



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Influência de Peptonas Vegetais no Cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* para a Produção de Ácido Hialurônico

Autor: Leandro Junqueira Benedini

Orientadora: Prof^a Dra Maria Helena Andrade Santana

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química na Área de Concentração de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos.

Campinas – São Paulo

Março/2012

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

B434i Benedini, Leandro Junqueira
Influência de peptonas vegetais no cultivo de
streptococcus zooepidemicus para a produção de ácido
hialurônico/ Leandro Junqueira Benedini. --Campinas,
SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação. 2. Peptonas. I. Santana, Maria
Helena Andrade. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.
Título.

Título em Inglês: Influence of vegetable peptones in streptococcus zooepidemicus
cultivation for hyaluronic acid production

Palavras-chave em Inglês: Fermentation, Peptones

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

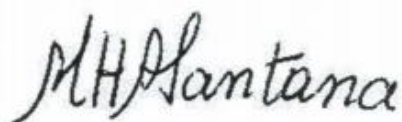
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Lucídio Cristóvão Fardelone, Reinaldo Gaspar Bastos

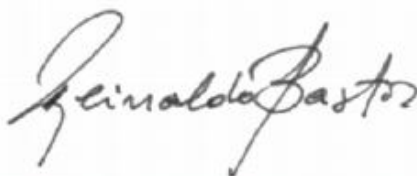
Data da defesa: 23-03-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Leandro Junqueira Benedini e aprovada em 23 de Março de 2012 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dr^a. Maria Helena Andrade Santana



Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos



Dr. Lucídio Cristóvão Fardelone

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de mestrado defendida pelo aluno Leandro Junqueira Benedini, e orientada pela Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana.

A handwritten signature in black ink, reading "MHASantana". The signature is fluid and cursive, with the first letters of the first and last names being capitalized and prominent.

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

Agradecimentos

Aos meus pais e à minha namorada por toda a força.

Aos meus colegas de laboratório André Casimiro, Felipe Ferrari, Fernanda Lopes, Marina Vieira, Aline Pires e Amanda Marcelino, por terem me acompanhado e apoiado durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor Dr. Milton Duffles Capelato (UFSCar) e à mestre Andréa Shimojo, por compartilharem os conhecimentos de química analítica.

Ao técnico Gilson Maia Júnior, por ter me oferecido o suporte necessário para a realização dos experimentos.

À Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana, pela orientação concedida.

Aos membros titulares e suplentes da banca, Prof Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, Dr. Lucídio Cristovão Fardelone, Profa. Dra. Lucimara Gaziola de la Torre e Dr. Ney Ribeiro Leite, pela disponibilidade e atenção.

A Deus.

Resumo

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear com vasta gama de aplicações médicas e farmacêuticas. Por esta razão, é essencial a obtenção do produto com elevado grau de pureza. Atualmente, há grande foco de pesquisa direcionado ao AH produzido por rota microbiana, utilizando extrato de leveduras (EL) como fonte de nitrogênio. Disso resulta uma quantidade relevante de proteínas e peptídeos totais (TPP) remanescentes no meio de cultivo.

Este trabalho visa estudar o efeito da substituição do EL e de fontes de origem animal, por peptonas vegetais no cultivo do *Streptococcus zooepidemicus* para a produção do AH, com finalidades de reduzir a quantidade de TPP nos meios e eliminar possíveis contaminantes. Na primeira etapa deste trabalho, foram realizadas fermentações com peptonas de trigo (PT), de batata (PB), de soja (PS) e uma mistura de peptonas vegetais (MPV). O extrato de leveduras (EL) foi usado como controle. Os melhores resultados foram obtidos em meio suplementado com PS e com PT. Meio composto com a primeira peptona (PS) produziu $0,28 \text{ g.L}^{-1}$ de AH com 1,4 g de TPP por g de AH, enquanto meio suplementado com EL apresentou $0,21 \text{ g.L}^{-1}$ de AH com 4,1 g de TPP por g de AH. Meio composto com a segunda peptona (PT) produziu menor quantidade de AH ($0,05 \text{ g.L}^{-1}$), porém com maior massa molar ($5,06 \cdot 10^6 \text{ Da}$) que a observada em AH proveniente de outras fontes de nitrogênio ($3,2 - 3,7 \times 10^6 \text{ Da}$).

Numa segunda etapa, foram realizadas novas fermentações com finalidade de se realizar um estudo cinético do metabolismo microbiano com as peptonas mais promissoras da etapa anterior (PS e PT). Novamente, meio suplementado com PS apresentou o melhor desempenho para a produção. Enquanto isso, PT apresentou menor desempenho para produção de AH, mas AH com maior massa molar média ($4,76 \times 10^6 \text{ Da}$). Além disso, análises cinéticas demonstraram que quanto maior quantidade de AH produzido, menor a sua massa molar. Estes resultados reforçam os benefícios de utilização PS para produção de grandes quantidades de AH, e os benefícios da utilização de PT para produção de AH com elevado peso molecular médio.

Numa terceira etapa, foi estudado o efeito da substituição dos meios BHI (Brain and Heart Infusion) e sangue de carneiro por PS no preparo de placas utilizadas para adaptação e crescimento celular em etapa inicial da inoculação. Quando somente BHI foi

substituído por PS, e a presença de sangue de carneiro foi mantida, quantidade semelhante de AH foi produzida em relação ao controle. A remoção de sangue de carneiro das placas com a melhor concentração de de quantidade semelhante de AH com maior massa molar média ($3,50 - 3,60 \times 10^6$ Da).

Portanto, foi concluído que PS e PT substituem EL em meio de fermentação, produzindo maior quantidade de AH, e AH com maior massa molar, respectivamente. Além disso, PS se demonstrou efetiva para crescimento e desenvolvimento de células em placas, já que substitui BHI e sangue de carneiro.

Abstract

Hyaluronic acid (HA) is a linear polysaccharide with a wide range of medical and pharmaceutical applications. For this reason, it is essential to obtain a product with high purity. Currently, HA is produced by microbial route, using yeast extract (YE) as nitrogen source. This results in a significant amount of total proteins and peptides (TPP) remaining in the culture medium.

It was studied effects of replacing YE by vegetable peptones in the cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* for HA production, with purposes of reducing the amount of TPP in the media and to remove potential contaminants. In the first step of this work, fermentations were performed during 24 hours in 100 ml of medium with wheat (WP), potato (PP) and soy (SP) peptones and a mixture of vegetable peptones (MPV). The yeast extract (YE) was used as control. The best results were obtained in medium supplemented with SP and WP. The first peptone (SP) produced 0.30 g.L^{-1} of HA with 1.4 g of TPP per g of HA, while medium supplemented with YE produced 0.21 g.L^{-1} of HA with 4.1 g of TPP per g of HA. The second peptone (WP) produced less amount of HA (0.05 g.L^{-1}), but with higher molecular weight ($5.06 \times 10^6 \text{ Da}$) than observed in HA from other sources of nitrogen ($3.2 - 3.7 \times 10^6 \text{ Da}$).

In a second step, fermentation was carried out with 340 ml of medium, during 33 hours, with the purpose of conducting a microbial kinetics study with the most promising peptones of the previous step (SP and WP). Again, SP showed the best performance for production. Meanwhile, WP showed lower performance for HA production, but higher HA average molar mass. These results underscore the benefits of using SP for the production of large amounts of HA and WP utilization for production of HA with high average molecular weight.

In a third step, it was studied the effect of replacing the BHI media ("Brain and Heart Infusion") and sheep blood by SP in the preparation of Petri plates used for adaptation and cell growth in the initial stage of inoculation. When only BHI was replaced by 67 g.L^{-1} SP, and the presence of sheep blood was maintained, 0.27 g.L^{-1} of HA was produced in the fermentation (24 hours, 100 ml medium), against 0.29 g.L^{-1} using 37 g.L^{-1} of BHI and sheep blood. Removal of sheep blood from Petri plates with the best

concentration of SP (67 g.L^{-1}) led to the production of 0.30 g.L^{-1} HA. Furthermore, HA in fermentation from SP plates performed a higher average molar mass (from 3.50 to $3.60 \times 10^6 \text{ Da}$) compared with HA obtained from plates with sheep blood and BHI ($3.09 \times 10^6 \text{ Da}$). These results also demonstrated effectiveness of SP on the growth of *Streptococcus zooepidemicus* on plates.

