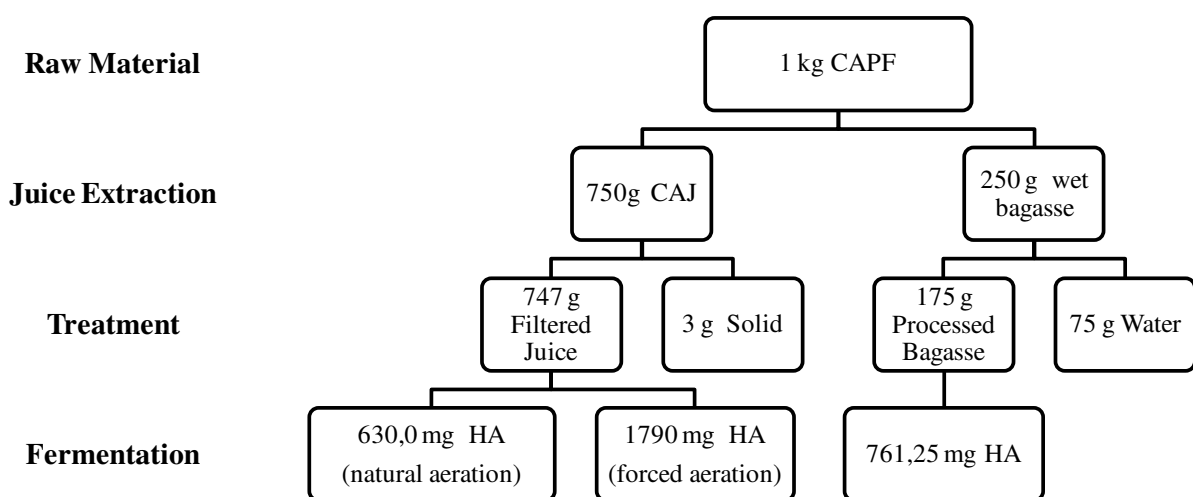


Figure 2. Overview of mass balance for the HA production starting from 1 kg of *in natura* total cashew apple pseudo fruit (CAPF), from which the cashew apple juice and the bagasse were obtained.

Table 3- . Yield parameters obtained from fermentations of cashew apple pseudo-fruit juice in submerged fermentation (SF) under natural and forced aeration, and in solid fermentation (SSF) using cashew apple pseudo-fruit bagasse. In both cases the culture media were supplemented with yeast extract and salts as proposed by **Swann *et al.*** (1990)

Media/Process	Total Sugar Consumption	Cell Growth						HA average molecular weight	Productivity
	ΔX	μ_x	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$				
	[gL ⁻¹]* or [gg ⁻¹]**	[gL ⁻¹]* or [mgg ⁻¹]**	[h ⁻¹]	[gg ⁻¹] ¹	[gg ⁻¹] ²	[gg ⁻¹] ³	[Da]	[gL ⁻¹ .h ⁻¹]* or [mgg ⁻¹ .h ⁻¹]**	
SF	41.0	1.57	0.151^a	0.041^a	0.027^a	0.675^a		0.035[*]	
(natural aeration)	(±6.2)	(±0.02)	(±0.0072)	(±0.0015)	(±0.0024)	(±0.0870)	(1.83 ±0.130) ^a x10 ⁴	(±0.003)	
SF	80.0	2.69	0.478^b	0.0347^a	0.0248^a	0.705^a		0.093[*]	
(forced aeration)	(±1.42)	(±0.24)	(±0.0253)	(±0.0020)	(±0.0017)	(±0.020)	(2.52 ±0.110) ^b x10 ⁴	(±0.005)	
SSF	0.035	9.0	0.130^c	0.261^b	0.159^b	0.581^a		0.20^{**}	
(forced aeration)	(±0.002)	(±0.70)	(±0.0046)	(±0.0070)	(±0.0081)	(±0.040)	(1.60 ±0.141) ^c x10 ⁵	(±0.002)	

¹ Biomass yield from the substrate; ² HA yield from substrate ; ³ HA yield from biomass.

4. CONCLUSIONS

The presented results show comparable performances of the cashew apple bagasse and juice in semi-solid and submerged fermentations, making the cashew apple pseudo-fruit totally useful for the HA production. The productivity of the hyaluronic acid from the juice was almost two times higher from that of the bagasse, while the magnitude order of its average molecular weight was 10^5 and 10^4 for the solid and liquid fermentations respectively. Therefore, a consortium between solid and liquid fermentations could be established for the production of hyaluronic acid in a useful range of molecular weights, for applications in cosmetic and pharmaceutical products.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge CAPES and FAPESP for the financial support, the Brazilian Microbial Collection for Environment and Industry (CBMAI) for the maintenance of the *Streptococcus* strain.

6. REFERENCES

1. Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wrenn, B.A., Espinosa, R.D. (2004) Trends Biotechnol. 22, 477-485.
2. Thomsen, M.H. (2005) Appl. Microbiol. Biotechnol. 68, 598-606.

3. Campos, D. C. P., Santos, A. S., Wolkoff, D.B., Matta, V. M., Corrêa, L. M. C., Couri, S. (2002) *Desalination* 148, 61-65.
4. Honorato, T. L., Rabelo, M. C., Pinto, G. A. S., Rodrigues, S. (2007) *Ciência e Tecnol. de Alimentos* 27, 787–792.
5. Rabelo, M. C., Fontes, C.P.M.L., Rodrigues, S. (2009) *Bioresource Technol*, 100, 5574-5580.
6. Pinto, G. A. S., Leite, S. G. F., Terzi, S. C., Couri, S. (2001) *Braz. J. Microbiology* 32, 24-26.
7. Alcântara, S. R., Almeida, F. A. C., Silva, F. L. H., Gomes, J. P. (2009) *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambiental* 13, 81-87.
8. Chong, B.F., Blank, L.M., McLaughlin, R., Nielsen, L.K. (2005) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 341-351.
9. Armstrong, D.C., Cooney, M.J., Johns. M.R. (1997) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 309–312.
10. Gao, H.J., Du, G.C., Chen, J. (2006) *World J. Microb. Biot.* 22, 399-408.
11. Pires, A M. B., Macedo, A. C., Eguchi, S. Y., Santana, M. H. A. (2010) *Bioresource Technol.* 101, 6506-6509.
12. Chong, B.F., Nielsen, L.K. (2003) *J. Biotechnol.* 100, 33-41.

13. Morton, J.F., Dowling, C.F. (1987) Fruits of warm climates, Creative Resources Systems, pp. 239–240. ISBN: 0961018410.
14. Matias, M. F. O., Oliveira, E. L., Gertrudes, E., Magalhães, M. M. A. (2005) Braz. Arch. Biol. Technol. 48, 143-150, edição especial.
15. Moura Fé, J. A., Holanda, L. F. F., Martins, C.B.(1972) Ciência Agronômica 2, 109-112.
16. Souza, P.A., Menezes, J.B., Andrade, J.C., Freitas, D.F., Mendonça, V.S. (2001) ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Belém, PA.
17. Swann, D.A., Sullivan, B.P., Jamieson, G., Richardson, K.R., Singh, T. (1990) United States Patent: 4,897,349.
18. Dische, Z. (1946) J. Biol. Chem. 167, 189-198.
19. Balke, S., Hamielec, A., Leckair, B., Pearce, S.(1969) Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Devel. 8, 54-57.
20. Cleary, P.P, Larkin, A. (1979) J. Bacteriol. 140, 1090–1097.
21. Hasegawa, S., Nagatsuru, M., Shibutani, M., Yamamoto, S., Hasebe, S. (1999) J. Biosc. Bioeng. 88, 68–71.
22. Huang, W.C., Chen, S.J., Chen, T.L.(2006) Biochem. Eng. J. 32, 239-243.
23. Pires, A. M. B., Santana, M.H.A. (2010) Appl. Biochem. Biotechnol. 162.,1-10.

24. Liu, L., Du, G., Chen, J., Zhu, Y., Wang and M., Sun, J. (2009) *Bioresource Technol.* 100, 362–367.
25. Taylor, K.R, Yamasaki, K., Radek, K.A., Di Nardo A., Goodarzi, H., Golenbock, D., Beutler, B., Gallo, R.L. (2007) *J. of Biol. Chem.* 282, 18265–18275.
26. Ferguson, E.L., Alshame, A.M., Thomas, D.W. (2010) *Int. J. Pharm.* 402, 95-102.
27. Lee, H., Lee ,K., Park, T.G. (2008) *Bioconjugate Chem.* 19, 1319–1325.
28. Leonelli F., La Bella, A., Migneco, L.M., Bettolo, R.M. (2008) *Molecules* 13, 360-378.

**HYALURONIC ACID DEPOLYMERIZATION BY ASCORBATE-REDOX
EFFECT ON SOLID STATE CULTIVATION OF STREPTOCOCCUS
ZOOEPIDEMICUS IN CASHEW APPLE FRUIT BAGASSE**

André Casimiro de Macedo and Maria Helena Andrade Santana*

Laboratory of Development of Biotechnological Processes

School of Chemical Engineering, University of Campinas-UNICAMP

13083-852, Campinas-SP, Brazil

SUMMARY – The cashew apple fruit (*Anacardium occidentale L.*) has been used as a promising agricultural resource for the production of low molecular weight (M_w) hyaluronic acid (HA) (10^4 to 10^5 Da). The cashew apple juice is a rich source of vitamin C containing 1.2 to 2.0 g.L⁻¹. This work explores the effect of the initial concentration of the ascorbate on the solid fermentation of the juice-moisturized bagasse from the cashew apple fruit. The results show that the M_w reduction of HA is proportional to the initial ascorbate concentration. The presence of ascorbate did not influence *Streptococcus zooepidemicus* metabolism. However, the HA productivity was increased from 0.18 to 0.28 mg.g⁻¹.h⁻¹ when the ascorbate concentration ranged from 1.7 to 10 mg.mL⁻¹. These findings contribute to the controlled production of HA in a low M_w range, which plays important roles in cell signalization, angiogenesis and nanoparticles production.

Key-words: hyaluronic acid, depolymerization, Ascorbate, metabolites, Streptococcus zooepidemicus.

* Corresponding author: Phone.: +55 19 3521 3921; Fax: +55 19 3521 3890

E-mail address: mariahelena.santana@gmail.com

1. INTRODUCTION

Hyaluronic acid (HA) is one of the major components of the extracellular matrix and is found in all connective tissues. It is a naturally derived high-molecular-weight (M_w) (up to the magnitude order of 10^7 Da), viscoelastic compound, and structurally an unbranched glycosaminoglycan copolymer of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine. (Weissman and Meyer, 1954)

HA is usually a high value-added product, that can range from U.S.\$ / Kg 2000 to 60,000 depending on its degree of purity and final physico-chemical characteristic, as its molecular weight (Kogan *et al.*, 2007).

The biological activities of HA differ depending on its M_w . Low M_w HA plays an important role in cell signalization, angiogenic activity. It is also quite possible that the biological functions in association with *in vivo* tissue regeneration could be modulated by using HA with different molecular weights as a building block for scaffolds. Low-MW HA also has been used for derivatization of proteins and insoluble compounds (Garg and Hales, 2004 ; Prestwich *et al.*, 1998; Prestwich, 2001). In the technological field HA had been used for the production of nanoparticles and drug delivery (Yun and Yellen, 2004; Hu and Tang, 2006).

The microbial production of HA by fermentation processes using Lancefield group A and C *streptococci* bacteria has been industrially used as an advantageous alternative to the conventional rooster combs extracting processes. As a consequence, the various aspects of

the fermentation processes have been extensively studied. (Armstrong *et al.*, 1997; Chong *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2006)

In general, the *streptococci* strains are fastidious with respect to the nutrient as well as organic nitrogen requirements (Fitzpatrick and O’Keeffe, 2001; Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000). Aiming to obtain not only low cost fermentation media, but also a better purity grade of HA, natural resources have been recently studied. In the previous work, we evaluated the main components or supplements of culture media obtained from agricultural resource derivatives (ARDs) such as hydrolysate soy protein concentrate, whey protein concentrate and cashew apple juice. Corn steep liquor was also evaluated as a supplement. They were selected with basis on the requirements of the *Streptococcus zooepidemicus* amino acids, as described by Armstrong *et al.* (1997), as well as the qualitative and quantitative variability of amino acids in the different sources supplements of culture media. Among the studied ARDs only the cashew apple juice showed to be a promising medium for the production of HA (Pires *et al.*, 2010). Other alternatives such as the use of vegetal soy peptone increased the HA production (Izawa *et al.*, 2010), as well as culture media composed of marine by-products have been recently studied (Vázquez *et al.*, 2010).

Cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) whose rich composition, including B-vitamins, particularly thiamine, riboflavin, niacin and folic acid (Sancho, 2006) benefits the production of HA, as shown by Pires *et al.* (2010) studies.

However, if the presence of complex nutrients in cashew apple juice promotes HA production, on the other hand, the presence of anti-oxidants like vitamin C, at

concentrations of about 1.2 to 2.0 g.L⁻¹ (Akinwale, 2000, Cavalcante *et al.*, 2005) may decrease the M_w of HA due to depolymerization. In fact, Pires *et al.* (2010) observed lower molecular weights (10⁴ Da) for the HA from the cashew apple juice compared to the synthetic control medium (10⁷ Da).

Soltes *et al.* (2007) and Liu *et al.* (2009), investigated the reduction of the M_w of HA due to depolymerization, by adding ascorbate to a high M_w HA solution, or hydrogen peroxide and ascorbate along its microbial production. The authors described the basic mechanism for redox depolymerization (Figure 1), involving the appearance of reactive oxygen species (ROS) that are capable of breaking the HA into smaller molecules.

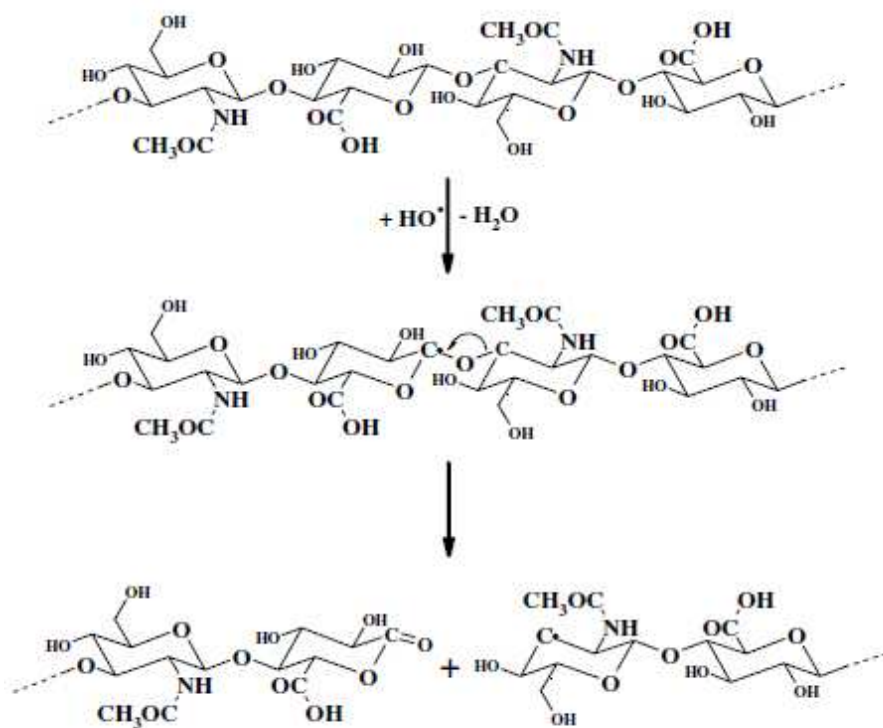


Figure 1. Scission of the HA chains may be due to β-cleavage of the C-centered radical formed at, for example, C(1) of the glucuronic acid residue.(Soltes *et al.*²⁰)

Recently, we have also evaluated the potentiality of the cashew apple bagasse for the production of HA in SSF by *Streptococcus zooepidemicus*. Results showed that each 1 kg of total cashew fruit yielded 761.25 mg by solid state fermentation (SSF) and 1790 mg by submerged fermentation (SF) after HA recovery from three consecutive precipitations with ethanol. The average HA molecular weights were 2.52×10^4 Da (SF- forced aeration in bioreactor) and 1.60×10^5 Da (SSF). These results point to the HA production from the total cashew apple fruit as promising and economically viable. In addition, HA from vegetable resources is safe and could be preferable for consumers.