It was concluded that SP and WP replace YE in fermentation medium, producing higher amount of HA and HA with higher molecular weight, respectively. Furthermore, SP has been shown effective for cell growth and development.

Sumário

Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiii
Abreviações.....	xiv
Apresentação.....	xvii
1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	4
3. Revisão Bibliográfica.....	5
3.1. O Ácido Hialurônico: Estrutura, ocorrência e funções.....	5
3.2. O Ácido Hialurônico em tecidos.....	8
3.3. Aplicações médicas do Ácido Hialurônico.....	10
3.4. A produção de Ácido Hialurônico por <i>Streptococcus</i>	12
3.5. Condições operacionais para a produção do Ácido Hialurônico.....	17
3.5.1. Temperatura.....	17
3.5.2. Agitação e Aeração.....	18
3.5.3. Potencial Hidrogeniônico (pH)	19
3.6. Meios de cultura para produção de Ácido Hialurônico.....	20
3.6.1. As fontes de carbono.....	20
3.6.2. As fontes de nitrogênio.....	21
4. Resultados e Discussão.....	27
4.1. Influências de Peptonas Vegetais sobre a produção microbiana e pureza do AH.....	28
4.2.Efeitos da Peptona de Soja sobre a preparação de placas Petri e produção de AH.....	46

5. Conclusões finais.....	58
6. Sugestões para trabalhos futuros.....	59
7. Referências Bibliográficas.....	60

Lista de Figuras:

Figura 3.1 - Estrutura química do Ácido Hialurônico (Hascall <i>et. al</i> 1997).....	5
Figura 3.2 – (a) Modelo da fita de AH em um domínio tridimensional e (b) Corte transversal da Figura 3.2a (Hascall e Laurent, 1997).....	6
Figura 3.3 - Demonstração das propriedades viscosas e elásticas do ácido hialurônico (Hascall e Laurent, 1997).....	8
Figura 3.4 - Aplicações médicas do AH. OA, osteoartrite; EMR, mucosectomia endoscópica. Adaptado de Asari <i>et. al</i> (2011).....	11
Figura 3.5 - Células de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (gram-positivas) em meio aerado, envolta por cápsulas de ácido hialurônico (Chong <i>et. al</i> 2005).....	14
Figura 3.6 - Via biossintética para a produção de AH por <i>Streptotoccus</i> . Adaptado de Chong <i>et al.</i> (2005).....	15
Figure 4.1 – Kinetic profiles of (a) glucose (b) nitrogen (c) cells (d) HA (e) lactate concentration and (f) HA molecular weight along cultivations of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> in SP (◆) and WP (■) media.....	41
Figure 4.2 – Scheme for replacement of Brain Heart Infusion sheep blood by soy peptone in culture media on preparation of the <i>Streptococcus zooepidemicus</i> inoculum for production of hyaluronic acid.....	50

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 - Concentração de ácido hialurônico em tecidos e fluidos (Torvard <i>et. al</i> , 1992).....	9
--	---

Tabela 3.2 – Quantificação de aminoácidos livres e totais em peptonas de soja (PS), trigo (PT), batata (PB) e em extrato de leveduras (EL).....	25
--	----

Tabela 3.3 – Quantificação de aminoácidos essenciais para a produção de AH em PT, PS, PB e EL.....	26
---	----

Table 1 – Total and free amino acids contents in soy (SP) wheat (WP) and potato (PP) peptones. Data from the manufacturer Organotechnie (France).....	33
--	----

Table 2 - Total nitrogen (TN), total protein and peptides (TPP) and glucose (G) in the vegetable peptones and in the yeast extract in the fermentation media at the starting of the fermentations.....	34
---	----

Table 3 - Performance of the vegetable peptones and yeast extract on the production of HA from <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (ATCC 39920) during 24h fermentation and its purity after three precipitations with ethanol.....	38
---	----

Table 1 - Performance of the fermentations with substitutions of the animal nutrient sources, Brain Heart Infusion and sheep blood, by soy protein in the first seed culture medium <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (ATCC 39920) in Petri plates.....	53
---	----

Abreviações:

ADP	Adenosina difosfato
AH	Ácido Hialurônico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
CoASH	Coenzima A
CO₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DO	Densidade óptica
EL	Extrato de levedura
EMR	Mucosectomia endoscópica
FE	Free essential aminoacids
FFD	Desenvolvimento Fracional Fatorial
G	Glucose
HA	Hyaluronic Acid
HAS	Hialuronato sintase
HASs	HA-sintases
HPLC	High performance liquid chromatography
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
MW	Molar weight
MPV	Mistura de peptonas vegetais

NaCl	Cloreto de sódio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídio oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida
NADPH	NAD Fosfato (forma reduzida
NSP	Peptona de soja neutralizada
OA	Osteoartrite
OD	Optical density
PB	Peptona de batata
Pc	Control Petri plate
pH	Potencial hodrogeniônico
PP	Potato peptone
PPi	Pirofosfato
PS	Peptona de soja
PT	Peptona de trigo
PV's	Peptonas vegetais
P_I	Model 1 Petri plate
P_{II}	Model 2 Petri plate
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SP	Soy peptone
TE	Total essential aminoacids
TKN	Total Kjeldhal nitrogen
TSB	Triptona de soja
TPP	Total proteins and peptides

UDP	Uridina difosfato
UTP	Uridina trifosfato
VPs	Vegetable peptones
WP	Wheat peptone
X_f	Final mass concentration
YE	Yeast extract
Y_{P/S}	Coeficiente de rendimento de HA em relação à glicose
Y_{AH/S}	Coeficiente de rendimento de HA em relação à glicose
Y_{P/X}	Coeficiente de rendimento de HA em relação à massa celular
Y_{Lactate/S}	Coeficiente de rendimento de lactato em relação à glicose
Y_{X/S}	Coeficiente de rendimento de células em relação à glicose

Apresentação

Este trabalho foi redigido na forma de capítulos. Este exemplar é apresentado no seguinte formato:

- Introdução.
- Objetivos.
- Revisão bibliográfica.
- Resultados e discussão.¹
- Conclusões finais.
- Sugestões para trabalhos futuros.
- Referências bibliográficas.

¹ Apresentados na forma de artigos submetidos a periódicos científicos que se referem aos aspectos abordados no desenvolvimento do trabalho.

1. Introdução

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear composto por mais de dez mil unidades de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina, dissacarídeos que formam sua cadeia molecular através das ligações glicosídicas β -1-3 e β -1-4. O AH é um biopolímero viscoso pertencente à família dos mucopolisacarídeos, e está presente em secreções da mucosa, líquido sinovial e articulações. Também está envolvido na migração, proliferação e diferenciação celular, hidratação de tecidos e alteração de suas propriedades físicas (Hascall *et al.*, 1997; Heldin, 2003). A molécula de AH possui vários domínios hidrofílicos, susceptíveis a modificações químicas, e os átomos de hidrogênio compõem a sua face hidrofóbica. Em solução, as suas cadeias organizam-se em fitas que se entrelaçam formando uma rede altamente hidratada, com propriedades viscosas e viscoelásticas (Torvard *et al.*, 1992).

Essas propriedades, somadas à ausência de toxicidade, intensificam a importância do AH nas aplicações médicas, farmacêuticas e de cosméticos. O AH possui um vasto campo de aplicação em toda a sua gama de massas molares. É utilizado principalmente como vicossuplemento no tratamento de doenças das articulações, material viscoso em oftalmologia, cicatrizante, em próteses, como veículo para encapsulação e liberação controlada de bioativos e na construção de membranas e *scaffolds* (Asari *et al.*, 2011).

Para atender a essas demandas, o AH necessita de uma produção sustentável e elevado grau de pureza. Nesse contexto, a obtenção de AH via microbiana apresenta-se muito promissora em relação às fontes convencionais de origem animal, tais como a crista de galo (fonte mais antiga), cordão umbilical, fluido sinovial e humor vítreo bovino (Hascall *et al.*, 1997).