Considering the above mentioned aspects, we present in this work, a study of the effect of the initial concentration of the ascorbate on the SSF of the juice moisturized bagasse from the cashew apple fruit. This study aims to contribute to the development of low cost innovative processes for the controlled production of low- M_w HA.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Microorganism. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) as a lyophilized culture kept in ampoules.

2.2. Culture Maintenance and Inoculum Preparation. The stock culture was maintained frozen in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 10% glycerol and glass beads. The inoculum was prepared in one step, ten glass beads were transferred to each tube containing 10 mL of the studied culture medium and incubated at 37°C for 12 hours.

2.3. *Culture Media*. The culture media based on cashew apple was prepared from CAJU GAIA (Itaueira Agropecuária S/A, Russas, Ceará, Brazil) at harvesting season.

2.3.1. *Liquid medium*. The liquid medium was prepared from the cashew apple juice *in natura*, containing 45 g.L⁻¹ glucose and 45 g.L⁻¹ fructose concentrations and supplemented with yeast extract and salts, according to Swann *et al.* (1990) (Table 1), except for glucose. The pH was adjusted to 7.5 with NaOH (0,1 M). The effect of the initial ascorbate concentration was studied by adding the ascorbate to the liquid medium in order to get final concentrations 3, 4, 5 and 10 g.L⁻¹. The natural juice, containing 1.7 g.L⁻¹ was considered as a control.

Table 1 – Composition of the synthetic medium supplementation (Swann *et al.*,1990).

Component	Concentration (g.L ⁻¹ deionized water)
Glucose	45.0
Yeast extract	60.0
K ₂ SO ₄	1.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0
Na ₂ SO ₄ .12H ₂ O	0.2
CaCl ₂ .2H ₂ O	5.0*
FeSO ₄ .7H ₂ O	5.0*
MnSO ₄ .4H ₂ O	1.0*
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.0*
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1*
H ₃ PO ₄	1.0 mL

* mg.L⁻¹ deionized water

2.3.2. *Solid medium*. After extracting the juice through crushing, the bagasse was comminuted using a multipurpose food processor (850W - Arno Multichef MPAI). The solid particles were dried until 30% moisture. The total content of total sugars in the bagasse was 0.025 g.g⁻¹ of moist bagasse. Due to the low amounts of total sugars and

nitrogen the bagasse was supplemented with the cashew apple juice, yeast extract and salts previously prepared (liquid medium), until a final moisture content of 50%.

2.4. Fermentation. SSF was carried out in a system composed of six fixed bed (modified *Rainbault* columns) columns (3 cm in diameter), which were packed with bagasse (3 cm fixed bed height), each one coupled to a primary humidifier. Each column was fed with air at 1 L.min⁻¹. Air was supplied by an odontologic compressor. The columns were incubated at 37°C controlled temperature. Initial Ascorbate concentration in liquid phase was 1.7 (*in natura* cashew apple juice), 3,4,5 and 10 g.mL⁻¹.

2.5. Recovery of HA. The products were extracted from bagasse through one stage lixiviation using 10 mL of Milli-Q water during 1h. The obtained extract was centrifuged at 3200 rpm for 30 minutes for cell separation and the HA was precipitated from cell free supernatant with ethanol in a proportion 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down, remaining at 4°C during 1 hour for the precipitation of HA. The HA precipitated was redissolved in a 0,15 mol.L⁻¹ sodium chloride solution. Three steps of precipitation and redissolution were performed to increase the yield of precipitated HA.

2.6. Analytical Methods

2.6.1. Cell growth. The cell growth was determined by cell dry weight according to the gravimetric method. To this end, 10 mL of the culture broth was microfiltered through 0.2 µm cellulose acetate membranes (Sartorius, Goettingen, Germany) which was dried to constant weight at 60°C.

2.6.2. Concentrations of glucose, lactate, acetate, formate and ethanol. Culture samples were filtered through membranes with a pore size of 0.2 µm (Sartorius, Goettingen,

Germany) and 20 μL of filtered sample were injected into an ion exchange HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a 7.8 mm x 300 mm HPX-87H fast acid column Aminex (Bio-Rad, Hercules, CA., USA). The mobile phase was composed of 0.004 mol.L⁻¹ H₂SO₄ pumped at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹ as described by Chong and Nielsen (2003). The column was maintained at 65°C. The peak elution profile was monitored with a Shimadzu RID-6A refractive index detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.6.3. HA concentration. The HA concentration was determined by the carbazol reagent (Dische, 1946). Sodium hyaluronate (HylumedTM) from Genzyme Corporation (Cambridge, Massachusetts, USA) was used as a standard.

2.6.4. HA molecular weight.

The average molecular weight of HA was determined by size exclusion chromatography. It was used a Shimadzu chromatography system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), containing a (35 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P guard column (Phenomenex, Torrance, California, USA) mounted in series with a (300 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P6000 column of the gel filtration (Phenomenex, Torrance, California, USA) and a refractive index detector. (Shimadzu RID-6A). The analysis conditions were: injected sample of 20 μL , sodium nitrate 0.1 mol.L⁻¹ as the mobile phase, flow rate of 1.0 mL.min⁻¹ and 25°C temperature, as suggested by the column manufacturer. Dextran standards (American Polymer Standards, Mentor, Ohio, USA) with molecular weight ranging from 10³ to 10⁶ Da were used as a standard for the calibration curve as described by Balke *et al.* (1969).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 2 shows the kinetics for HA production, cell growth and sugars consumption at three different ascorbate concentrations. With the addition of ascorbate, final HA concentration increased, while the synthesis of all other metabolites remained statistically (5%) constant. This observation indicates that HA production is the only response to the ascorbate addition.

The performance of the fermentations in the presence of ascorbate is presented in Table 2. Despite the significant increase in $Y_{AH/S}$ and HA productivity, no metabolic changes with respect to lactic acid or acetic acid can be attributed to the increase of ascorbate in the fermentation medium. The evidence that no significant change in the metabolism may have occurred in the process leads to the assertion that ascorbate exerts great influence on the HA depolymerization only, as shown in Figure 3.

Figure 4 A shows the two prevalent M_w populations of about 10^3 (1 kDa) and 10^4 (10 kDa). Figure 4B shows the decreasing behavior of the average M_w 10^4 (10 kDa) while the lowest average molecular weight increases with the addition of ascorbate.

This proposition is also noticed in the M_w global characterization, considering all the HA molecular weight fractions produced in the fermentation (Figure 4C), where we observe the displacement of average M_w 100 kDa for the smaller M_w fractions with the addition of ascorbate. A similar behavior is clearly observed in Figure 4D, for the decreasing of the average M_w .

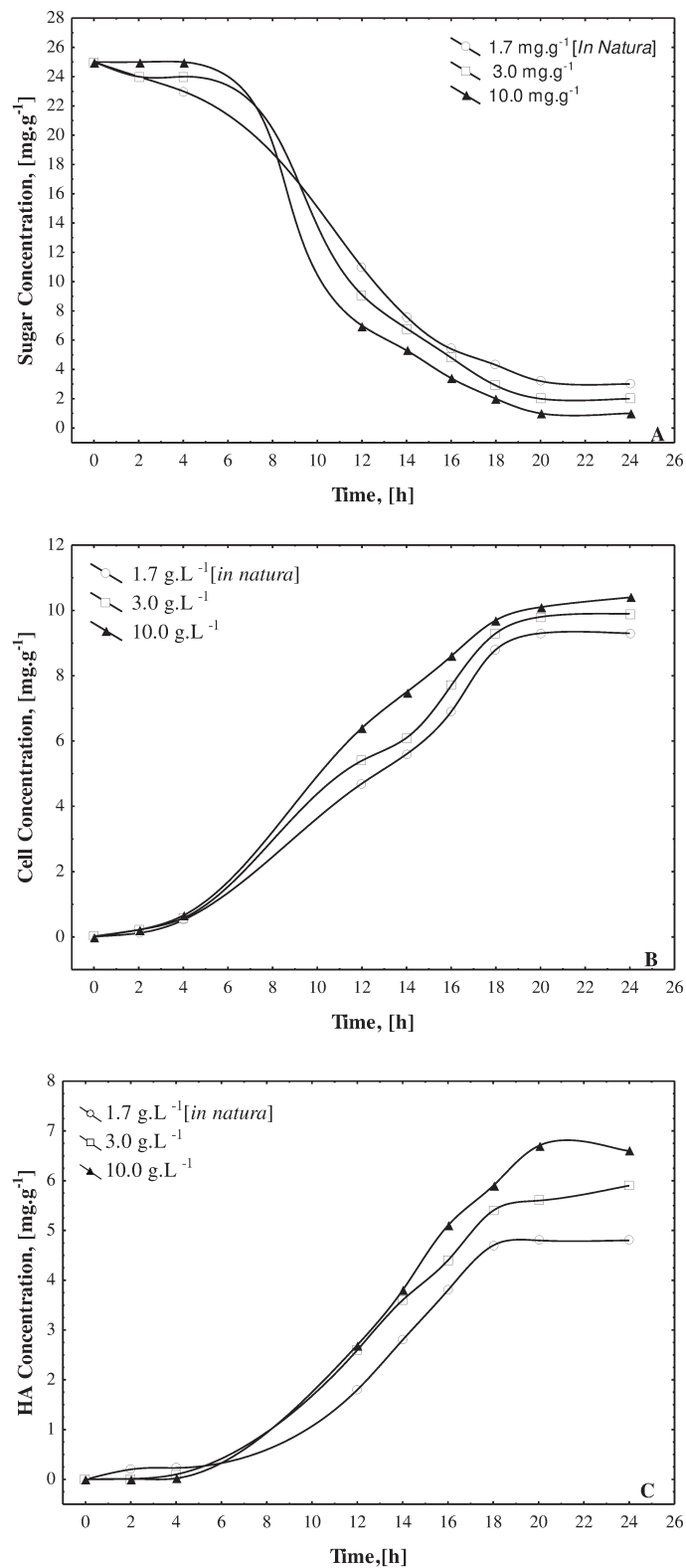


Figure 2. Kinetic profiles of (A) sugars consumption, (B) cells growth and (C) HA production for SSF with forced aeration (1 L. min^{-1}) using a culture medium composed of cashew apple bagasse moisturezed with the juice supplemented with yeast extract, salts and ascorbate at the concentrations 1.7 ($\circ$) 3 ($\square$) and 10 mg.L^{-1} ($\blacktriangle$).

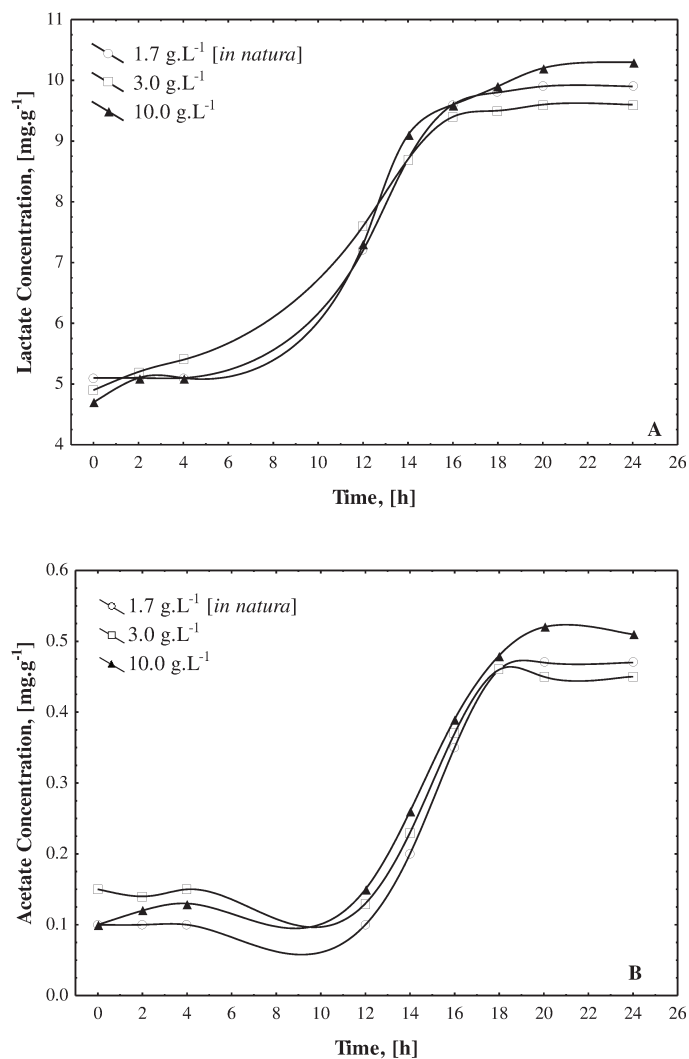


Figure 3. Profile of lactate (A) and acetate (B) biosynthesis for SSF with forced aeration (1 L. min^{-1}) using a culture medium composed of cashew apple bagasse moistured with the juice supplemented with yeast extract, salts and ascorbate at the concentrations 1.7 (○) 3 (□) and 10 mg.L^{-1} (▲).

Table 2- Yield parameters obtained from fermentation of cashew apple fruit and bagasse (SSF) with different ascorbate concentrations in liquid phase.

Ascorbate Concentration (Liquid Phase)	Total Sugar Consumption	Cell Growth							Productivity
			μ_x	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	$Y_{LAC/S}$	$Y_{ACE/S}$	
[mg/mL]	[mg.g ⁻¹]	[mg.g ⁻¹]	[h ⁻¹]	[g.g ⁻¹]	[g.g ⁻¹]	[g.g ⁻¹]	[g.g ⁻¹]	[g.g ⁻¹]	[mg.g ⁻¹ .h ⁻¹]
1.7	22.30 ^a	9.05 ^a	0.940 ^a	0.346 ^a	0.151 ^a	0.440 ^a	0.164 ^a	0.035 ^a	0.178 ^a
	(±1.52)	(±0.084)	(±0.060)	(±0.028)	(±0.023)	(±0.093)	(±0.031)	(±0.001)	(±0.010)
3	23.00 ^a	9.26 ^a	0.892 ^a	0.373 ^a	0.202 ^b	0.538 ^b	0.184 ^a	0.039 ^a	0.236 ^b
	(±1.00)	(±0.333)	(±0.018)	(±0.029)	(±0.001)	(±0.038)	(±0.026)	(±0.006)	(±0.001)
10	23.30 ^a	9.16 ^a	0.995 ^a	0.367 ^a	0.270 ^c	0.743 ^c	0.173 ^a	0.040 ^a	0.282 ^c
	(±1.15)	(±0,866)	(±0.144)	(±0.033)	(±0.010)	(±0.098)	(±0.046)	(±0.006)	(±0.007)

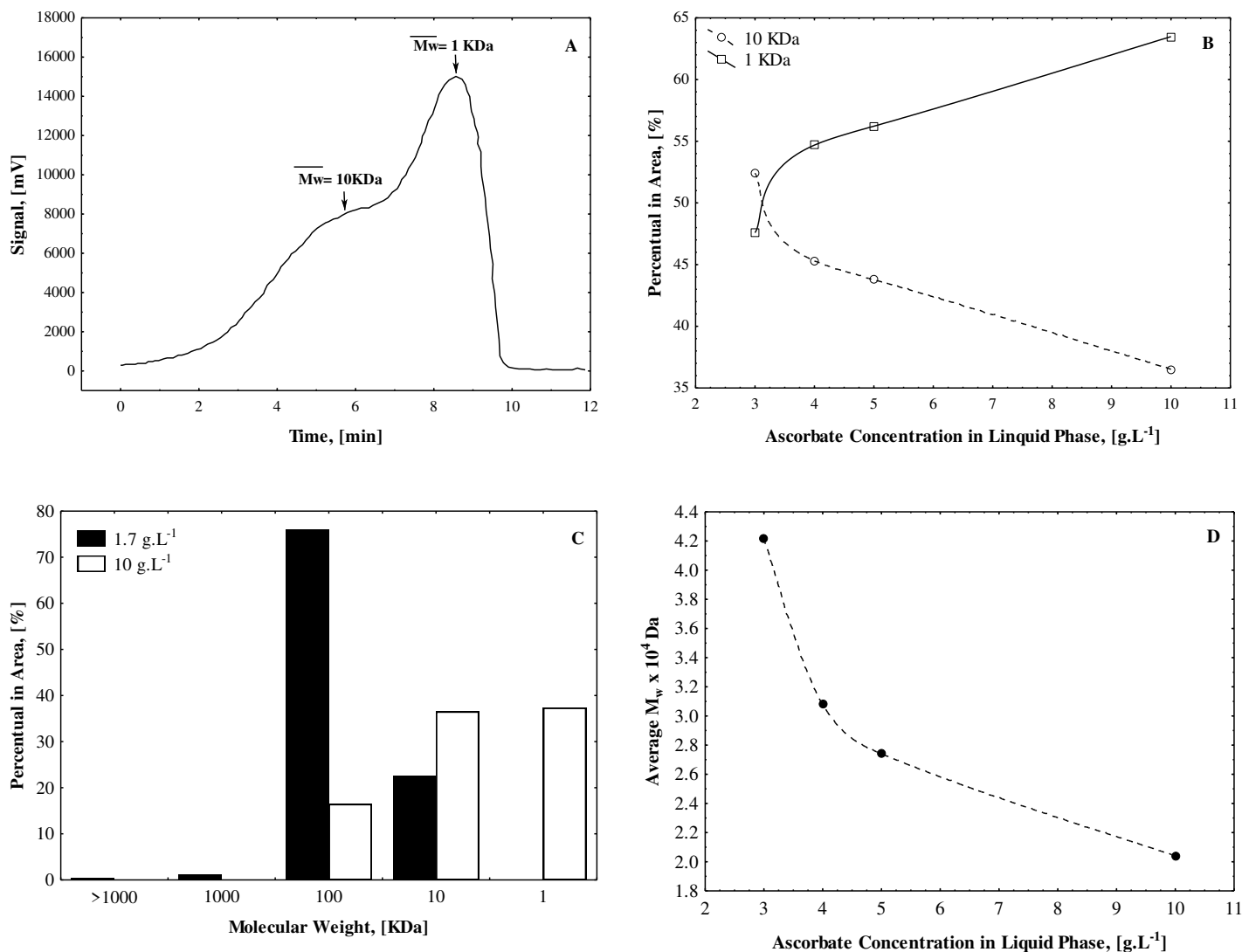


Figure 4. Average and distribution of the hyaluronic acid molecular weight. (A) Representative chromatogram for the molecular weight analysis of the HA produced by SSF in the presence of ascorbate. The two main populations (B) Behavior of the two populations with the increasing concentration of ascorbate 10 KDa (○) and 1KDa (□).(C) M_w distribution for the HA produced in the solid state fermentation. (D) Average M_w behavior with increasing concentration of ascorbate. M_w of 1.7 g.L⁻¹ (*in natura*) was 2.5×10^5 Da.