A produção do AH pela rota microbiana utiliza geralmente bactérias do gênero *Streptococcus*, nas quais o AH produzido é extrudado através da sua membrana celular. A cápsula formada protege as células contra as agressões do meio ambiente. Durante os últimos trinta anos, vários estudos analisaram condições nutricionais do meio de cultura favoráveis à produção do AH. Outros trabalhos envolveram engenharia genética, com finalidade de melhorar o rendimento e a qualidade do produto obtido (Kaiser *et al.*, 2005, Glaizer *et al.*, 2007).

Em geral, no cultivo de *Streptococcus zooepidemicus*, glicose é usada como fonte de carbono, e extrato de leveduras (EL) como fonte de nitrogênio. Entretanto, na purificação do caldo fermentativo, realizado por precipitação com etanol, uma fração expressiva de TPP pertencentes ao EL permanece associada ao AH, demandando etapas adicionais de purificação. Por outro lado, o meio BHI (Brain Heart Infusion) e sangue de carneiro compõem meios sólidos recomendados pela ATCC para a confecção de placas Petri utilizadas na primeira etapa de preparação do inóculo, e a utilização destas fontes pode transferir contaminações animais ao meio de fermentação. Atualmente, é crescente a demanda de compostos de alta pureza nas aplicações médicas, farmacêuticas e de cosméticos. Por isso, a redução do teor de TPP e a remoção de compostos de origem animal usados no inóculo diminuiriam o risco de reações imunogênicas e efeitos colaterais causados por AH impuro.

Nesse sentido, deverá ser estudada a eficiência da substituição do EL, BHI e sangue de carneiro por peptonas de origem vegetal (PVs) com teor significativo de aminoácidos essenciais sobre a preparação de placas Petri e cultivo do microorganismo, atendendo aos requisitos das aplicações anteriormente citadas. Peptonas são peptídios, de massa molar inferior aos classificados como polipeptídios, obtidas da hidrólise de proteínas. Possuem cerca de vinte e um tipos diferentes de α -aminoácidos, fator que contribui para sua ação nutricional. Apesar de serem consideradas fontes secundárias de nitrogênio, muitas vezes são responsáveis por maior crescimento microbiano e produção de metabólitos. Em relação à purificação por precipitação, as PVs deverão contribuir para reduzir o teor de TPP associados ao AH. Em relação à etapa inicial de preparo de inóculos (placas Petri), as PVs deverão contribuir para adaptação dos microorganismos em meios vegetais, sem riscos de serem propagadas contaminações animais para as fermentações.

A literatura não é vasta quanto à descrição de cultivos microbianos na presença de PVs. Em 2009, Izawa demonstrou benefícios da utilização de peptona de soja no crescimento de *Streptococcus*, produzindo $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de AH na concentração ótima. Outros gêneros de microorganismos, tais como *Oenococcus*, *Mycroplasmas*, *Lactobacillus* e *Bacillu*, também apresentaram altas taxas de crescimento quando cultivados em meios com concentração significativa desta mesma peptona.

Neste trabalho, estudou-se a substituição do EL utilizado em fermentações por PVs, especificamente as peptonas de batata (PB), soja (PS), trigo (PT), e uma mistura de várias PVs (MPV). Adicionalmente, estudou-se também a performance cinética de peptonas com melhor performance na primeira etapa (PS e PT), com finalidade de designar tempos ótimos de fermentação. Além disso, estudou-se também a substituição do meio BHI e do sangue de carneiro no início da preparação do inóculo.

No texto desta dissertação de mestrado, serão apresentados a metodologia, os resultados e discussão referentes às substituições mencionadas, as quais foram caracterizadas com relação à concentração celular, produção do AH, massa molar média de AH, consumo de nitrogênio, produção de metabólitos secundários e teor de TPP no AH precipitado com etanol.

2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo a substituição do extrato de leveduras, do meio BHI e sangue de carneiro por peptonas vegetais, visando a eliminação de compostos de origem animal e redução do teor de proteínas e peptídeos nos meios de cultivo do *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, para a produção do AH com maior grau de pureza.

Para atingir esse objetivo, o trabalho foi dividido em três etapas:

1. Triagem de PVs, dentre PB, PS, PT e MPV.
2. Realização de cinética de fermentação para PS e PT.
3. Substituição em placas Petri do meio BHI e sangue de carneiro pela PV de melhor produção na etapa 1. Utilização desta mesma PV no meio de inóculo e fermentação.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. O Ácido Hialurônico: Estrutura, ocorrência e funções

O Ácido Hialurônico (AH) é um polissacarídeo natural que possui alta massa molar. É formado por várias unidades de dissacarídeos que, unidas através de ligações glicosídicas β -1-3 e β -1-4, formam sua cadeia molecular, cuja massa molar varia entre 10^3 a 10^7 Da. (Hascall *et al.*, 1997; Heldin, 2003). A Figura 3.1 apresenta a estrutura molecular do AH.

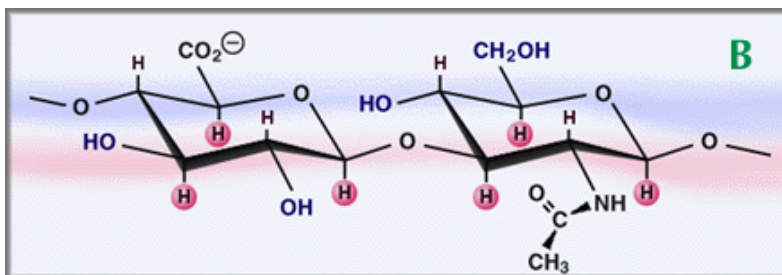


Figura 3.1 - Estrutura química do Ácido Hialurônico (Hascall *et. al* 1997).

Devido à configuração β dos açúcares, a estrutura do dissacarídeo é energeticamente estável, visto que os grupos hidroxila, a porção carboxilada e o carbono anomérico do açúcar adjacente estão em posições equatoriais estericamente favoráveis enquanto os átomos de hidrogênio ocupam posições axiais menos favoráveis estericamente (Hascall e Laurent, 1997).

O AH pertence a um grupo de polissacarídeos similares denominados “polissacarídeos do tecido conjuntivo”, “mucopolissacarídeos” ou “glicosaminoglicanos”. Dentre esses polissacarídeos estão incluídos condroitina sulfato, dermatana sulfato e heparina (Lapcik Jr. *et al.*, 1998). O AH é estruturalmente o mais simples do grupo, sendo o único não covalentemente associado a um núcleo protéico e o único não sulfatado.

AH é encontrado na matriz extracelular de diversos tecidos biológicos de mamíferos e animais inferiores. Em humanos, é sintetizado na membrana plasmática, através de adição de açúcar à parte polimérica redutora.

Em soluções diluídas, sob condições fisiológicas, AH assume uma estrutura enovelada randômica semi-flexível, ocupando grande domínio hidrodinâmico com uma baixa densidade de segmentos de cadeia, conforme demonstrado na Figura 3.2 a. Esse comportamento resulta da alta massa molar da molécula, da rigidez local decorrente do

tamanho das unidades monoméricas (anéis de açúcares), do impedimento de rotação das ligações glicosídicas e das pontes de hidrogênio dinamicamente formadas e quebradas entre os resíduos (Day e Sheehan, 2001).

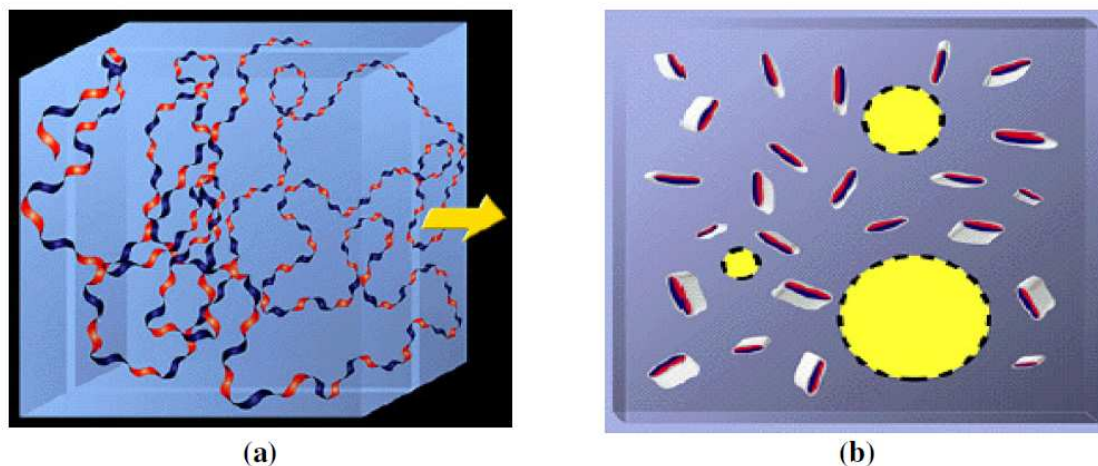


Figura 3.2 – (a) Modelo da fita de AH em um domínio tridimensional e (b) Corte transversal da Figura 3.2a (Hascall e Laurent, 1997).