Liu *et al.* (2009), considered the reduction in M_w by redox processes (Figure 1) causes a balance between microbial growth phenomena inhibition, promoted by the toxic effect of OH radicals, and the increase of oxygen transfer seems not to have exercised influence on the bacteria metabolism. Additionally, the authors also mentioned that changes in the liquid, by reducing the M_w , improve K_{La} and therefore the level of dissolved oxygen. Studies of Hasegawa *et al.* (1999) and Huang *et al.* (2006) showed the increased production of HA as a result of higher rates of aeration in the fermentations.

These findings leads to the assertion that ascorbate exerts great influence on the HA depolymerization only, as shown in Figure 3. In consequence of that, the M_w of HA is reduced, decreasing the viscosity, exposing the cells to a higher level of reactive oxygen species (ROS). The higher levels of stress induce the cells to produce more HA in order to protect themselves.

4. CONCLUSIONS

The presence of ascorbate in cashew apple juice promotes redox mechanisms for the degradation of HA produced by cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in SSF. The ascorbate did not influence the metabolism of the *Streptococcus zooepidemicus*, but it influenced the decrease of the average M_w of HA due to depolymerization. The production of low molecular weight HA could be modulated and controlled by the initial concentration of ascorbate in the medium.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge CAPES and FAPESP for the financial support, the Brazilian Microbial Collection for Environment and Industry (CBMAI) for the maintenance of the *Streptococcus* strain and the Brazilian Industries for the agricultural sources samples, which were used for the preparations of the culture media.

6. REFERENCES

Akinwale TO (2000) Cashew apple juice: Its use in fortifying the nutritional quality of some tropical fruits, Eur Food Res Technology 211:205–207. DOI : 10.1007/s002170050024

Armstrong DC, Cooney, MJ, Johns, MR (1997) Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. Appl Microbiol Biotechnol, 47: 309–312. DOI: 10.1007/s002530050932

Balke S, Hamielec A, Leclair B, Pearce S (1969) Gel permeation chromatography. calibration curve from polydisperse standards. Ind Eng Chem Prod Res Dev 8: 54-57. DOI: 10.1021/i360029a008

Cavalcante AAM, Rübensam G, Erdtmann B, Brendel M, Henriques JAP (2005) Cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice lowers mutagenicity of aflatoxin B1 in S.

typhimurium TA 102. Genet Mol Biol, 28: 328–333. DOI: 10.1590/S1415-47572005000200025

Chong BF, Nielsen LK, (2003) Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. J Biotechnol 100: 33-41. DOI: 10.1016/S0168-1656(02)00239-0

Chong BF, Blank LM, McLaughlin R, Nielsen LK (2005) Microbial hyaluronic acid production. Appl Microbiol Biotechnol 66: 341-351. DOI: 10.1007/s00253-004-1774-4

Dische Z (1946) A new specific color reaction of hexuronic acids. J Biol Chem 167: 189-198.

Fitzpatrick JJ, O`Keeffe U (2001) Influence of whey protein hydrolyzate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. Process Biochem, 37: 183-186. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00203-5

Gao HJ, Du GC, Chen J (2006) Analysis of metabolic fluxes for hyaluronic acid (AH) production by *Streptococcus zooepidemicus*. World J Microbiol Biotechnol, 22:399-408. DOI: 10.1007/s11274-005-9047-7

Garg HG, Hales C A (2004) Chemistry and biology of hyaluronan. Elsevier, Oxford.

Hasegawa S, Nagatsuru M, Shibutani M, Yamamoto S, Hasebe S (1999) Productivity of concentrated hyaluronic acid using maxblend fermentor. J Biosc Bioeng, 88: 68–71.

DOI:10.1016/S1389-1723(99)80178-9

Hofvendahl K, Hahn-Hagerdal B (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme Microb Technol 26: 87– 107.

DOI:10.1016/S0141-0229(99)00155-6

Hu Z, Xia X, Tang L (2006) Process for synthesizing oil and surfactant-free hyaluronic acid nanoparticles and microparticles. US Patent 20060040892 A1.

Huang WC, Chen SJ, Chen TL (2006) The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic fermentation. Biochem Eng J 32: 239-243.

DOI:10.1016/j.bej.2006.10.011

Izawa N, Hanamizu T, Sone T, Chiba K (2010) Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by Streptococcus thermophilus strain YIT 2084 in milk. J Biosci Bioeng., 109: 356-360. DOI :10.1016/j.jbiosc.2009.10.011

Kogan G, Soltes L, Stern R, Gemeiner P (2007) Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnol Lett. 29: 17-25. DOI: 10.1007/s10529-006-9219-z

Liu L, Du G, Chen J, Zhu Y, Wang M, Sun J (2009) Microbial production of low molecular weight hyaluronic acid by adding hydrogen peroxide and ascorbate in batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioresource Technol* 100: 362–367. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.040

Pires AMB, Macedo A C, Eguchi S Y, Santana, M H A (2010) Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource Technol* 101: 6506-6509. DOI:10.1016/j.biortech.2010.03.074

Prestwich, G.D., 2001. Biomaterials from chemically-modified hyaluronan. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18E.html>. accessed in march 2010.

Prestwich GD, Marecak DM, Mareck, JF, Vercruysee KP, Ziebell R (1998) Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *J Controlled Release* 53: 93-103. DOI:10.1016/S0168-3659(97)00242-3

Sancho SO, Maia GA, Figueiredo RW, Rodrigues S, Sousa PHM (2007) Alterações químicas e físico-químicas no processamento de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciência e Tecnol de Alimentos* 27: 878-882. DOI: 10.1590/S0101-20612007000400031

Soltes L, Valachova K, Mendichi R, Kogan G, Arnhold J, Gemeiner P (2007) Solution properties of high-molar-mass hyaluronans: the biopolymer degradation by ascorbate. *Carbohydr. Res.*, 342:1071-1077. doi:10.1016/j.carres.2007.02.018

Swann DA, Sullivan BP, Jamieson G, Richardson KR, Singh T (1990). Biosynthesis of hyaluronic acid. United States Patent: 4,897,349.

Vazquez JA, Montemayor MI, Fraguas J, Murado MA (2010) Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. *Microb Cell Fact* 9: 46. DOI:10.1186/1475-2859-9-46

Weissman B, Meyer K (1954) The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *J Am Chem Soc* 76: 1753-1757. DOI: 10.1021/ja01636a010

Yun YH, Goetz, DJ, Yellen P, Chen W (2004) Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. *Biomaterials* 25: 147-157. doi:10.1016/S0142-9612(03)00467-8

METABOLIC EFFECTS OF INITIAL SUGARS CONCENTRATION ON THE MICROBIAL PRODUCTION OF HYALURONIC ACID BY SOLID STATE FERMENTATION IN CASHEW APPLE BAGASSE

André C. de Macedo, Aline M. B. Pires, Silvia Y. Eguchi and Maria H. A. Santana *

Laboratory of Development of Biotechnological Processes

School of Chemical Engineering, University of Campinas-UNICAMP

13083-852, Campinas-SP, Brazil

SUMMARY –The juice and bagasse of the cashew apple (*Anacardium occidentale L*) have been demonstrated as low cost and promising substrates for the production of the hyaluronic acid (HA) by *Streptococcus zooepidemicus*. The cashew substrates contain equal amounts (45 g.L⁻¹ liquid phase) of glucose and fructose as main sugars, which are precursors of the two parallel pathways driving the biosynthesis of HA. This work describes the metabolic effects of initial concentration of the sugars (ISC) on the production of cells, HA and its molecular weight (M_w), lactic and acetic acid metabolites. Solid state fermentation was performed in cashew bagasse comminuted up to a Sauter mean diameter of 0.67 mm, partially dried and moisturized by adding a defined mixture of cashew apple juice, yeast extract and salts. The studied ISCs in the juice were 10, 30, 50 and 90 g.L⁻¹ from which 5, 15, 25 and 45 g ISC. g⁻¹ moist bagasse were obtained. Experiments were carried out under controlled air supply in a set of fixed bed reactors mounted inside a microbial incubator. Results showed constant yields related to substrate for 30, 50 and 90 g.L⁻¹, which were independent of the ISC. No catabolic inhibition of either HA production or cell growth was observed at 90 g.L⁻¹ in the juice (45 g ISC. g⁻¹ moist bagasse). A maximum Y_{HA/(LACTIC ACID)} and a minimum Y_{CELLS/(ACETIC ACID)} yields were observed at 50 g.L⁻¹ISC in the juice (25 g ISC. g⁻¹ moist bagasse). This is an optimum energetic condition which favors the balanced synthesis of the precursors of HA as well as the higher M_w (10⁵ e 10⁶ Da) fractions of HA.

Key-words: hyaluronic acid, sugar concentration, metabolites, Streptococcus zooepidemicus.

* Corresponding author:Phone.: +55 19 3521 3921; Fax: +55 19 3521 3890

E-mail address: mariahelena.santana@gmail.com

1. INTRODUCTION

Hyaluronic acid (HA) is a linear polysaccharide composed of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine disaccharide units, linked alternately by β -1-3 and β -1-4 glycosidic bonds.

The physical properties and functions of HA are based on its ability to retain large amounts of moisture as well as to form viscoelastic aqueous solutions. Having unique hydrodynamic properties, HA has been widely applied in the cosmetic and medical fields (1, 2, 3, 4). Final products containing HA become high value-added products ranging from US\$ 2,000 to 60,000.kg⁻¹ regarding the above mentioned applications.

HA is found in the intercellular matrix of mammalian connective tissues, and it was previously extracted from bovine vitreous humor, rooster combs and umbilical cords. It is also a significant component of the extracellular matrix of strains such as *Streptococcus zooepidemicus*, which is used to produce, on a large scale, HA with an average molecular weight (M_w) around 10⁶ Da (5, 6).

The high costs involved in the extraction and purification processes of high molecular weight HA from animal sources, added to the risk of contamination with animal allergens or pathogens, have made the bacterial source preferable for medical and cosmetic applications (7).

Common to all oligosaccharide and polysaccharide microbial synthesis, the HA production is a carbon-intensive and energy-intensive process (8). Precursors of the HA synthesis (UDP-glucuronic acid and UDP-N-acetylglucosamine) are also precursors of the

cell wall biosynthesis, specifically peptidoglycan, teichoic acids and antigenic wall polysaccharides as shown in Figure 1.

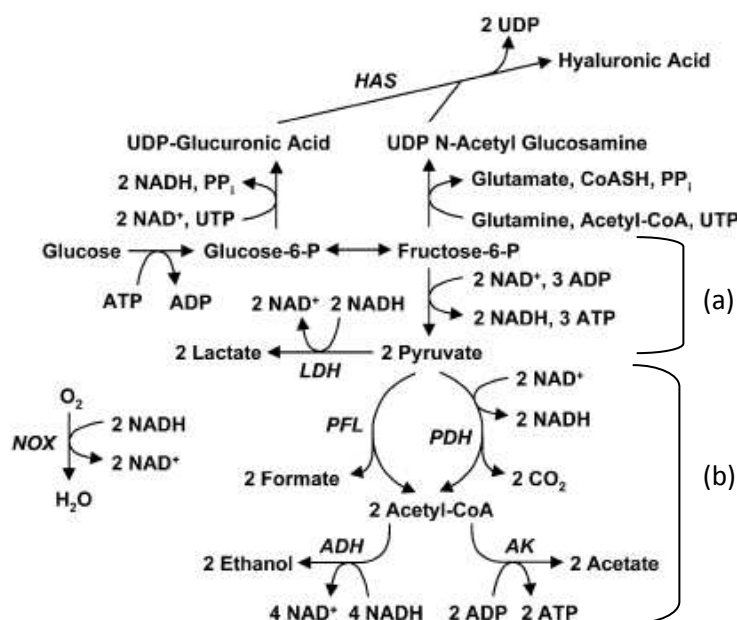


Figure 1. Central metabolic pathways in *Streptococcus zooepidemicus* involved in the conversion of glucose to hyaluronic acid and fermentation products through the (a) homolactic and (b) mixed acid metabolisms. HAS, hyaluronate synthase; NOX, NADH oxidase; LDH, lactate dehydrogenase; PFL, pyruvate formate lyase; PDH, pyruvate dehydrogenase; ADH, alcohol dehydrogenase; AK, acetate kinase (Adapted from Chong and Nielsen, 2003).

Therefore, HA synthesis competes with cell growth for carbon source and energy (9,10). Being so, HA production can be enhanced if the competition between cell growth and HA synthesis is decreased (11).

However, the above mechanism was supported by the findings which considered only glucose as the main carbon source in synthetic medium. Although the strains of *Streptococcus zooepidemicus* metabolize various sugars, most of the studies use glucose as only the substrate in submerged fermentation.

The cashew substrates, juice and bagasse, contain glucose and fructose isomers as main sugars. The total concentration of these sugars in the juice *in nature* is 95 g.L⁻¹, being equal amounts (45 g.L⁻¹) of each one isomer. According to the metabolic route involved in the conversion of glucose to HA, glucose-6-P and fructose 6-P generate the UDPG and UDPNAG precursors of HA synthesis in two parallel pathways. Therefore, the sugar composition in the cashew substrates may have an important role on the HA synthesis.

Moreover, the cashew apple is abundant in Brazil, but considered an agricultural residue, since about 90% of its production is lost in the field after removing the nut. Our previous studies with shake flasks, demonstrated a higher capability of HA production from the cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 39920) in the cashew juice compared to other agricultural residues. The production and yield ($Y_{HA/SUGAR}$) of HA were similar to the one of the synthetic medium containing glucose only both supplemented with yeast extract and salts (12).

In order to gain more insight about the production of HA from cashew substrates, herein we extended our previous studies, investigating the effects caused by the initial concentration of total sugars (ISC) on the *Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 39920) metabolism, and on the molecular weight (M_w) of HA. We worked with SSF, using cashew

apple bagasse, which was previously comminuted at a controlled Sauter mean diameter, partially dried and moisturized with the cashew juice in nature and diluted to obtain smaller ISCs. As far as we know, there are no studies in the literature which examine the metabolic effects of ISC on the microbial growth in cashew apple bagasse. and production of HA by SSF .

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Microorganism. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) as a lyophilized culture kept in ampoules.

2.2. Culture Maintenance and Inoculum Preparation. The stock culture was maintained frozen in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 10% glycerol and glass beads. The inoculum was prepared in one step, Ten glass beads were transferred to each tube containing 10 mL of the studied culture medium and incubated at 37°C for 12 hours.

2.3. Culture Media. The culture medium based on the cashew apple was prepared using commercial cashew apple CAJU GAIA® (Itaueira Agropecuária S/A, Russas, Ceará, Brazil) at harvesting season. Table 1 shows the composition of the cashew apple juice and bagasse.

Table 1 - Composition of the total cashew apple pseudo-fruit: juice and bagasse

Parameters	Juice ^a	Bagasse ^b	References
			Morton and Dowling (1987) ^a , Campos <i>et al.</i> (2002) ^a
pH	3.8-4.2	4.01	Matias <i>et al.</i> (2005) ^b
Acidity			Moura Fé <i>et al.</i> (1972) ^a
(g Ac. Citric/100g of the sample)	0.35	1.34	Matias <i>et al.</i> (2005) ^b
			Campos <i>et al.</i> (2002) ^a
Soluble Solids (°Brix)	7.4	12.0	Matias <i>et al.</i> (2005) ^b
Reducing Sugars (g/L)* or (mg/100g)**			Souza <i>et al.</i> (2002) ^a
	107*	6.84**	Matias <i>et al.</i> (2005) ^b
Total Sugars (g/L)* or (mg/100g)**			Matias <i>et al.</i> (2005) ^b
	111*	7.68**	
Proteins (%)	0.92	1.83	Matias <i>et al.</i> (2005) ^b
C Vitamin (mg/100g)	158,26	-	Moura Fé <i>et al.</i> (1972) ^a
Total Tannins x 10 ³ (g/L)	0,06	-	Campos <i>et al.</i> (2002) ^a
Lipids (%)	-	0.38	Matias <i>et al.</i> (2005) ^b
Fibers (%)	-	33.10	Matias <i>et al.</i> (2005) ^b
Moisture (%)	-	78.76	Matias <i>et al.</i> (2005) ^b
Water Activity, a _w	-	0.8	Alcântara <i>et al.</i> (2009) ^a

2.3.1. Liquid medium.

The liquid medium was prepared with cashew apple juice *in natura* (90 gL⁻¹ sugars) or diluted as to obtain different ISCs. The juice was supplemented with yeast extract and salts, according to the composition of the synthetic medium proposed by Swann (13), except for

glucose (Table 2). pH was adjusted to 7.5 with NaOH (0.1 M). The liquid medium was sterilized by microfiltration through 0.22 μm cellulose acetate membranes. Preliminary experiments were performed SSF using the ISCs 10, 30, 50 and 90 g.L^{-1} (in liquid phase) in order to determine the ISCs for the subsequent kinetic studies. From these experiments, the yields were determined at the initial and final state only. Kinetic studies were done at non-limiting ISCs, 30, 50 and 90 g.L^{-1} sugars in liquid phase.

Table 2 – Composition of the synthetic medium (13).

Component	Concentration (g.L^{-1} deionized water)
Glucose	45.0
Yeast extract	60.0
K_2SO_4	1.3
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	1.0
$\text{Na}_2\text{SO}_4.12\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$	5.0*
$\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	5.0*
$\text{MnSO}_4.4\text{H}_2\text{O}$	1.0*
$\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	1.0*
$\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$	0.1*
H_3PO_4	1.0 mL

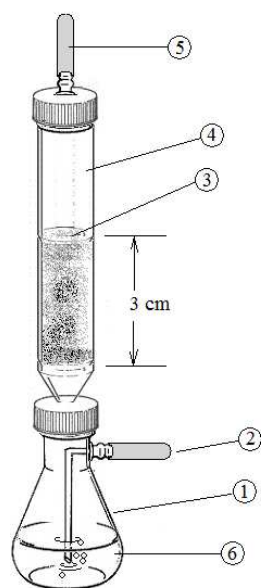
* mg.L^{-1} deionized water

2.3.2. Solid medium.

After extraction of the juice through crushing, the bagasse was previously washed and then comminuted using a multipurpose food processor obtaining solid particles with a Sauter

mean diameter of 0.67 mm. The particles were dried until 30% moisture. Due to the low amounts of total sugars and nitrogen remaining in the bagasse after processing, it was supplemented with a liquid medium described in 2.3.1, until a final moisture content of 50%. The total ISCs in the moist bagasse were 5, 15, 25 and 45 mg.g⁻¹. The solid medium was sterilized by U.V. radiation during 1 hour.

2.4. Fermentation. SSF was carried out in a system composed of six fixed bed columns with 3 cm diameters, which were packed with the moist bagasse (3 cm fixed bed height), and coupled to a primary humidifier. Each column was fed with air at 1 mLmin⁻¹ flow rate. The air was supplied by a filtered odontological air compressor. The analysis of outlet oxygen concentration was performed using an oximeter YSI ® Model 5300 coupled and properly calibrated. The columns were maintained at 37 °C inside a temperature-controlled microbial incubator. Figure 2 a,b illustrates the set up of the columns used in SSF. For the kinetic studies, the columns were withdrawn from the system along time, from which cell mass, HA, glucose, lactic acid, acetic acid, formic acid and ethanol concentrations were analyzed. The M_w of the HA produced and its distribution were also determined. The analyses were performed in triplicate.



(A)



(B)

Figure 2. (A) Scheme of the fixed bed column used in SSF experiments: 1. Primary humidifier, 2. Inlet air tube, 3. Comminuted bagasse packed bed, 4. Glass column, 5 outlet air tube, 6. Sterile water. (B) Picture of the columns inside the microbial incubator.

2.5. Recovery of HA.

The products were extracted from bagasse through one stage lixiviation using 10 mL of Milli-Q water during 1h. The obtained extract was centrifuged for cell separation and the HA was precipitated with ethanol in a proportion 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down, remaining at 4°C during 1 hour for the precipitation of HA. The HA precipitated was redissolved in a 0,15 mol.L⁻¹ sodium chloride solution. Three steps of precipitation and redissolution were performed to increase the yield and purity of the HA precipitated.

2.6. Analytical Methods

2.6.1. Cell growth. The cell growth was determined by cell dry weight according to the gravimetric method. To this end, 10 mL of the culture broth were microfiltered through 0.2 μm cellulose acetate membranes (Sartorius, Goettingen, Germany) which were dried to constant weight at 60°C.

2.6.2. Concentrations of glucose, lactate, acetate, formate and ethanol. Culture samples were filtered through membranes with a pore size of 0.2 μm (Sartorius, Goettingen, Germany) and 20 μL of filtered sample were injected into an ion exchange HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a 7.8 mm x 300 mm HPX-87H fast acid column Aminex (Bio-Rad, Hercules, CA., USA). The mobile phase was composed of 0.004 mol.L⁻¹ H₂SO₄ pumped at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹ (9). The column was maintained at 65°C. The peak elution profile was monitored with a Shimadzu RID-6A refractive index detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.6.3. HA concentration. The HA concentration was determined by the carbazol reagent (14). Sodium hyaluronate (HylumedTM) from Genzyme Corporation (Cambridge, Massachusetts, USA) was used as a standard.

2.6.4. HA molecular weight. The molecular weight distribution of HA was determined by size exclusion chromatography. It was used a Shimadzu chromatography system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), containing a (35 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P column guard (Phenomenex, Torrance, California, USA) mounted in series with a (300 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P6000 column of the gel filtration (Phenomenex, Torrance, California, USA) and a refraction index detector (Shimadzu RID-6A). The analysis conditions were: injected

sample of 20 μL , sodium nitrate 0.1 mol.L^{-1} as the mobile phase, flow rate of 1.0 mL.min^{-1} and 25°C temperature, as suggested by the column manufacturer. Dextran (American Polymer Standards, Mentor, Ohio, USA) with molecular weight ranging from 10^3 to 10^6 Da was used as a standard for the calibration curve (15).

2.6.5. Statistical Analysis

The variance was analyzed by ANOVA method and the media compared by the Tukey test at 5% probability level ($p < 0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 3F shows results obtained from the fermentations, with ISC ranging from 5 to 45 mg.g^{-1} (10 to 90 g.L^{-1}). We can see the yield of HA production related to cells ($Y_{\text{HA/X}}$) was somehow constant in the range of 30 to 90 g.L^{-1} ISC. Therefore, the last three assayed ISCs were selected for the kinetic experiments (Figure 3 A,B,C,D and E).

Figures 3 A,B,C,D and E shows the kinetic profiles of the cell production, HA, lactic and acetic acids, as well as the total consumption of sugars, obtained from the studied ISCs. The exponential phase remained between 8 and 16 h for the studied ISCs. Along the exponential phase, cell mass was similar at 30 and 90 g.L^{-1} (15 and 45 mg.g^{-1}), but significantly superior at 50 g.L^{-1} ISC (25 mg.g^{-1}). At the stationary phase, after 18h, cell concentration was similar at 50 and 90 g.L^{-1} (25 and 45 mg.g^{-1}), but inferior to the cell concentration at 30 g.L^{-1} (15 mg.g^{-1}) ISC (Figure 3C), and the production of HA was similar for the studied ISCs (Figure 3B). Analyzing these profiles, we could observe no

strong catabolic inhibition of cell growth at 90 gL⁻¹ISC, as reported by Pires *et al.* (12) in SF with glucose only as sugar in a synthetic medium containing yeast extract and salts.

Effects of the ISCs on the organic acids as a consequence of the metabolism are presented in Figure 3D and E. A homofermentative metabolism could be observed, which is the most ordinary route for the glucose catabolism in non-limiting conditions (12,16). Lactic acid, the main product of this kind of metabolism, increased with ISC ranging from 7 to 11 mg.g⁻¹. However, the reduction of acetic acid was parallel for 30 and 50 g.L⁻¹ ISC only. At 90 gL⁻¹ ISC, acetic acid concentration was the highest, but no inhibition of the lactic acid production was observed, showing no significant difference when compared to 50 gL⁻¹ ISC. The concentration of ethanol was insignificant. No formic acid was observed in the range of the ISCs, due to the exposition of cells to air, as reported by Abbe *et al.* (17). The consumption of sugars decreased from 30 (88%) to 50 g.L⁻¹ (80%) and 90 g.L⁻¹ (67%) ISC.

Table 3 summarizes the ISC effects on the specific growth rate (μ_X), yield coefficients related to the total sugars (glucose+fructose), cells ($Y_{X/S}$), HA($Y_{HA/S}$), lactic acid ($Y_{LAC/S}$) and acetic acid ($Y_{ACET/S}$), as well as the volumetric productivity of HA.

According to Tukey test at 5% probability level ($p < 0.05$), there are no significant differences among the specific growth rate (μ_X), the yields related to conversion of the sugars, $Y_{X/S}$, $Y_{HA/S}$, $Y_{LAC/S}$ and HA productivity with the ISCs. However, $Y_{ACE/S}$ decreased from 30 g.L⁻¹, reached a minimum at 50 g.L⁻¹ and increased at 90 g.L⁻¹ ISC. Although $Y_{HA/LAC}$ was maximum while $Y_{X/ACE}$ was minimum both at 50 g.L⁻¹, the $Y_{HA/X}$ was not influenced by the ISC, remaining around 0.6 in the range of the studied ISCs.

These results mean that 50 g.L⁻¹ (25 g.L⁻¹ glucose or fructose) represents the best energetic condition of the metabolism, in terms of the lactic and acetic acid precursors, but it did not influence the production of HA or cells in a competitive mechanism as described in the literature where glucose is used as the only sugar. Pires and Santana (18), found 25g.L⁻¹ to be the best initial glucose concentration in SF, using a synthetic medium containing only glucose as sugar and same concentrations of yeast extract and salts used in the present work. Under such a condition the $Y_{HA/X}$ ratio was 2.0, being the higher glucose conversion into HA other than into cell mass.

Being so, the cashew apple fruit seems to reduce the competition between cells and HA, as well as to attenuate the catabolic inhibition of cell growth and HA production observed with glucose only at 90 g.L⁻¹juice. Moreover, it also benefit the HA productivity in SSF as follows: 0.20 (SSF), 0.09 (cashew juice in SF) and 0.02 [mg.g⁻¹.h⁻¹] (synthetic medium with glucose only in SF).

The ISC effects on the HA average molecular weight (M_w) and M_w distribution are presented in Figure 4 A and B. The majority fractions of molecular weight between 10⁶ and 10⁴ Da were observed. Fractions greater than 10⁶ were also observed but at much lower concentrations in relation to the others. Overall, the average M_w of the HA produced was 10⁵Da. The ISC favors the production of HA chains (10⁶ and 10⁵).

The behavior of the M_w was also similar to the one in SF using cashew juice, but a higher average M_w was obtained in SSF (10⁵Da) compared to SF (10⁴Da). This is due to the higher availability of oxygen in the liquid film in SSF compared to bulk fermentation

broth in SF. However, the M_w of HA from cashew is lesser than the one from the synthetic medium containing glucose only (10^6 Da). According to Liu et al. (2009), the ascorbic acid breaks the HA chains in smaller fractions. The cashew juice contains 1.7g.L^{-1} ascorbic acid, and studies concerning the influence of that acid on the fermentations are being conducted in our group.

From these results, we analyzed the consumption of glucose and fructose along SSF fermentations at 30 and 90 g.L^{-1} (15 and 45 mg.g^{-1}) total sugars in the moisturizing medium. Figure 5 shows a parallel consumption of glucose and fructose at similar rates (after 5h), in both cases. No diauxic behavior could be observed for the consumption of fructose and glucose along the fermentations, and glucose and fructose are consumed as total sugars in the medium, however there is a lag phase for fructose consumption (0-5 h).

Being so, the observed effects in SSF fermentation using cashew apple bagasse are not due to the presence of glucose and fructose in medium, and the available of oxygen remain an important factor to be investigated. Studies in this issue are ongoing in our group.

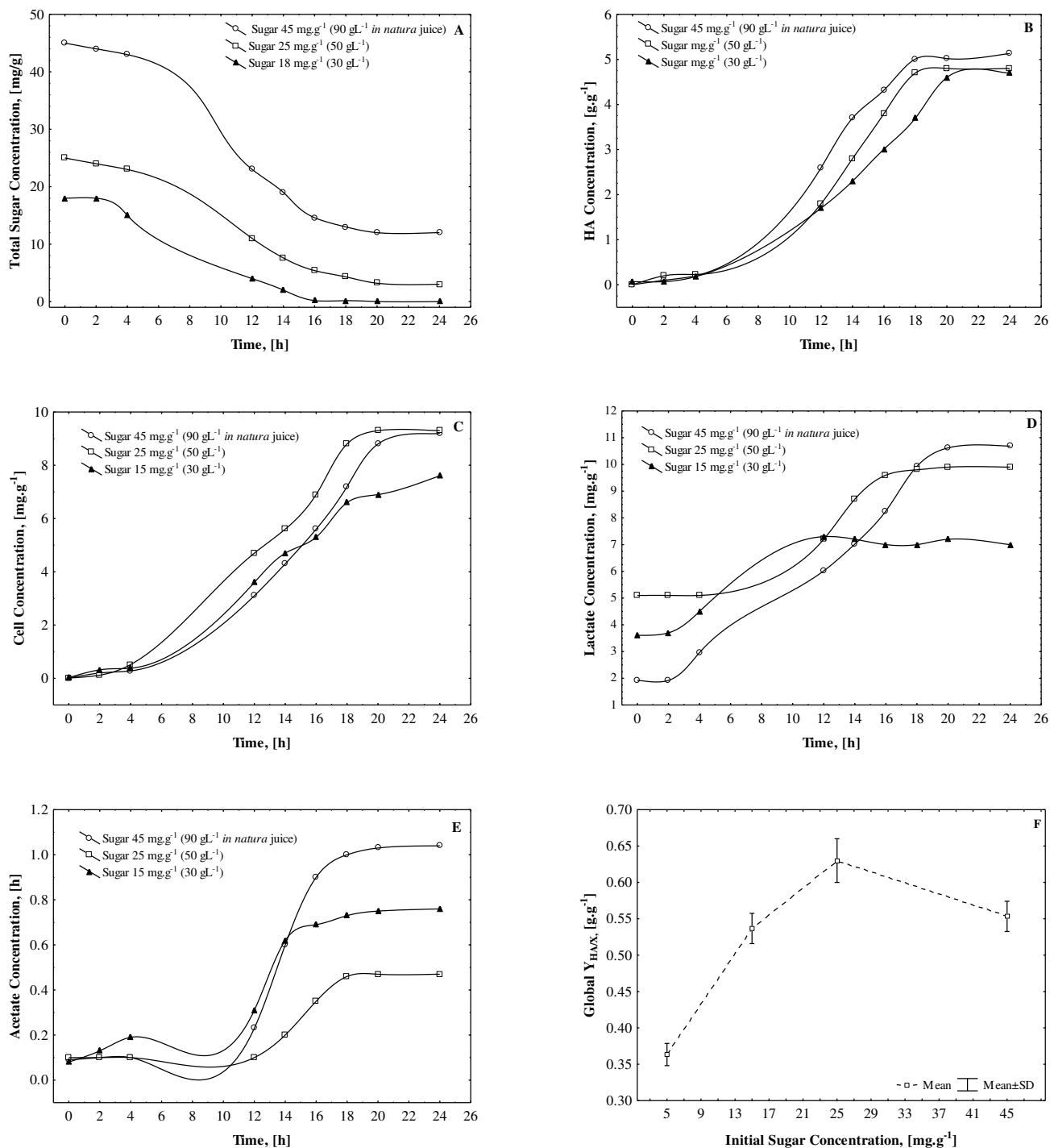


Figure 3. The metabolic effects of the initial glucose and fructose concentration on: (A) total sugars consumption and production of (B) HA; (C) cell mass (D) lactic acid (E) acetic acid and (F) $Y_{HA/X}$ Behavior in solid state fermentation using cashew apple bagasse moisturized with the cashew juice at the total sugar concentrations 30g.L⁻¹ (15 mg.g⁻¹ moist bagasse), 50g.L⁻¹ (25 mg.g⁻¹ bagasse) and 90g.L⁻¹ (45 mg.g⁻¹ bagasse).