O cubo azul claro demonstrado na Figura 3.2a representa o domínio da molécula de AH em solução. O formato helicoidal assumido se deve à estabilização de pontes de hidrogênio paralelas ao plano da corrente, o que explica a alta capacidade de retenção de água, que é imobilizada fisicamente dentro das estruturas em vez de possuir ligações químicas com o polissacarídeo. Em solução, esta estrutura espiral é expandida, com raio de giro de aproximadamente 200 nm. (Torvard *et al.*, 1992)

As cores azul e vermelha alternadas representam a estrutura da fita com faces hidrofílicas (azuis) e hidrofóbicas (vermelha). A estrutura do domínio de AH tem importantes características: moléculas menores como a água, eletrólitos e nutrientes podem difundir livremente através do solvente dentro do domínio. Entretanto, moléculas maiores como proteínas são parcialmente excluídas devido a seu tamanho hidrodinâmico em solução. Isso ocorre porque o constante movimento nas cadeias do AH faz com que haja variação no tamanho dos poros de difusão, com menor probabilidade de existência de menores poros (Hascall *et al.*, 1997).

No corte transversal apresentado na Figura 3.2 b, observa-se porções da molécula de AH (regiões azuis e vermelhas) e as áreas de diferentes tamanhos disponíveis para difusão de moléculas dentro do domínio, representadas pelos círculos amarelos tracejados. As cadeias de AH estão em constante movimento em solução, gerando contínua alteração no tamanho dos “poros” na rede (Hascall e Laurent, 1997).

Átomos axiais de hidrogênio formam uma face não polar e hidrofóbica, enquanto a parte equatorial da cadeia se torna mais polar e hidrofílica. O resultado disso é a formação de uma estrutura contorcida que ocupa um amplo domínio.

Além das pontes de hidrogênio entre os açúcares adjacentes e as interações eletrostáticas entre os grupos carboxílicos, Scott *et al.* (1991) observaram regiões hidrofóbicas de aproximadamente 8 grupos CH em lados alternados da hélice de AH. Simulações computacionais 10 e cálculos de energia confirmaram que hélices de AH em solução podem ser energeticamente e estericamente capazes de formação dupla entre duas cadeias de AH por meio de interações entre as regiões hidrofóbicas da cadeia. As regiões hidrofóbicas são responsáveis não somente pela estabilização da formação dupla, mas também base da formação da rede e agregação lateral de cadeias de AH (Lapcik Jr. *et al.*, 1998).

Em soluções semi-diluídas ou concentradas, os domínios hidrodinâmicos das cadeias de AH se sobrepõem. Essa sobreposição pode ocorrer a baixas concentrações. Segundo Fouissac *et al.* (1993), cadeias de AH com massa molar de 3×10^6 Da, por exemplo, começam a se sobrepor mesmo a baixas concentrações de $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$. As cadeias se acomodam reduzindo o tamanho do domínio e o movimento dos segmentos moleculares torna-se mais restritos, formando uma rede emaranhada de cadeias.

Consequentemente, esse sistema molecular compacto apresenta propriedades viscosas e elásticas significantes, que dependem da estrutura primária e comprimento da cadeia molecular, sua conformação e concentração. Propriedades elásticas são observadas quando o sistema pode resistir a um fluxo de fluido rápido de curta duração, distribuindo cargas e forças de cisalhamento dentro da rede. Por outro lado, fluxos de fluido lento e de maior duração podem separar parcialmente e alinhar as moléculas, permitindo seu movimento e exibindo propriedades viscosas (Hascall e Laurent, 1997). As propriedades viscosas e elásticas de soluções de AH são demonstradas na Figura 3.3.

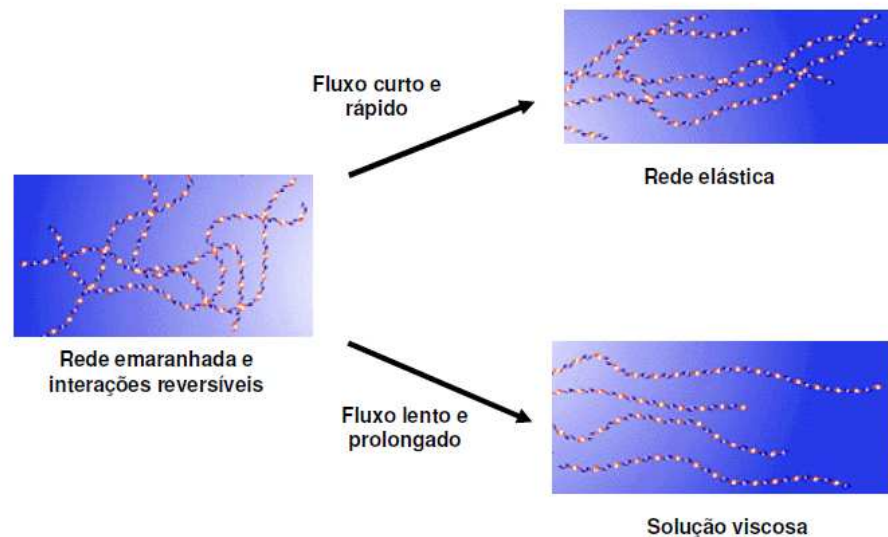


Figura 3.3 - Demonstração das propriedades viscosas e elásticas do ácido hialurônico (Hascall e Laurent, 1997).

3.2. O Ácido Hialurônico em tecidos

A concentração de AH é elevada em muitos tecidos, como em tecidos conectivos, responsáveis pela sustentação corporal, transporte e defesa; em vítreo do olho humano, que possui 0.1-04 mg/g de peso seco de AH; em fluido do conjunto sinovial, com cerca de 3-4 mg/ml; nas matrizes celulares pertencentes ao oócito, com cerca de 0.5 mg/ml; ou em matrizes patológicas que ocluem a artéria durante a reestenose coronária (Hascall *et al.*, 1997).

Porém, a maior quantidade de AH reside na pele, totalizando uma massa média de 7-8 g/adulto, metade da quantidade total encontrada em todo o corpo. Neste caso, AH está presente tanto na derme quanto na epiderme, com concentrações de 0.5 e 0.1 mg/g de tecido seco, respectivamente. A concentração de AH em volta das células da epiderme (cerca de 2-4 mg/ml) é uma ordem de magnitude mais alta que na derme (cerca de 0.5 mg/ml). A matriz que há em volta dos queratinócitos, células diferenciadas do tecido epitelial, possui concentração de AH tão alta quanto a presente no cordão umbilical, que é cerca de 4 mg/ml (Hascall *et al.*, 1997).

Em outros casos, quando presente em menor quantidade, o AH também age como elemento chave sobre a estrutura tecidual. Há presença de pouca quantidade de AH (1 mg/g em peso seco) em cartilagens hialinas, onde é necessário para preencher espaços vazios do tecido e reter as moléculas no interior de sua matriz polimérica através de interações específicas, e em matrizes de tecidos que envolvem células musculares da aorta e fibroblastos (Hascall *et al.*, 1997).

A Tabela 3.1 apresenta os tecidos humanos e animais com maiores concentrações de AH.

Tabela 3.1- Concentração de ácido hialurônico em tecidos e fluidos (Torvard *et al.*, 1992).