Table 3 – Specific growth rate and yields determined in solid state fermentation using cashew apple bagasse moisturized with the cashew juice at the total sugar concentrations 30g.L⁻¹ (15 mg.g⁻¹ moist bagasse, 50g.L⁻¹ (25 mg.g⁻¹ moist bagasse) and 90g.L⁻¹ (45 mg.g⁻¹ moist bagasse).

IGFC	μ_x	$Y_{X/S}$	$Y_{HA/S}$	$Y_{HA/X}$	$Y_{LAC/S}$	$Y_{ACE/S}$	$Y_{HA/LAC}$	Productivity
g.L ⁻¹ or mg.g ⁻¹	[h ⁻¹]	[g.g ⁻¹]	[g.g ⁻¹]	[g.g ⁻¹]	[g.g ⁻¹]	[g.g ⁻¹]	[g.g ⁻¹]	[mg.g ⁻¹ .h ⁻¹]
30	0.104^a	0.315^a	0.171^a	0.566^a	0.194^a	0.033^a	0.843^b	0.21
15	(±0.031)	(±0.019)	(±0.011)	(±0.032)	(±0.024)	(±0.0031)	(±0.09)	
R²	0.99	0.95	0.91	0.98	0.95	0.90	0.88	
50	0.082^a	0.345^a	0.212^a	0.614^a	0.230^a	0.015^c	0.994^a	0.2
25	(±0.014)	(±0.017)	(±0.027)	(±0.1)	(±0.012)	(±0.001)	(±0.004)	
R²	0.95	0.99	0.84	0.96	0.97	0.76	0.79	
90	0.130^a	0.261^a	0.159^a	0.581^a	0.172^a	0.027^b	0.627^c	0.19
45	(±0.022)	(±0.038)	(±0.02)	(±0.016)	(±0.11)	(±0.001)	(±0.03)	
R²	0.99	0.87	0.97	0.91	0.86	0.88	0.73	

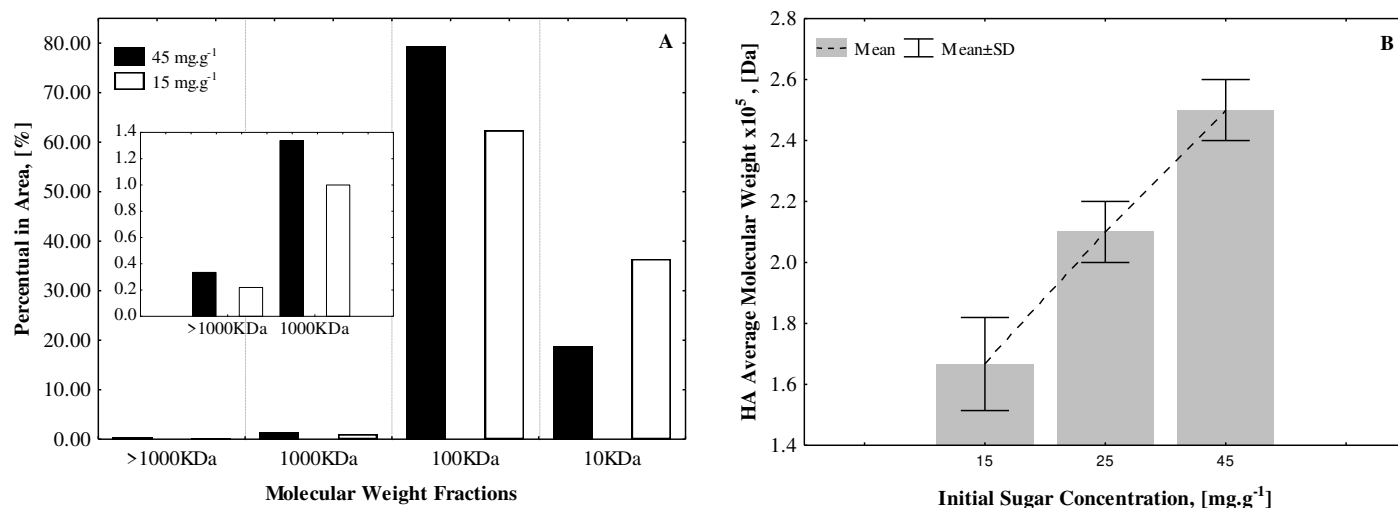


Figure 4. Effects of initial concentration of sugars (glucose and fructose) on HA (A) molecular weight distribution (B) Average M_w.

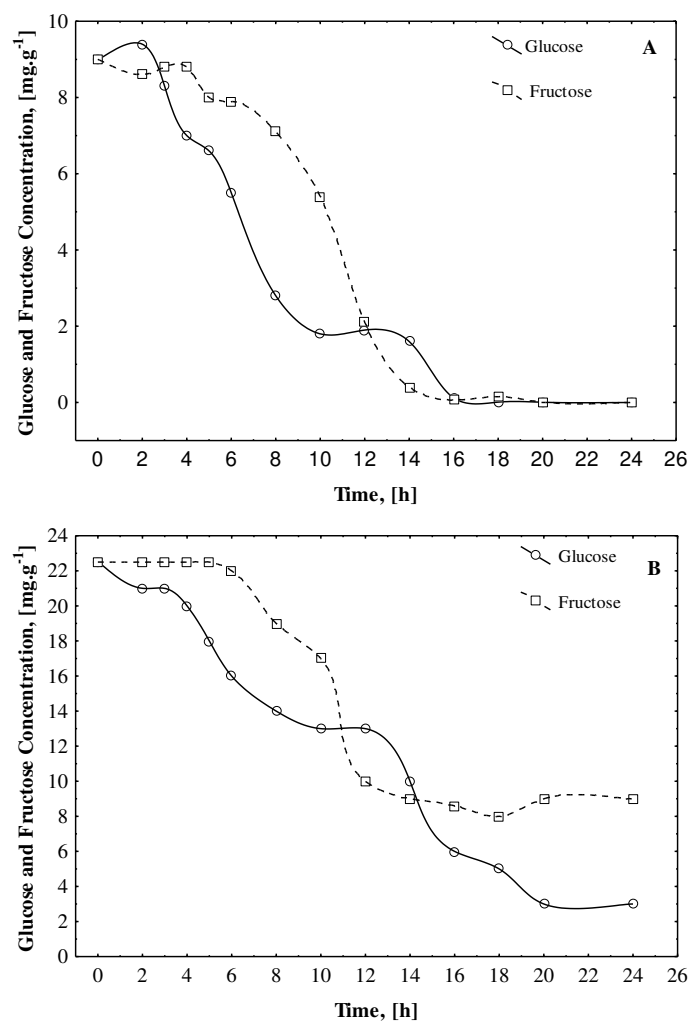


Figure 5. Consumption of glucose and fructose along solid state fermentations in cashew apple bagasse, moisturized with cashew apple juice, yeast extract and salts at (A) 30g.L⁻¹ total sugars (15 mg.g⁻¹) and (B) 90g.L⁻¹total sugars (45 mg.g⁻¹)

4. CONCLUSIONS

The initial sugar (glucose and fructose) concentration influenced the metabolism of *Streptococcus zooepidemicus* mainly on the production of the lactic and acetic acids. The 50 g.L⁻¹ISC in the juice (25 g ISC. g⁻¹ moist bagasse) seems to be the best energetic condition which favors the balanced synthesis of the precursors of HA (UDP-glucuronic

acid and UDP N-acetyl glucosamine) as well as the higher M_w (10^5 e 10^6 Da) fractions of HA. However, the HA and cell production was not affected by the ISC ranging from 30 to 90 g.L⁻¹ISC in the juice (15 to 45 g ISC. g⁻¹ moist bagasse). The glucose and fructose consumption was parallel along the fermentations, with no diauxic behavior. Being so, the availability to oxygen related to the total sugar concentration seems to have an important role in the metabolism, which must be investigated. In technological terms, these results suggest the necessity to dilute the cashew juice from its natural concentration of sugars (90g.L⁻¹) to 50g.L⁻¹ISC in the juice (25 g ISC.g⁻¹ moist bagasse), in order to have the higher molecular weight fraction of HA produced in SSF.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge CAPES and FAPESP for the financial support, the Brazilian Microbial Collection for Environment and Industry (CBMAI) for the maintenance of the *Streptococcus* strain and the Brazilian Industries for the agricultural sources samples, which were used for the preparations of the culture media.

6. REFERENCES

1. Weissman, B. and Meyer, K. (1954) J. Am. Chem. Soc. 76, 1753-1757.
2. Kogan, G., Soltes, L., Stern, R. and Gemeiner, P. (2007) Biotechnol. Lett. 29, 17-25.
3. Brown, M.B., Jones, S.A. (2005) JEADV. 19:308–18.

4. Esposito, E., Menegatti, E., Cortesi, (2005) *R. Int. J. Pharm.* 288, 35–49.
5. Schmidt, K.H.; Gunther, E.; Courtney, H.S. *Med.(1996) Microbiol. Immunol.*, 184, 169-173.
6. Wessels, M.R., Moses, A., Goldberg, J.B. and Dicesare, T.J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 8317-8321.
7. O'Regan M, Martini I, Crescenzi F, De Luca C, Lansing M. (1994) *Int. J. Biol. Macromol.* 16: 283-286.
8. Ruffing, A. and Chen, R.R. (2006) *Microb. Cell Fact.* 5, 25-33.
9. Chong, B.F. and Nielsen, L.K. (2003) *Biochem. Eng. J.* 16, 153-162.
10. Chong, B.F., Blank, L.M., Mclaughlin, R. and Nielsen, L.K. (2005) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 341-351.
11. Liu, L., Wang, M., Du, G. and Chen, J. (2008) *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 383-388.
12. Pires, A.M.B., Macedo, A. C., Eguchi, S. Y., Santana, M. H. A. (2010) *Bioresource Technology* , 101, 6506-6509.
13. Swann, D.A., Sullivan, B.P., Jamieson, G., Richardson, K.R. and Singh, T. (1990) *United States Patent*: 4,897,349.
14. Dische, Z. (1946) *J. Biol. Chem.* 167, 189-198.
15. Balke, S., Hamielec, A., Leckair, B. and Pearce, S. (1969) *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 8 (1), 54-57.
16. Thomas, T.D., Ellwood, D.C, Longyear, V.M. (1979) *J. Bacteriol.* 138: 109–117.
17. Abbe, K., Takahashi, S. and Yamada, T. (1982) *J. Bacteriol.* 152 (1), 175-182.

18. Pires, A.M. B., Santana, M. H. A. (2010) *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-10.
19. Campos, D. C. P., Santos, A. S., Wolkoff, D.B., Matta, V. M., Corrêa, L. M. C., Couri, S. (2002) *Desalination* 148, 61-65.
20. Alcântara, S. R., Almeida, F. A. C., Silva, F. L. H., Gomes, J. P. (2009) *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambiental* 13, 81-87.
21. Morton, J.F., Dowling, C.F. (1987) *Fruits of warm climates*, Creative Resources Systems, pp. 239–240. ISBN: 0961018410.
22. 14. Matias, M. F. O., Oliveira, E. L., Gertrudes, E., Magalhães, M. M. A. (2005) *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 143-150, edição especial.
23. Moura Fé, J. A., Holanda, L. F. F., Martins, C.B.(1972) *Ciência Agronômica* 2, 109-112.
24. . Souza, P.A., Menezes, J.B., Andrade, J.C., Freitas, D.F., Mendonça, V.S. (2001) *ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA*, Belém, PA.

THE ROLE OF OXYGEN IN THE HYALURONIC ACID PRODUCTION BY SOLID STATE CULTIVATION OF *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* IN CASHEW APPLE BAGASSE

André C. Macedo¹, Felipe A. Ferrari¹, Reinaldo G. Bastos² and Maria H. A. Santana^{1*}

¹Laboratory of Development of Biotechnological Processes

School of Chemical Engineering, University of Campinas-UNICAMP

13083-852, Campinas-SP, Brazil

² Department of Agroindustrial Technology, Social and Rural Economy,

Federal University of São Carlos - UFSCar

13600-970, Araras- SP - Brazil – P.O. Box: 153

SUMMARY – This study explores the effects of the oxygen supply on solid state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in cashew apple bagasse. Two aspects were discussed: the influence of the particle comminution and volumetric air flow rate in the hyaluronic acid (HA) production. The cultivations were carried out in column reactors, under forced air supply (0.4-1.4 L.min⁻¹), with particle mean diameters 0.67-3.20 mm at 50% initial moisture. We observed that smaller particles result in a larger yields of HA related to the cells ($Y_{HA/X}$) and HA production. Smaller particles also have higher water activity and accumulate the moisturizing liquid medium in a film around the particles. The cells grow preferentially in this film, consuming most of the supplied oxygen. In respect to the influence of the volumetric air flow rate, two different behaviors were observed: at low oxygen flow rates (0.4-0.8 L. min⁻¹), the productions of HA and cells were competitive, while at higher flow rates (1.0-1.4 L.min⁻¹), both HA and cells increased in a non-competitive behavior. The mean molecular weight of HA increased with air flow rate, but decrease at 1.4 L.min⁻¹. The $Y_{HA/X}$ yield correlated with the (air flow rate)/(initial sugar) ratio (R). A somehow constant value 0.57 was obtained in a wide range of R (1.27-2.2 L air/g total sugars.min). This range of R, represents the best stoichiometric ratios between oxygen and total sugars, in which the energetic state of cells benefits the synthesis of precursors in a balanced ratio leading to a maximum HA production.

Key-words: hyaluronic acid, Solid state fermentation, oxygen, gas-liquid phase oxygen transfer coefficient, *Streptococcus zooepidemicus*.

* Corresponding author: Phone.: +55 19 3521 3921; Fax: +55 19 3521 3890

E-mail address: mariahelena.santana@gmail.com

1. INTRODUCTION

Hyaluronic acid (HA) is a capsule biopolymer produced by some strains of eukaryotic cells and some prokaryotes such as *Streptococci* pathogenic groups A and C. [1,2].

Some studies mention HA as belonging to the cellular defense mechanism against the toxic effects caused by oxygen. Several of these mechanisms are promoted by oxygen toxicity, especially those in the univalent reduction of molecular oxygen and hydroxyl free radicals [3,4,5].

Thus, it is known that oxygen plays an important role in the synthesis of HA, mainly as a result of this complex protective mechanism. Even taking a prominent role there are few studies on the metabolic changes associated with increased aeration rate in the culture medium.

The studies by Hasegawa *et al.* [6] and Huang *et al.* [7], reported an increase in the production of HA as a result of higher rates of aeration in submerged fermentation processes.

Johns *et al.* [8], Chong and Nielsen [9] and Chong *et al.* [10], suggested that, unlike the anaerobic cultivation, agitation increased availability of oxygen, leading to better energy gain and consequently a higher yield and the molecular weight (M_w) of HA.