Tecido ou fluido	Concentração (mg/L)
Crista de galo	7500
Cordão umbilical humano	4100
Fluido sinovial humano	1420-3600
Cartilagem nasal bovina	1200
Humor vítreo	140-338
Pele humana	200
Cérebro de coelho	65
Músculo de coelho	27
Linha torácica humana	8.5-1.8
Urina humana	0.1-0.5
Soro humano	0.01-0.1

Nos tecidos citados, AH é responsável por diferentes funções:

Na pele, exerce escoamento dos radicais livres gerados pelos raios ultravioleta da luz solar que causa stress oxidativo nas células, podendo danificar seu material genético causando degeneração e morte.

Em cartilagens, apesar de sua baixa concentração, funciona como importante elemento estrutural da matriz, formando um centro de agregação para um proteoglicano condroitina sulfato que mantém sua estrutura macromolecular na matriz devido a interações específicas AH-proteína (Prehm, 2000)

No fluido sinovial, altas concentrações de AH de alta massa molar fornece lubrificação necessária para as articulações, atuando como amortecedor de choques, reduzindo fricção no movimento dos ossos e diminuindo o desgaste das articulações. Sob condições inflamatórias de doenças como osteoartrite ou artrite reumatóide, AH de alta massa molar é degradado por espécies reativas de oxigênio, reduzindo sua viscosidade e impedindo suas propriedades lubrificantes e absorvedoras de choques, conduzindo ao movimento deteriorado das articulações e dor.

Embora inicialmente pensava-se que a maior função de AH era servir como um preenchimento molecular inerte do tecido conjuntivo, identificação subsequente e estudo de AH ligado a proteínas e receptores específicos revelaram que AH exerce muitas outras atividades funcionais (Tammi *et al.*, 2002). Reconhece-se agora que AH exerce importantes funções na embriogênese, tradução de sinal e mobilidade celular, estando associado ainda ao câncer e metástase (Kogan *et al.*, 2007).

Industrialmente, AH já foi produzido por extração de cristas de galo, gerando uma substância de alta pureza. No entanto, os processos de extração e purificação do produto consomem muito tempo e são exaustivos, pois no tecido animal o AH é complexado com proteoglicanos, o que aumenta a possibilidade de ser contaminado por enzimas que degradam a sua estrutura. (Weigel, 2011).

3.3. Aplicações médicas do Ácido Hialurônico

As aplicações médicas do AH podem estar relacionadas às suas propriedades físico-químicas, funções biológicas, ou, em algumas situações, ambos os casos (Asari *et al.*, 2011). Na Figura 3.4 torna-se claro esta argumentação:

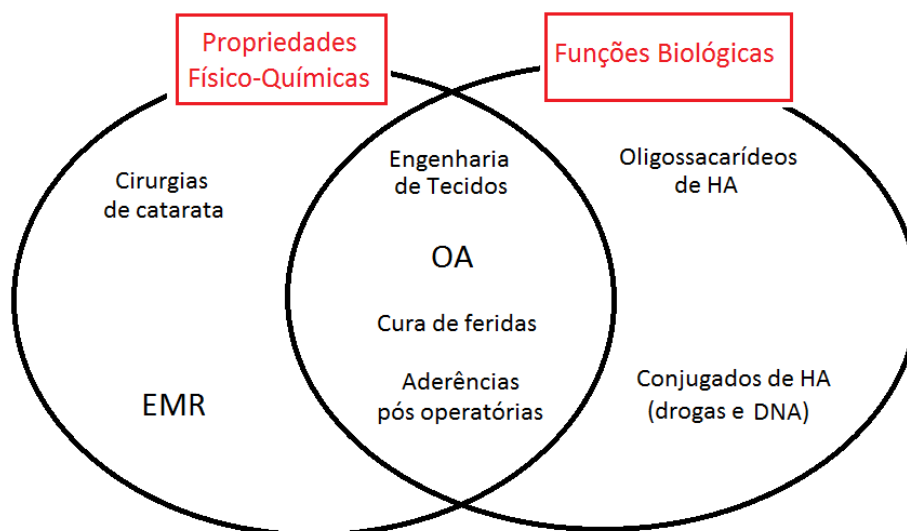


Figura 3.4 - Aplicações médicas do AH. OA, osteoartrite; EMR, mucosectomia endoscópica. Adaptado de Asari *et al.* (2011).

Aplicações das propriedades físico-químicas são observadas em suplementação vítrea durante cirurgias oculares (Hascall *et al.*, 1997). Atualmente, dois tipos de AH são utilizados em cirurgias contra cataratas, com finalidades de proteção da camada endotelial da córnea contra danos. O primeiro tipo, com maior peso molecular, tem alta viscoelasticidade, e é usado para manter maior espaço operacional. O segundo, com estrutura mais dispersa, é usado para proteger a camada endotelial (Asari *et al.*, 2011).

A mucosectomia endoscópica também explora propriedades físico-químicas do AH. Trata-se de um método pouco invasivo de tratamento para lesões em membranas mucosas. Neste caso, AH é utilizado para substituir soluções salinas ou igualmente viscosas, como destrose ou glicerol.

Um exemplo de aproveitamento das funções biológicas é o efeito causado por AH em tumores. De acordo com Asari, 2011, AH ligado a certas proteínas inibe crescimento *in vivo* de células cancerígenas, além de estimular a produção de fosfatase, principal inibidor da produção de fosfoinositídeo 3-quinase (PI3-Quinase), essencial para o crescimento de células de tumor. Outro exemplo são os conjugados de AH, com interesse no desenvolvimento de drogas, no que se aplica a encapsulação e liberação controlada de compostos bioativos *in vivo*. Por exemplo, superóxido dismutase provenientes de eritrócitos

bovinos podem ser conjugados ao AH com o objetivo de gerar atividade anti-inflamatória *in-vivo* (Asari *et al.*, 2011).

Um exemplo relacionado tanto à exploração das propriedades físico-químicas e biológicas do AH é o tratamento de osteoartrites. Neste caso, o AH suprime a degeneração da cartilagem, além de reduzir a liberação de proteoglicanos da matriz extracelular pertencente a tecidos cartilagosos. Isso faz com que a superfície articular seja protegida através da normalização das propriedades do fluido sinovial e redução de percepção de dor. Outro exemplo é a engenharia de tecidos, em que AH contribui para a morfogênese e está relacionado à organização de tecidos e cura de feridas. Neste caso, utilização de AH incentiva a produção de condrócitos, células responsáveis pela produção de colágenos, que possui importância fundamental na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo (Asari *et al.*, 2011).

3.4. A produção de Ácido Hialurônico por *Streptococcus*

Bactérias do gênero *Streptococcus* são micro-organismos gram-positivos e anaeróbicos, cujas classificações são realizadas por sua capacidade hemolítica e pela antigenicidade dos carboidratos presentes em suas paredes celulares (Kaiser *et al.*, 2005). Possuem formato esférico e geram ATP através da conversão de glicose em duas moléculas de ácido láctico. No entanto, diferente das bactérias do gênero *Leuconostoc* e *Pediococcus*, este gênero não possui relação próxima ao gênero *Lactobacillus*. (Glaiser e Nikaldo, 2007).

Em relação à sua atuação patogênica, é destacada a bactéria *Streptococcus pneumoniae*, facilmente identificada por análises bioquímicas e fenotípicas. (Montes e Arenzana, 2006). *Streptococcus* podem ser encontrados no corpo de homens ou animais como comensais ou parasitas (Singleton e Sainsbury, 2006). Os *Streptococcus* b-hemolíticos do grupo A causam infecções naturais no trato respiratório e infecções invasivas na pele e tecido subcutâneo. Dependendo da defesa imunológica ou disposição genética do indivíduo, este fator pode causar febre ou infecções severas. Algumas bactérias do gênero *Streptococcus* possuem resistência a penicilina. Diagnósticos laboratoriais possibilitam a detecção deste agente patogênico, caso o material apropriado seja utilizado (Kaiser *et. al.* 2005).

Em relação à sua presença na indústria de alimentos, *Streptococcus cremoris* é o principal organismo utilizado para a manufatura de queijos do tipo Gouda, cheddar e Camembert. Também são bastante utilizados para a produção de leites fermentados (Glaiser e Nikaldo, 2007). Em adição aos microorganismos *Lactobacillus*, *Streptococcus* são responsáveis por uma produção anual de derivados que excede 20 milhões de toneladas, relativos a um valor de mercado de cerca de 50 bilhões de dólares (Glaiser e Nikaldo, 2007).

O gênero *Streptococcus* está relacionado a um grupo muito numeroso e heterogêneo de bactérias. Todas elas se encontram distribuídas em mais de quarenta espécies organizadas em três grupos principais, os quais se baseiam no estudo de seu RNA. São eles: O grupo piogênico, o grupo oral e as “demais espécies” (Singleton e Sainsbury; Montes e Arenzana, 2006).

O grupo piogênico contém espécies associadas a infecções piogênicas em homens e outros animais. São exemplos deste grupo bactérias como *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equi* e *S. pyogenes*. O grupo oral contém espécies que são isoladas da cavidade bucal, também associadas à piogenia e outras infecções encontradas em vários locais do corpo, incluindo a boca, coração, juntas, pele, músculo e sistema nervoso central. As espécies deste grupo incluem *S. anginosus*, *S. mutans*, *S. oralis* e *S. salivarius*. Dentre as “demais espécies” é possível se destacar *S. acidominimus*, *S. bovis*, *S. equinus* e *S. Suis*, encontrados em animais domésticos (Singleton e Sainsbury, 2006).

Uma característica em comum observada em *Streptococcus* é a produção de AH como forma de proteção celular. O AH é extrudado para o meio externo através da sua membrana celular, gerando uma cápsula que é produzida na face interna da membrana plasmática como um polímero linear livre, cujas enzimas responsáveis por sua produção são conhecidas como AH sintases, pertencentes ao grupo das glicosiltransferases. A produção desta cápsula, representada na Figura 3.5, faz com os *Streptococcus* se ocultem do sistema imunológico, já que é freqüente a presença de AH em tecidos animais.

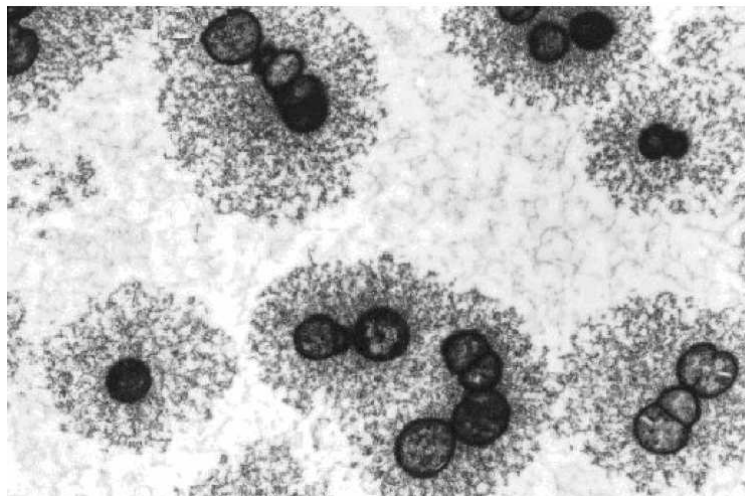


Figura 3.5 - Células de *Streptococcus zooepidemicus* (gram-positivas) em meio aerado, envoltas por cápsulas de ácido hialurônico (Chong *et. al* 2005).

Devido à demanda de utilização de AH com alto grau de pureza para fins biológicos, a pesquisa foi direcionada para a obtenção de AH por via microbiana, que pode ser encontrada em bactérias *Streptococcus equistimilis* (patógeno de animais), *Streptococcus pyogenes* (patógeno humano), *Streptococcus uberis* (patógeno bovino) e *Streptococcus zooepidemicus* (patógeno equino). A via biossintética para produção de AH é apresentada na Figura 3.6.

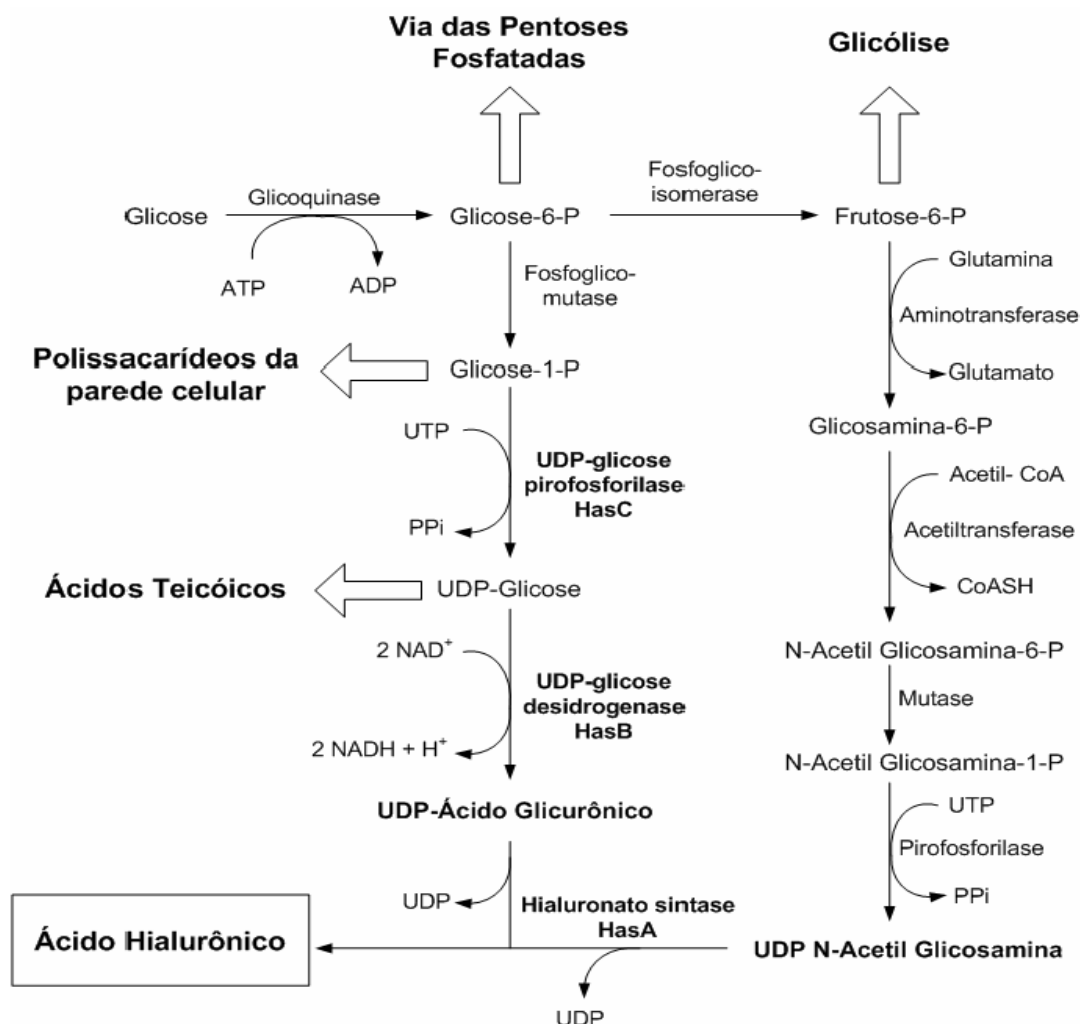


Figura 3.6 - Via biossintética para a produção de AH por *Streptotoccus*. Adaptado de Chong *et al.* (2005).

As porções de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina que constituem a molécula de AH são derivadas de glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, respectivamente, e são polimerizados pela enzima AH sintase. A primeira reação na via a partir de glicose-6-fosfato é um passo comum na produção de polissacarídeos de estocagem em muitos organismos. A enzima α -fosfoglicomutase converte glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato em uma reação reversível. UDP-glicose pirofosforilase catalisa a reação de UTP e glicose-1-fosfato para produzir o açúcar nucleotídeo UDP-glicose. Ácido UDP-glicurônico é obtido por oxidação específica do grupo álcool primário de UDP-glicose pela ação de UDP-glicose desidrogenase.