Duan *et al.* [11] studied the effects of oxygen on the M_w of HA produced in submerged fermentation. Results showed that under anaerobic conditions, the M_w was $1.22 \pm 0.02 \times 10^6$ Da, reaching $2.19 \pm 0.05 \times 10^6$ Da to a 50% dissolved oxygen (DO) level, agreeing with Chong and Nielsen [9]. However, small effects of degradation around DO 80% (2.06 ± 0.02

$\times 10^6$ Da) were observed. These effects were explained by the balance between synthesis and degradation of HA mediated by oxygen.

It has been shown that SSF provides better dispersion of oxygen in the liquid film, leading to higher rates of oxygen transfer that will be available to the cells. Heterogeneity is a main characteristic in SSF. Microbial growth on a solid matrix occurs two domains that are the stagnant films inter and intra-particle pores in which the oxygen is diffused [12, 13, 14, 15]. Figure 1 shows the occurrence of phenomena of oxygen transfer in a porous particle.

Oxygen transfer in cashew bagasse as well as in any porous particle, occurs in the two steps of the Figure 1, in which the intraparticle diffusion has major limitations. The most practical way to increase aerobic metabolism is facilitating the transfer of oxygen from the gas phase to the microorganisms in the liquid phase. Therefore the global coefficient of mass transfer (gas-liquid), K_{La} , becomes a variable of great importance to describe SSF [16, 17]. Despite of that, there are few studies addressing this issue in SSF.

Considering the importance of oxygen in the microbial synthesis of HA, as well as the few studies of oxygen transfer in SSF, in this work we describe the role of oxygen in the HA production by *Streptococcus zooepidemicus* cultivation in cashew apple bagasse, focusing on the effects of particle size and volumetric air flow rate.

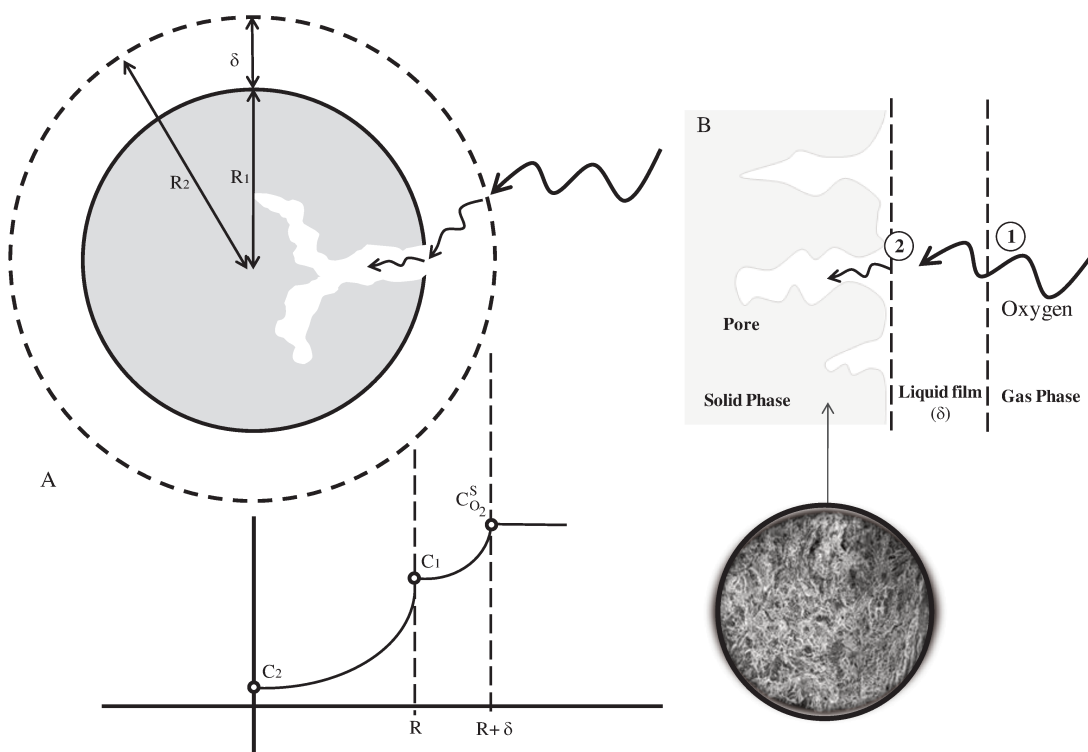


Figure 1. (A) Mechanism of oxygen transfer in a porous particle. (B) (1) oxygen in the gas phase diffuses to the liquid phase in a stagnant liquid film and then (2) diffuses into the pore (adapted from Gowthaman *et al.*12)

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Microorganism. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) as a lyophilized culture kept in ampoules.

2.2. Culture Maintenance and Inoculum Preparation. The stock culture was maintained frozen in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 10% glycerol and glass beads. The

inoculum was prepared in one step, Ten glass beads were transferred to each tube containing 10 mL of the studied culture medium and incubated at 37°C for 12 hours.

2.3. Culture Media. The culture media based on the cashew apple was prepared using commercial cashew apple CAJU GAIA® (Itaueira Agropecuária S/A, Russas, Ceará, Brazil) at harvesting season.

2.3.1. Liquid medium. The liquid medium was prepared from the cashew apple juice *in natura* 90 (*in natura* juice) gL⁻¹, and supplemented with yeast extract and salts, according to Swann *et al.* [18] (Table 1). The pH was adjusted to 7.5 with NaOH (0.1 M). Liquid medium was sterilized by microfiltration through 0.22 µm cellulose acetate membranes.

Table 1 – Composition of the synthetic medium supplementation (Swann *et al.*, 1990).

Component	Concentration (g.L ⁻¹ deionized water)
Glucose	45.0
Yeast extract	60.0
K ₂ SO ₄	1.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0
Na ₂ SO ₄ .12H ₂ O	0.2
CaCl ₂ .2H ₂ O	5.0*
FeSO ₄ .7H ₂ O	5.0*
MnSO ₄ .4H ₂ O	1.0*
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.0*
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1*
H ₃ PO ₄	1.0 mL

* mg.L⁻¹ deionized water

2.3.2. Solid medium. After extraction of the juice through crushing, the bagasse was comminuted using a multipurpose food processor (850W - Arno Multichef MPAI). For

assays varying mean diameters the solid particles were separated into groups of different Sauter mean diameters after passing through a system of vibrational sieves. Four groups were selected: 0.67, 1.54, 2.48 and 3.20 mm as shown in Figure 2, and dried until 30% moisture. The same bed height (3 cm) was used for the various particle sizes. The total content of total sugars in the bagasse was 0.045 g.g^{-1} of moisture bagasse. Due to the low amounts of total sugars and nitrogen the bagasse was supplemented with the liquid medium described in 2.3.1, until a final moisture content of 50%.

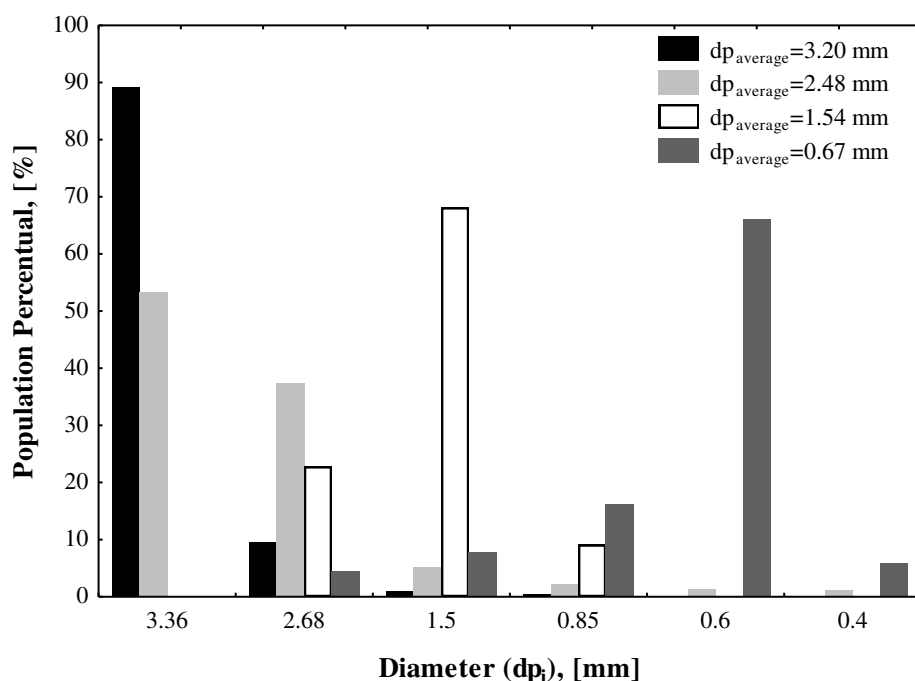


Figure 2. Characterization of the four groups of solid particles used for the studies of particle size in the production of HA. Sauter mean diameters were determined by the equation for mean $dp = 1/(x_1/dp_1) + (x_2/dp_2) + \dots + (x_n/dp_n)$ using x_i as the mass fractions for each diameter (dp_i) in the particle population (■) 3.20mm, (■) 2.48 mm (□) 1.54mm and (■) 0.67 mm.

For assays varying volumetric inlet air flow rate, the particles were 0.67 mm Sauter diameter. The moisture (50 %) and total sugar content (0.045 g.g^{-1} of moisture bagasse) were the same used in the former assays. In both cases the solid medium was sterilized by U.V. radiation during 1 hour.

2.4. Fermentation. The SSF was carried out in a system composed of six fixed bed columns (modified Raimbault columns) with 3 cm in diameter, which were packed with the cashew bagasse. For the tests varying particle diameter each column was fed with 0.4 L.min^{-1} air flow rate. For the assays varying volumetric air flow rate, each column was fed with air at 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 and 1.4 L.min^{-1} . In both cases a 3 cm bed height was used. A primary humidifier was coupled to the system. The air was supplied through a compressor. For the outlet oxygen concentration analysis it was used an oximeter YSI ® Model 5300 coupled and properly calibrated. The columns were incubated at 37°C , under controlled temperature. Oxygen was monitored throughout the process while the HA, biomass and sugar concentrations were determined only at the beginning and end of the process.

2.5. Recovery of HA. The products were extracted from bagasse through one stage lixiviation using 10 mL of Milli-Q water during 1h. The obtained extract was centrifuged at 3200 rpm for 30 minutes for cell separation and the HA was precipitated from cell free supernatant with ethanol in a proportion 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down, remaining at 4°C during 1 hour for the precipitation of HA. The precipitated

HA was redissolved in a 0.15 mol.L^{-1} sodium chloride solution. Three steps of precipitation and redissolution were performed to increase the yield of precipitated HA.

2.6. Analytical Methods

2.6.1. Cell growth. The cell growth was determined by cell dry weight according to the gravimetric method. To this end, 10 mL of the culture broth were microfiltered through $0.2 \mu\text{m}$ cellulose acetate membranes (Sartorius, Goettingen, Germany) which were dried to constant weight at 60°C .

2.6.2. HA concentration. The HA concentration was determined by the carbazol reagent [19]. Sodium hyaluronate (HylumedTM) from Genzyme Corporation (Cambridge, Massachusetts, USA) was used as a standard.

2.6.3. Total Sugar Content. The total sugar concentration was determined by HPLC reverse phase with a Hicrom C18 (250mm x 4.6mm) column. Acetonitrile-water (20:80 v/v) was used as isocratic mobile phase at a 0.5 mL.min^{-1} . Sugar detection was performed by a refractive index detector (Shimadzu RID-6A).

2.6.3. HA molecular weight. The average molecular weight of HA was determined by size exclusion chromatography. It was used a Shimadzu chromatography system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), containing a (35 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P column guard (Phenomenex, Torrance, California, USA) mounted in series with a (300 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P6000 column of the gel filtration (Phenomenex, Torrance, California, USA) and a refraction index detector. (Shimadzu RID-6A). The analysis conditions were: injected sample of $20 \mu\text{L}$, sodium nitrate 0.1 mol.L^{-1} as the mobile phase, flow rate of 1.0 mL.min^{-1} and 25°C temperature, as suggested by the column manufacturer. Dextran (American

Polymer Standards, Mentor, Ohio, USA) with molecular weight ranging from 10^3 to 10^6 Da was used as a standard for the calibration curve as described by Balke *et al.* [20].

2.7. Mass transfer evaluation

The evaluation of oxygen transfer was based on the overall balance in fixed bed column, so after obtaining values for oxygen balance it was possible to calculate the oxygen uptake rate (OUR) and cumulative oxygen uptake (COU).

The mechanism of oxygen transfer from the gas phase to the microorganism is controlled by the static liquid film mass transfer resistance as described by Thibault *et al.* [21]. The overall oxygen transfer rate (N) can be calculated by the oxygen balance in columns (Eq. 1).

$$N = \frac{1}{V_s} [(FC_G)_{in} - (FC_G)_{out}] \quad (\text{Eq. 1})$$

Where V_s (m^3) is the volume of solid substrate, F is the gas flow rate, C_G is the gas phase oxygen concentration (mol/m^3).

Oxygen balance allows the calculation of the average rate of oxygen consumption in the liquid film (Eq.2):

$$R_{O_2} = \frac{((FC_G)_{in} - (FC_G)_{out})}{V_L} \quad (\text{Eq. 2})$$

Where V_L is the volume of liquid, F (m^3/s) is the gas flow rate, C_G is the gas phase oxygen concentration.

Eq. 3 allows calculating the radial oxygen profile with assumption zero order consumption reaction:

$$\frac{C_L(r)}{C^*} = 1 + \frac{1}{6} \left(\frac{R_{O_2} R_2}{D_{O_2,L} C^*} \right) \left[\left(\left(\frac{r}{R_2} \right)^2 - 1 \right) + 2 \left(\frac{R_1}{R_2} \right)^3 \left(\frac{R_2}{r} - 1 \right) \right] \quad (\text{Eq. 3})$$

Where C^* is the equilibrium concentration at the gas-liquid interface on the liquid side; r is the radial position coordinate; $D_{O_2,L}$ is the oxygen diffusivity in biofilm. The mean biofilm thickness (10 μm) was determined using an optical Microscope (LEICA DML) and specific softwares LEICA Quips and LEICA QFAB. Qualitative photography of the liquid film was obtained by an ophthalmic slit lamp. $D_{O_2,L}$ value was $2.33 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. To determine the intrapore oxygen profile the effective diffusivity was estimated considering particle porosity obtained by gas porosimetry (0.78) and a tortuosity value as used for organic materials and activated carbon (3.5).

Thus, the gas-liquid phase oxygen transfer coefficient ($K_L a$) was determined according to Eq. 4:

$$N = K_L a (C^* - C_L) \quad (\text{Eq. 4})$$

Where C^* is the equilibrium oxygen concentration and C_L is the dissolved oxygen concentration, calculated in Eq. 3.

2.8. Statistical analysis

The variance was analysed by ANOVA method and the media compared by Tukey test at 5% probability ($p < 0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. PARTICLE SIZE EFFECTS ON THE HYALURONIC ACID PRODUCTION

The effects of particle mean diameter are shown in Figure 3. It was observed that increase of particles sizes causes an increase in the moisture accumulation within the bed (3 cm) after 24 h of fermentation (Figure 3 A).

Besides the effects on the moisture accumulation in the bed, the use of smaller particles also favors the production of HA, the HA related to cell growth yield, $Y_{HA/X}$, (Figure 3 B), the oxygen consumption (Figure 3 C) as well as the M_w of HA (Figure 3 D).

The extension of increase in the HA production was $1.95 \pm 0.03 \text{ mg.g}^{-1}$ to $5.6 \pm 0.13 \text{ mg.g}^{-1}$ and the cell growth was $6.3 \pm 0.25 \text{ mg.g}^{-1}$ to $10.4 \pm 0.55 \text{ mg.g}^{-1}$, for 3.20 and 0.67 mm particle mean diameter respectively.

The images obtained by an ophthalmic slit lamp (Figures 4 A and B) show that the larger particles, such as 3.20 mm, lead to low exposure of the water at its surface, compared the smaller ones. This is a consequence of the differences in porosity of the particles, as shown morphologically in Figures 4 C and D. The larger pores in 3.20 mm particles allow water that swells the solid phase remains into the pores preferentially, in counterpart with the accumulation of water at the surface of the 0.67 mm particles, due to the resistance of its smaller pores.

From these results, we infer that the HA production is directly associated to the availability of oxygen to the bacteria cells in the liquid film. Therefore, the accumulation of

water at the surface of the smaller particles of the cashew bagasse, benefits the oxygen transfer from gas to the liquid phase.

As a result of increased oxygen consumption and availability, there is also an increase in average molecular weight of HA produced using the smaller particles. Similar effect of the oxygen availability on the M_w of HA was also observed by Duan *et al.* [11], in submerged fermentation.