A via originada da frutose-6-fosfato está envolvida na produção de aminoaçúcares. A transferência do grupo amino da glutamina para a frutose-6-fosfato por uma aminotransferase produz glicosamina-6-fosfato. A transferência do grupo acetil por uma acetiltransferase forma N-acetil glicosamina-6-fosfato. Essa é uma etapa que consome energia, uma vez que a hidrólise da ligação tioéster na molécula de acetil-coA libera energia equivalente à hidrólise de ATP. Rearranjo do grupo fosfato por uma mutase gera 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 nessas reações gera 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 e 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 estruturais da parede celular bacteriana 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 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. Porém, essa relação negativa ocorre somente quando a inibição do crescimento não está associada com assimilação reduzida de glicose. Quando as condições tornam-se severas suficientes para inibir o consumo de glicose, primeiro a produtividade e, em seguida, a massa molar diminuem. Esse comportamento indica que a produção de AH compete por fontes limitadas com a síntese de massa celular.

Devido à demanda de quantidade significativa de energia para produção de AH, o que inibe a síntese da parede celular e crescimento. (Weigel, 2011), nos últimos trinta anos

vários estudos analisaram as condições nutricionais e de cultivo sobre a produção de AH. E, além da engenharia metabólica, também existem trabalhos que envolvem a engenharia genética, com a finalidade de melhorar o rendimento e a qualidade de obtenção do produto (Pires, 2009).

Para o caso do microorganismo *Streptococcus*, a produção de AH está inversamente relacionada com a taxa de crescimento bacteriana. Por causa disso, o estudo detalhado das condições nutricionais de cultivo é importante. Os meios devem conter fontes de carbono e nitrogênio. A coordenação dos fluxos de carbono ou nitrogênio pode ser regulada ao nível de assimilação ou do metabolismo, dependendo das condições de crescimento e da natureza das fontes. Além destas vias de regulação, existem outras de sinalização e sensoriamento de nutrientes. (Batistote, 2006).

3.5. Condições operacionais para a produção do Ácido Hialurônico

Bactérias do gênero *Streptococcus* possuem condições ótimas para crescimento, tais como temperatura, pH, agitação e aeração. A seguir, serão apresentados alguns estudos que envolvem este assunto.

3.5.1. Temperatura

A temperatura é um dos principais fatores operacionais que influem sobre o crescimento de microorganismos. Em 1996, Kim *et al* encontraram temperatura ótima de 37 °C para crescimento e produção de AH por um mutante de *Streptococcus equi*. Em temperaturas inferiores a 37 °C, foi observada redução na massa molar do AH produzido.

Em 1997, Armstrong e Johns observaram maiores rendimentos e massas molares de AH no intervalo de temperatura entre 32 °C e 35 °C. Os autores observaram maior velocidade específica de crescimento a 40 °C. Os autores sugerem que este efeito está relacionado à redução da velocidade específica de crescimento com a diminuição da temperatura e à competição por fontes de substrato e energia entre as vias catabólicas, anabólicas e de síntese de AH que existe durante a fase exponencial de crescimento.

3.5.2. Agitação e Aeração

Os *Streptococcus* são bactérias aero tolerantes. Em outras palavras, possuem condições de reprodução em meios aerados. Este fenômeno ocorre devido à presença da enzima superóxido dismutase, que atenua o efeito de radicais superóxidos. Alguns organismos bacterianos também são protegidos pelo oxigênio de danos externos, através de NADH oxidases, as quais reduzem o oxigênio molecular a água (Chong e Nielsen, 2003). Em presença de oxigênio, bactérias do gênero *Streptococcus* crescem mais rapidamente e, além disso, produzem AH com maior massa molar, ao se comparar com o cultivo anaeróbio (Chong e Nielsen, 2003).

Condições de fermentação aeróbias e anaeróbias são relatadas na literatura para a produção do AH por *Streptococcus*. Sob condições anaeróbias, o rendimento de AH varia na faixa de 0,3 a 1 g/L (Thonard *et al.*, 1964). O AH obtido nessas condições geralmente possui massa molar média menor. Sob condições aeróbias, um produto com maior massa molar pode ser obtido com rendimento equivalente (Akasaka *et al.*, 1989). Em relação à atuação do oxigênio na produção, sugere-se que o AH funcione como uma proteção impermeável do *Streptococcus* contra efeitos tóxicos do oxigênio. Então, condições aeróbias estimulariam a produção de AH por um mecanismo protetor das células.

Em 1988, (Hoeven e Gotschal, 1989) realizou um estudo metabólico com bactérias de *Streptococcus* presentes em via oral e bactérias do gênero *Actinomyces*. Neste caso, foram realizadas condições de limitação de oxigênio e glicose em culturas misturadas destas duas bactérias, e observou-se crescimento praticamente linear relacionado ao aumento de oxigênio (Hoeven e Gotschal, 1989).

Chong & Nielsen (2003), relatam que a aeração aumenta a concentração de AH produzido por *Streptococcus zooepidemicus*. A NADH oxidase utiliza o oxigênio para reoxidar a NADH e formar acetato, lactato e etanol. Sob condições aeróbias, há uma maior taxa de crescimento e consumo de glicose, isso faz com que a produção de etanol decresça e a de acetato aumente. A redução da taxa de crescimento permite a maior produção de AH. O aumento do rendimento global de AH foi obtido através do controle de oxigênio disponível para o metabolismo do *S. Zooepidemicus*.

Em 2007, Casimiro estudou a produção de AH utilizando suco de caju como substrato em processos de fermentação submersa e bagaço de caju como substrato/suporte

em cultivo no estado sólido. Em ambos os casos, o inóculo foi preparado com cepa de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, cultivado em suco de caju in natura enriquecido com EL. Os resultados mostraram que em ambos os processos a aeração é fundamental para o crescimento celular e produção de AH. Não houve diferenças expressivas nos parâmetros do processo para a fermentação submersa conduzida com suco de caju in natura ou clarificado. A máxima concentração de AH obtida no cultivo no estado sólido foi de 0,007 g/g de bagaço e na fermentação submersa 2,61 g/L. As distribuições de massa molar mostram que o AH produzido no cultivo no estado sólido encontra-se nas faixas de 104 e 105 Da, enquanto que para a fermentação submersa prioritariamente é produzido AH na faixa de 103 e 104 Da.

Em relação à agitação, tudo o que já se sabe é que existe a necessidade de agitação vigorosa para melhorar a transferência de massa dentro do meio de fermentação, mesmo havendo a possibilidade de que a tensão mecânica acarrete danos à cadeia polimérica. Segundo Armstrong e Johns (1997), a massa molar de AH produzido por *Streptococcus zooepidemicus* não foi afetada pela agitação no fermentador. Isso demonstra que as moléculas de AH são resistentes a forças cisalhantes.

3.5.3. Potencial Hidrogeniônico (pH)

Quanto ao efeito do pH no cultivo de streptococci, Akasaka *et al.* (1988) demonstraram que pH 7,4 resulta em AH de maior viscosidade comparado a pH 6,0 e 7,9. Os efeitos do pH, agitação e aeração sobre a produção de AH por *Streptococcus zooepidemicus* foram estudados por Johns *et al.* (1994). Essas variáveis tiveram grande influência na produção de AH em cultivo em batelada, sendo que o pH ótimo foi $6,7 \pm 0,2$ (Pires, 2009).

A influência do pH do meio nas propriedades de massa molar de AH produzido por *Streptococcus zooepidemicus* foi avaliada por Armstrong e Johns (1997). Embora o pH exerça uma influência considerável na taxa de produção e rendimento do biopolímero, foi observada pouca influência na massa molar do AH produzido (Pires, 2009).

Em 2009, Pires realizou controle do pH ao longo do cultivo com 25 g.L^{-1} de glicose resultou em maior produtividade de células ($0,21 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e de AH ($0,10 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). A combinação desses resultados relaciona o maior direcionamento da fonte de carbono para

AH do que para células a uma resposta do microrganismo ao stress ácido ocorrido no cultivo sem controle do pH. Uma análise da distribuição dos fluxos metabólicos nas condições ambientais estudadas demonstrou que as alterações na via de produção de AH foram mais relacionadas à distribuição dos fluxos para os açúcares precursores da síntese do polímero que à disponibilidade de energia (ATP) ou potencial redutor (NADH/NAD⁺) das células.