Table 2 shows the water activity (a_w) in cashew bagasse at different diameters of the particles. The a_w increases with the reduction of the particle size. According to the thermodynamic water activity, described by the Kelvin equation (6) presented in Gervais and Molin [22], the radius of the liquid meniscus (r_m) increases the water activity.

$$\ln(a_w) = \ln\left(\frac{P_w}{P_w^0}\right) = \frac{\bar{V}_m}{RT} \left[-\frac{\sigma}{r_m} - (P_w - P_w^0) \right] \quad (\text{Eq.6})$$

Where V_m is the molar volume of water, σ is the surface tension and r_m is the radius of the liquid meniscus.

These results confirm the accumulation of water observed at the surface of the smaller particles in the image of Figure 4B.

Table 2 – Water Activity as a function of particle Sauter mean diameter .

Particle Sauter Mean Diameter (mm)	a_w
0.67	0.987 (± 0.015)
1.54	0.832 (± 0.022)
2.48	0.806 (± 0.002)
3.2	0.672 (± 0.029)

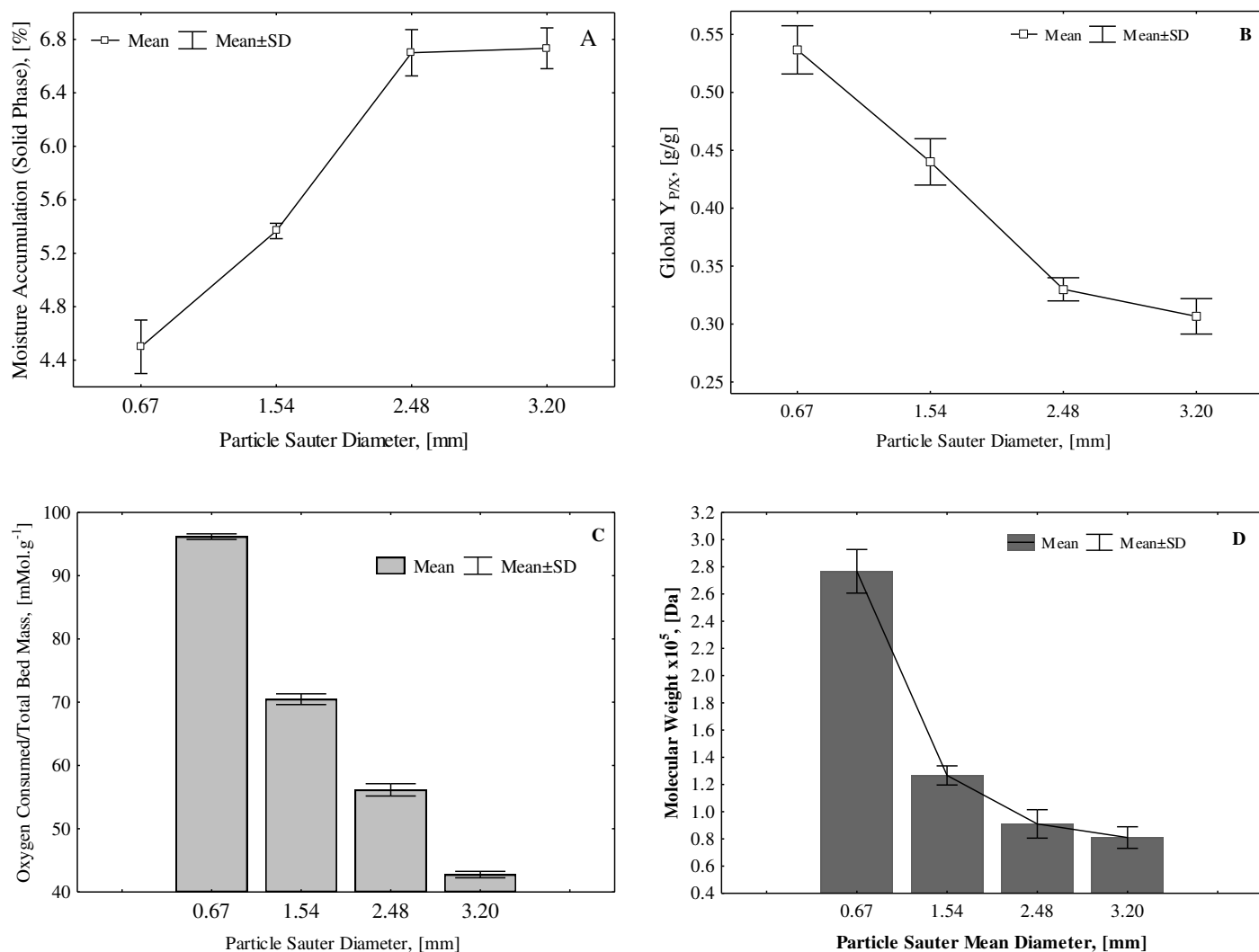


Figure 3. Effects of particle Sauter mean diameter on the (A) moisture accumulation by the solid phase after 24h of fermentation, (B) global $Y_{HA/X}$ (production of HA related to cell growth), (C) total oxygen consumption in bagasse bed and (D) molecular weight of HA.

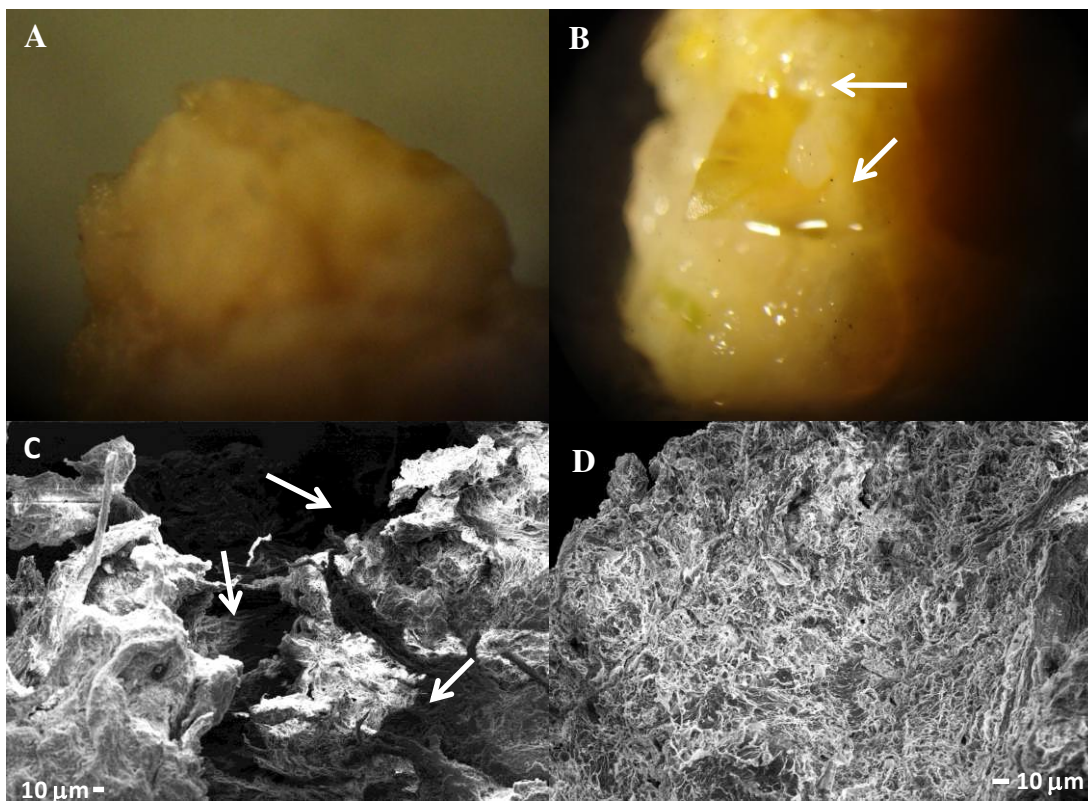


Figure 4. Images obtained of the cashew bagasse particles by a ophthalmologic slit lamp (A) and 3.20mm (B) 0.67mm showing the greater exposure of water in the surface of particle of 0.67 mm. Scanning electron microscopy micrographies obtained for the same particles (C) 3.20mm highlighting the larger pores into the particles of 3.20mm.and (D) 0.67mm.

3.2. VOLUMETRIC INLET AIR FLOW RATE EFFECTS ON THE HYALURONIC ACID PRODUCTION

Figure 5 shows the effects of the inlet air flow rate on the HA production and cell growth. It was observed that the increase of the air flow rate also leads to an increase in the HA production (Figure 5A). A different behavior was observed for cell growth (Figure 5B),

in which the cell concentration decreases until 0.8 L.min^{-1} followed by an increment from 1.0 L.min^{-1} in which cell growth is parallel to the HA production. These behaviors are reflected on the yields $Y_{\text{HA/S}}$ and $Y_{\text{X/S}}$, related to the substrate consumption to HA and cell growth (Figures 5C and D) .

Therefore, at low air flow rates ($0.4\text{-}0.8 \text{ L. min}^{-1}$), the cell growth competes with HA production. However, at high air flow rate both the HA and cell production increase, showing a non-competitive behavior.

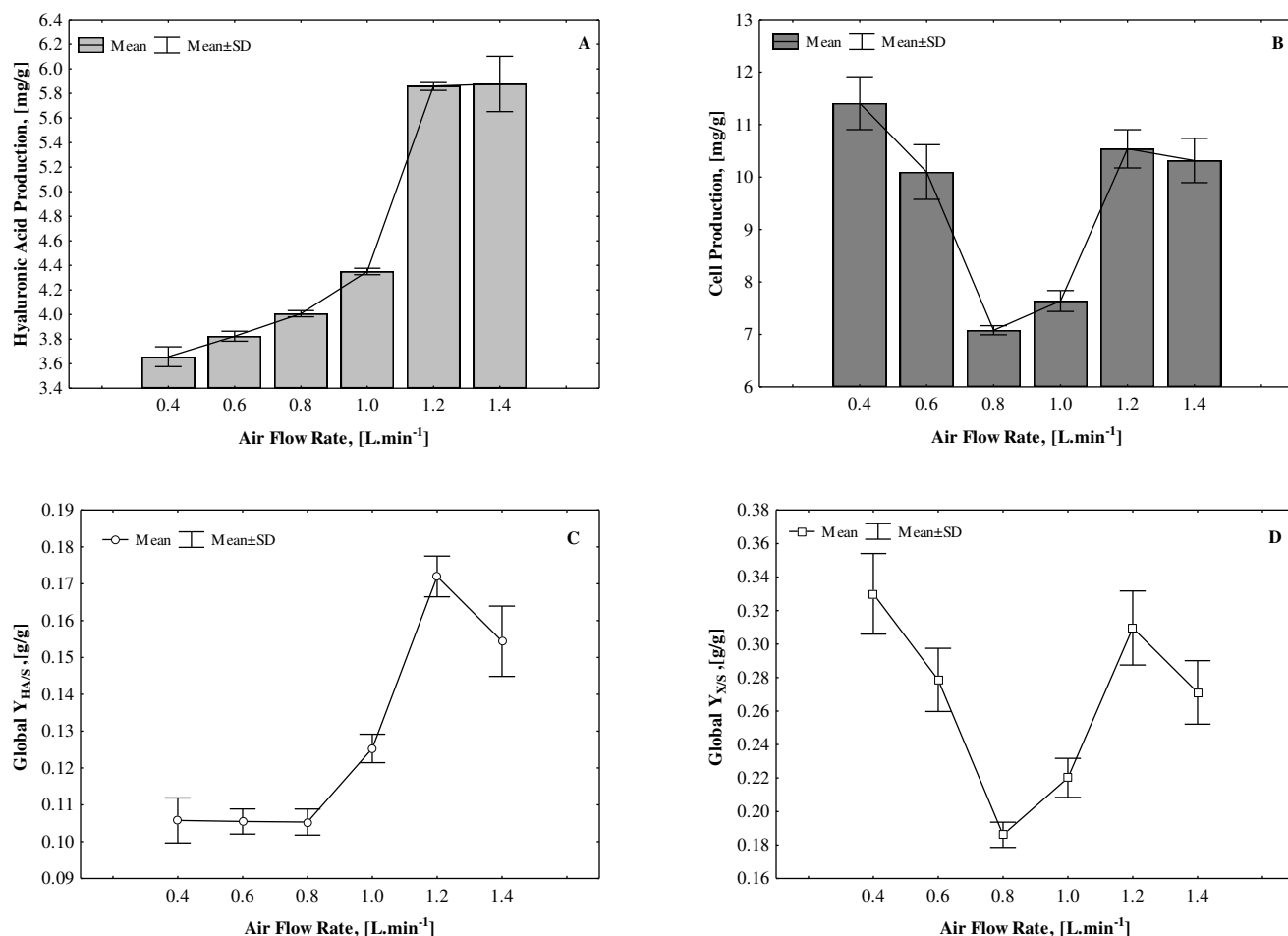


Figure 5. Effect of volumetric inlet air flow rate on the production of (A) HA, (B) Biomass and the global yields (C) $Y_{\text{AH/S}}$ and (D) $Y_{\text{X/S}}$.

Figure 6A shows the metabolic behavior for the HA production related to cell growth, described in terms of the $Y_{HA/X}$ yield. It was observed that at low air flow rates (0.4-0.8 L.min⁻¹), $Y_{HA/X}$ yield increases with the volumetric air flow rate. Above 0.8 L.min⁻¹, the $Y_{HA/X}$ yield remains constant, suggesting an oxygen saturation of the liquid film and an optimal stoichiometric ratio between oxygen and total sugars. Moreover, the oxygen consumption increases with the air flow rate (Figure 6B), and the increment of the calculated oxygen transfer coefficient K_La demonstrates the higher oxygen availability at higher air flow rate (Figure 6C).

The M_w also increases with the air flow rate, although there is a decreasing tendency above 1.2 L.min⁻¹ (Figure 6D), due to the break of the HA chains imparted by the presence of oxygen reactive species.

Figure 7 shows the moisture accumulation in the bed (Figure 7A) and the film formed by liquid water arranged around the particle (Figure 7B).

Although the moisture content has decreased in relation to the volumetric air flow rate, it did not reach values higher than 5%. These small changes did not alter significantly the liquid film thickness ($10 \pm 0.10 \mu\text{m}$) around the particles. So, we assumed this value for the calculations of the oxygen profiles, and the gas-liquid oxygen transfer coefficient (K_La).

In Figure 7C we observe the calculated oxygen profiles in the stagnant liquid film and Figure 7D the intra-particle oxygen profiles. In consequence of the low water content inside particles, as well as the intra-particle limitations to oxygen transfer, most of the oxygen is consumed in the liquid film around the particles, where the cells grow preferentially.

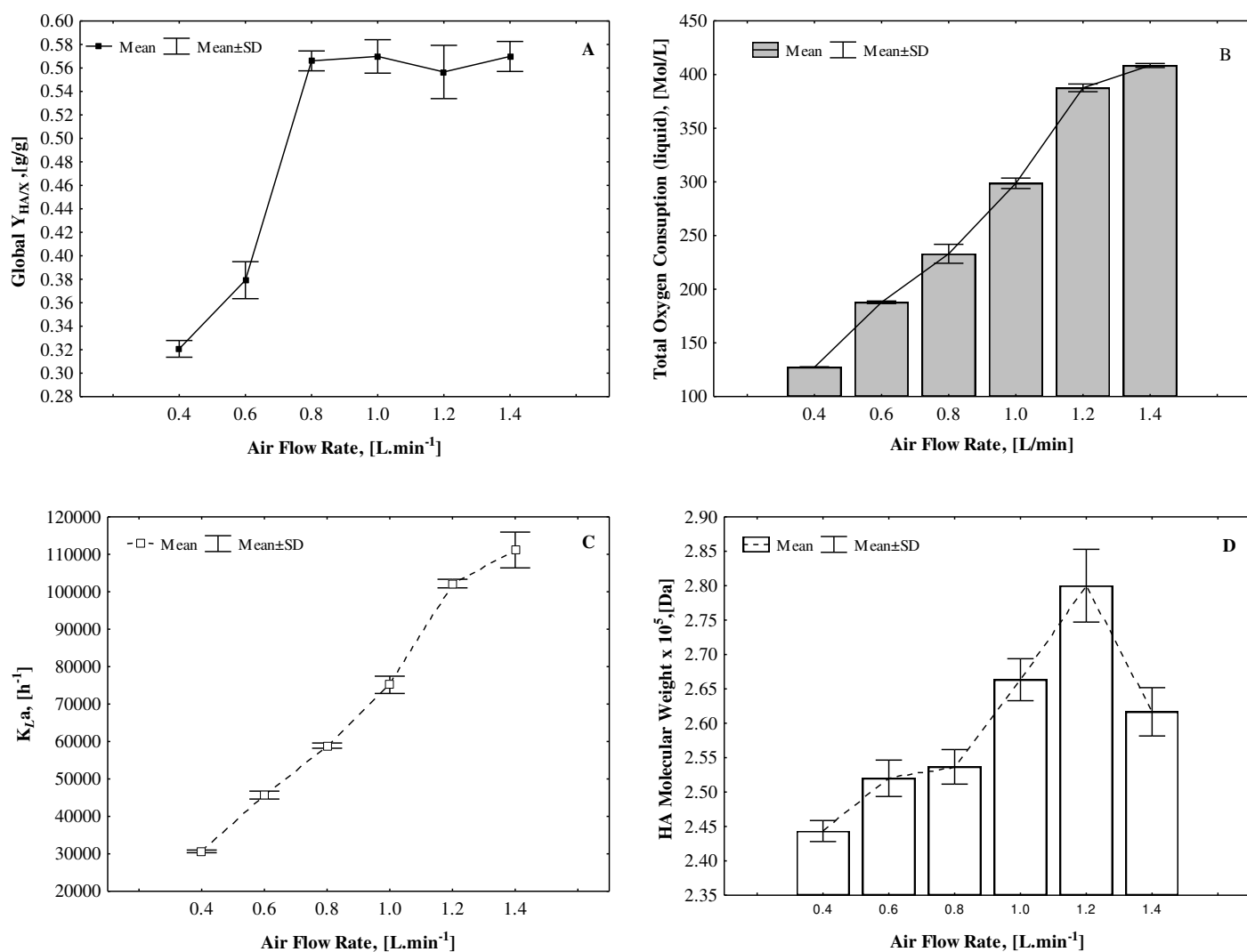


Figure 6. Effect of volumetric air flow rate on the (A) global yield $Y_{HA/X}$, (B) total oxygen consumption, (C) gas-liquid oxygen transfer coefficient (K_{La}) at the exponential phase of microbial growth (D) HA Molecular weight.

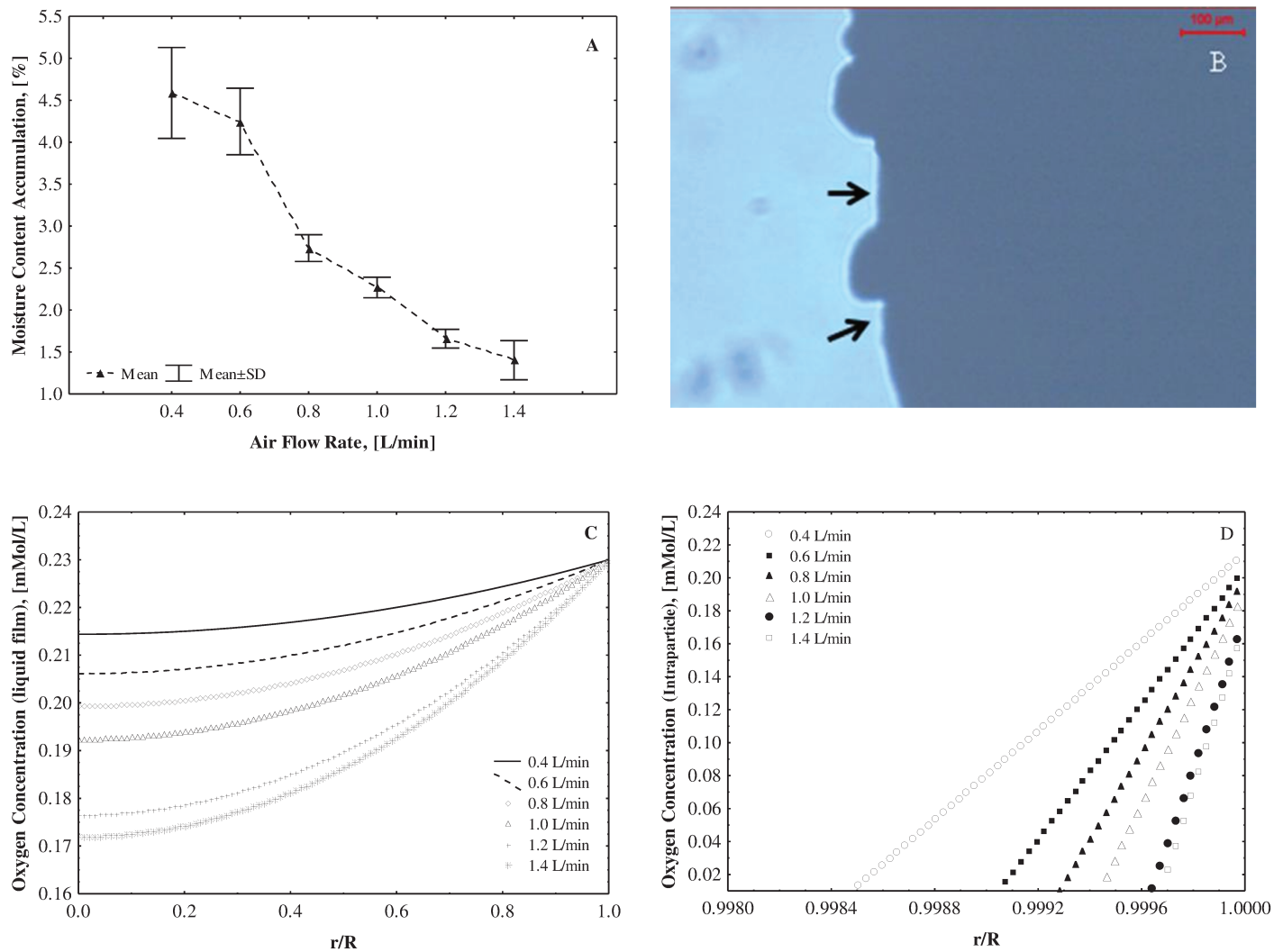


Figure 7. (A) Effects of volumetric air flow rate on the moisture content accumulation in bed($\blacktriangle$), (B) Optical micrography detailing liquid film, (C) Oxygen concentration profiles in liquid film (at 12h fermentation) and (D) Intra-particle oxygen concentration (at 12h fermentation). Air flow rates: 0.4 ($\circ$), 0.6 ($\blacksquare$), 0.8 ($\blacktriangle$), 1.0 ($\triangle$), 1.2 ($\bullet$) and 1.4 ($\square$) $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

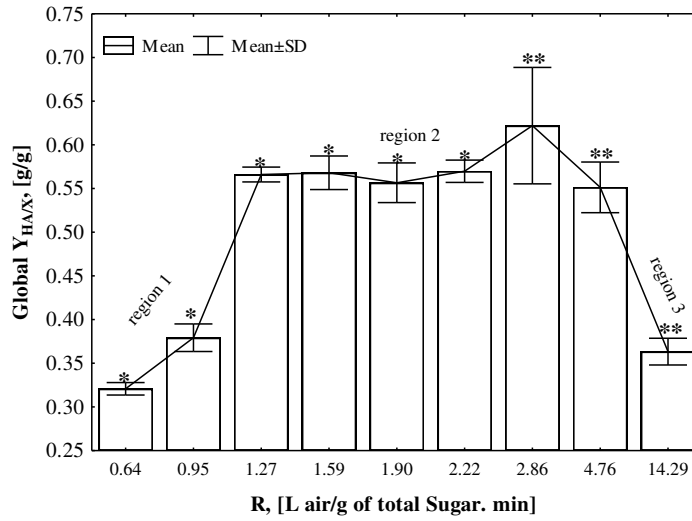


Figure 8. EffectS of the R ratio (volumetric air flow rate/total sugar mass) on $Y_{HA/X}$ yield. (*) Data obtained at total sugar concentration was constant 45 mg.g^{-1} (90 g.L^{-1}) in liquid phase and air flow rates from 0.4 to 1.4 L.min^{-1} . (**) Values obtained at 1 L.min^{-1} and $45, 25$ and 15 mg.g^{-1} total sugar concentration ($90, 50, 10 \text{ g.L}^{-1}$).

Our previous studies have demonstrated that, unlike submerged fermentation, SSF at high flow rate (1 L. min^{-1}) shows no catabolic inhibition even at 90 g/L (liquid phase) total sugar concentration. This observation certainly has links with the higher oxygen availability in the SSF compared submerged fermentation. Moreover, Figure 8 shows that $Y_{HA/X}$ correlated with the R (air flow rate / g initial total sugars) ratio, delineating 3 regions: the first one between 0.635 to $1.27 \text{ L.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$, in which $Y_{AH/X}$ increases with the increasing R; a second region between 1.27 to $4.76 \text{ L.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ where $Y_{HA/X}$ is maximum and constant, at least a third region from 4.76 to $14.29 \text{ L.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ where $Y_{HA/X}$ decreases with the

increasing R. In region 1 the HA and cells compete to the energy and sugar sources, while in region 2 a non-competitive behavior is observed. In general, submerged fermentations have R values in region 1, due to the low oxygen availability, and the competitive behavior is described in the most of the reported studies [9,10,23] These results allows to infer, that independent of process (submerged or solid state), or the total sugars (glucose + fructose or glucose only), the metabolic deviations are controlled by the R ratio. The R range in which the maximum $Y_{HA/X}$ is obtained, represents the best stoichiometric ratios between oxygen and total sugars, in which the energetic state of cells benefits the synthesis of precursors in a balanced ratio leading to a maximum production of HA.

4. CONCLUSIONS

The oxygen plays an important role in HA production. Smaller particles benefit the HA production and oxygen transfer, due to the accumulation of moisture in a film around its surface. The metabolic deviations, described by $Y_{HA/X}$ yield, are controlled by the oxygen availability to the total sugars. Air flow rate/total sugars ratios in the range of 0.64 to 4.76 L/(g sugars.min) give the maximum $Y_{HA/X}$ yield, the production of HA and cells is non-competitive, and no catabolic inhibition is observed even at high sugar concentration as 90g/L in the liquid phase. Therefore, this range defines a balanced ration between the precursors toward production of HA.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge CAPES and FAPESP for the financial support, the Brazilian Microbial Collection for Enviroment and Industry (CBMAI) for the maintenance

of the *Streptococcus* strain and the Brazilian Industries for the agricultural sources samples, which were used for the preparations of the culture media.

6. REFERENCES

[1] Mausolf A, Jungmann J, Robenek H, Prehm P. Shedding of hyaluronate synthase from streptococci. *Biochem J.* 1990, Apr 1; 267(1):191–196.

[2] Wessels MR, Moses AE, Goldberg JB, DiCesare TJ. Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 1;88(19):8317–8321.

[3] Cleary PP, Larkin A. Hyaluronic acid capsule: strategy for oxygen resistance in group A streptococci. *J Bacteriol* 1979; 140:1090–1097.

[4] Šoltés L.; Mendichi R., Kogan G, Schiller J. Stankovská, M.; Arnhold, J. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. *Biomacromolecules*, 2006; 7: 659-668.

[5] 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 Technol* 2009; 100: 362–367.

[6] Hasegawa S, Nagatsuru M, Shibutani M, Yamamoto S, Hasebe S. Productivity of concentrated hyaluronic acid using maxblend fermentor. *J Biosci Bioeng* 1999; 88, 68–71.

[7] Huang WC., Chen SJ, Chen, TL. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic fermentation. *Biochem. Eng. J.* 2006; 32: 239-243.

[8] Johns MR, Goh LT, Oeggerli A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biotechnology Letters* 1994; 16 (5): 507-512.

[9] Chong BF, Nielsen LK. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Biotechnol.* 2003;100: 33-41.

[10] Chong, BF, Blank LM, McLaughlin R., Nielsen LK. Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005; 66: 341-351.

[11] Duan XJ, Niu HX, Tan WS, Zhang X. Mechanism analysis of effect of oxygen on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Microbiol. Biotechnol* 2009; 19: 299-306.

[12] Gowthaman MK, Raghava Rao, KSMS, Ghildyal NP, Karanath NG. Gas concentration and temperature gradients in a packed bed solid-state fermentor. *Biotechnol Adv.* 1993; 11: 611–620.

[13] Mitchell DA, Krieger N, Studart DM, Pandey A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochem*, 2000; 35:1211-1255.

[14] Pandey A, Solid state fermentation. *Biochem Eng J.* 2003;13: 81-84.

[15] Raghavarao KSMS, Ranganathan TV, Karanth NG. Some engineering aspects of solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* 2003; 13: 127-135.

[16] OOSTRA, J.; COMTE, E.P.I.; VAN DER HEUVEL, J.C.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering.* V.75, n.1, p.13-24. 2001.

[17] Poughon, L.; Duchez, D.; Cornet, J. F.; Dussap, C. G. k_{La} determination: comparative study for a gas mass balance method. *Bioprocess and biosystems engineering*. 25(6):341-8,2003

[18] Swann DA, Sullivan BP, Jamieson G, Richardson KR, Singh T. Biosynthesis of hyaluronic acid. United States Patent: 1990; 4,897,349.

[19] Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.* 1946; 167: 189-198.

[20] Balke S, Hamielec A, Leclakair B, Pearce S. Gel permeation chromatography. calibration curve from polydisperse standards. *Ind Eng Chem Prod Res Dev* 1969; 8: 54-57.

[21] Thibault J, Pouliot K, Agostin E, Pérez-Correa R. Reassessment of the estimation of dissolved oxygen concentration profile and K_{La} in solid state fermentation. *Process Biochem* 2000; 36: 9-18.

[22] Gervais P, Abadie C, Molin P, Fungal turgor pressure is directly involved in the hyphal growth rate. *Microbiol. Res.* 1999;154: 81–87.

[23] Pires AMB, Santana MHA. Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. *Appl Biochem Biotechnol* , 2010; 1-10,.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

4.1. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados mostram o bom desempenho do bagaço de caju (fermentação em estado sólido) em relação ao suco (fermentação submersa), demonstrando que o pseudo-fruto de caju pode ser totalmente empregado na produção de AH. Portanto, um consórcio entre fermentações sólidas e líquidas poderão ser empregadas para a produção de ácido hialurônico em uma ampla faixa de massas molares, que podem ser aplicados em produtos cosméticos e farmacêuticos.

A presença de ácido ascórbico no suco de caju promove mecanismos oxi-redução que agem na degradação do AH produzido no cultivo em SSF, entretanto nenhuma alteração metabólica foi observada.

A concentração inicial de açúcares (glicose e frutose) influenciou diretamente o metabolismo do *Streptococcus zooepidemicus* principalmente na produção dos ácidos láctico e acético. As concentrações 50 gL⁻¹ no suco (25 mg ISC. g de bagaço húmido⁻¹) parece ser a melhor condição energética na síntese equilibrada dos precursores da AH (ácido UDP-

glicurônico e UDP glicosamine N-acetil). O consumo de glicose e frutose foi paralela ao longo das fermentações, com nenhum comportamento diáuxico. Sendo assim, a disponibilidade de oxigênio relacionada com a concentração de açúcares totais, parece ter um papel importante no metabolismo.

O oxigênio desempenha um papel importante na produção de AH. Partículas menores beneficiam a transferência de oxigênio, devido à maior exposição da água em um filme em torno de sua superfície da partícula. Os desvios metabólicos, $Y_{AH/X}$, são controlados pela disponibilidade de oxigênio uma determinada concentração de açúcares totais. A razão vazão volumétrica de ar/ açúcares entre 0.64-4.76 L/ (g açúcar.min) cria o máximo $Y_{AH/X}$, definindo um mecanismo não-competitivo, demonstrando nenhuma inibição catabólica.

4.2. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

1. Estudos detalhados sobre o papel da umidade no cultivo em estado sólido de *Streptococcus zooepidemicus* na produção de AH;
2. Modelagem matemática do processo de produção de AH em FES levando-se em consideração as alterações metabólicas decorrentes da relação entre oxigênio/massa de açúcares;

3. Estudo da produção do AH em FES sobre suportes inertes tais como espuma de poliuretano tendo em vista a redução dos efeitos de limitação à transferência de oxigênio intrapartícula;
4. Estudos detalhados da transferência de calor e sua significância dentro do processo de produção de AH;
5. Estudar outros suplementos de nitrogênio na produção de AH em FES tendo em vista a melhoria do processo;
6. Estudo do efeito do pH do meio de cultivo e qual o seu impacto na FES.
7. Análise de Fluxos metabólicos levando-se em consideração as alterações metabólicas inerentes à razão R (vazão de ar/massa de açúcares).