3.6. Meios de cultura para produção de Ácido Hialurônico

As bactérias do gênero *Streptococcus* apresentam alta demanda nutricional para que haja crescimento. Isso faz com que o cultivo destes microorganismos ocorra em ambientes ricos em fontes de carbono e nitrogênio (Pires, 2009). Como fonte de carbono, é comumente empregado glicose. Enquanto isso, nutrientes como extrato de leveduras, extrato animal, peptonas de diversos tipos e soro são responsáveis por suprir a demanda de fontes de nitrogênio orgânica relacionada a este microorganismo. É muito importante que o meio de cultura responsável pelo crescimento bacteriano seja definido com detalhes (Pires, 2009), de forma que os requisitos nutricionais para esta cultura possam ser reproduzidos fielmente em escala industrial.

A seguir, serão descritos com mais detalhes a atuação de cada fonte nutricional sobre bactérias do gênero *Streptococcus*.

3.6.1. As fontes de carbono

A fonte de carbono é a variável nutricional mais estudada em trabalhos que avaliam o crescimento celular de microorganismos. Trata-se da principal fonte de energia responsável pela manutenção do metabolismo celular.

Em 1997, Armstrong e Johns estudaram o efeito de cinco tipos de meios de cultura diferentes sobre as propriedades de peso molecular do AH produzido por *Streptococcus zooepidemicus*. Nesta situação, foram realizados cultivos em batelada com meios que continham extrato de leveduras e glicose. Variações na agitação do meio (300 a 1000 rpm) e no pH (pH 6.3 a 8.0) não demonstraram grande influência sobre o massa molar e polidispersão do ácido hialurônico. No entanto, o aumento da concentração inicial de

glicose apresentou mudanças significativas no ácido hialurônico produzido, com maiores polidispersão e massa molar.

De acordo com (Chong e Nielsen, 2003), a quantidade de ATP referente ao catabolismo dos *Streptococcus* pode ser aumentada através de limitações de fontes de carbono. No entanto, a limitação de quantidade de glicose no meio possui alguns efeitos indesejáveis, como a redução do peso molecular de AH produzido devido a pouco suprimento de açúcar.

Mais recentemente, Scott *et al.* (2009) investigaram o efeito da razão carbono:nitrogênio (C/N) na produção microbiana de AH e, para maximizar a capacidade de síntese de AH, encontraram um meio balanceado com razão ótima de 2:1 quando o cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 é realizado com controle do pH.

Ainda em 2009, Pires estudou a otimização da produção de AH por cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* em batelada, com base nas alterações metabólicas. Foram estudadas a concentração inicial de glicose. Em cultivo realizado em biorreator sem o controle do pH, o crescimento celular e a produção de AH foram fortemente dependentes da concentração inicial de glicose, com maior produção de AH ($1,21 \text{ g.L}^{-1}$) no cultivo realizado em meio com 25 g.L^{-1} glicose. Tal condição nutricional foi a única que apresentou maior conversão de glicose em AH ($Y_{AH/S}$) do que conversão de glicose em massa celular ($Y_{X/S}$).

3.6.2. As fontes de nitrogênio

Apesar da importância de fontes de carbono orgânicas para crescimento de células, *Streptococcus* também possuem como necessidade nutricional o nitrogênio orgânico, elemento essencial à vida que pode ser encontrado em quase todas as moléculas orgânicas presentes em organismos vivos. Dentre a ampla variedade de compostos nitrogenados que podem ser utilizados como fontes nutricionais, destacam-se o íon amônio, os hidrolisados de caseína, os aminoácidos, as peptonas e o extrato de leveduras (Batistote, 2006; Pires, 2009).

A utilização de fontes de nitrogênio vegetais é uma alternativa que começa a ser estudada, já que diminui o risco de contaminação no AH. Alguns estudos demonstram a

possibilidade de utilização de peptonas vegetais como fontes de nitrogênio. As principais são peptonas de batata, trigo, pera, ervilha e soja.

Em 2001, Heenan estudou a influência dos meios de cultura para cinco microorganismos diferentes (*Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei ssp. Paracasei*, *Bifidobacterium lactis*, *L. Acidophilus*, *Gist Brocades*). Na maioria deles, observou-se que fontes de nitrogênio com maior concentração de peptona de soja acarretavam uma maior taxa de crescimento de microorganismos.

Em 2004, Junguo et al. observou os efeitos metabólicos de várias fontes de nitrogênio sobre a produção de Nattokinase por *Bacillus natto*, através da utilização de Desenvolvimento Fracional Fatorial (FFD). Os melhores nutrientes foram peptona de soja, extrato de leveduras e clorido de cálcio.

Ainda em 2006, Le Marrec investigou a resistência de *Oenococcus oeni* à variação osmótica do meio causada por componentes orgânicos e iônicos. Verificou-se uma maior taxa de crescimento em situações onde peptonas vegetais foram adicionadas, o que prova que a adição de peptonas causou proteção osmótica ao microorganismo estudado.

Em 2007, Patel concluiu que após vinte e quatro horas de cultivo, meio suplementado por peptona de soja neutralizada (NSP) apresentava aumento representativo no metabolismo de *Mycoplasma ovipneumoniae*, microorganismo causador de pneumonias em cabras. No entanto, maior crescimento foi observado por meio suplementado com caldo de triptona de soja (TSB).

Em 2008, Siaterlis realizou um estudo visando a otimização do crescimento de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*. Foi observado que células cultivadas em maior concentração de peptona vegetal e extrato de leveduras apresentaram maior crescimento.

Em 2009, Fakhfakh-Zouari estudou a interação do microorganismo *Bacillus pumillus* com a queratina presente em penas de aves, variando as fontes de nitrogênio para que em posterior fosse realizado um estudo estatístico. O autor concluiu que a peptona de soja foi o composto que mais incentivou o desenvolvimento de *Bacillus pumillus* e aumento de concentração da enzima queratinase.

Desta forma, é possível se observar sucesso da utilização de peptonas vegetais, principalmente provenientes da soja, em cultivos de diversos tipos de microorganismos. No

entanto, apesar da quantidade significativa de resultados apresentados, estudos que envolvem a produção de AH por *Streptococcus* geralmente utilizam extrato de leveduras como fonte de nitrogênio orgânico (Blank *et al.*, 2005; Ogrodowski *et al.*, 2005). Na literatura, poucos trabalhos estudam influência de fontes vegetais sobre *Streptococcus*:

Em 1994, Cazzola *et al.* estudaram diferentes meios de cultura nutritivos, com finalidade de observar a produção de AH a partir de *Streptococcus equi* 68222. Dentre eles, foi utilizado um meio com mistura de peptonas, soja digerida (HI-SOY) e glicose, este foi comparado a diversos outros meios provindo de outras patentes, os quais possuíam principalmente EL, peptonas não vegetais, glicose e demais sais. Foi realizada fermentação em todos os casos, com agitação de 150 rpm e temperatura de 37 °C, e em cada um dos meios a fermentação ocorreu até que não mais houvesse crescimento celular, o qual era medido a cada hora a partir de densidade ótica. Foi observado que meio confeccionado com peptona vegetal e soja digerida produziu quantidade de AH superior (1,36 g.L⁻¹) aos outros casos, que apresentaram produções de 0,38 a 1,00 g.L⁻¹. Além disso, quando cultivados em meio HI-SOY, *Streptococcus equi* 68222 apresentaram menor taxa de crescimento, o que justifica maior direcionamento metabólico para produção de AH.

Em 2003, Zisu estudou a produção de exopolissacarídeos a partir de *Streptococcus thermophilus*, utilizando lactose como substrato. Após determinação das condições ótimas de pH, verificou que a adição de proteína de soja a 0,5% (m/v) duplicou a concentração de exopolissacarídeos após 24 horas de fermentação. Em 2006, Zhurbenko concluiu que a ação sobre o cultivo do microorganismo *Streptococcus pyogenes*, a partir da quinta hora de incubação, foi ligeiramente superior em relação ao valor de referência ao se utilizar peptona de soja, extrato de malte ou triptona de soja. Em 2009, Izawa estudou o efeito do pH, temperatura, agitação e aeração sobre a produção do AH através de *Streptococcus thermophilus*, utilizando lactose como substrato. Após a otimização destas condições, o meio foi suplementado com vários tipos de peptídeos de soja. Verificou-se produção de 0,2 g.L⁻¹ de AH enquanto aumentava-se a concentração de peptídeos (Izawa, 2009).

Em 2009, Kanchankumar *et al.* realizou um estudo de exopolissacarídeos produzidos a partir de *Streptococcus* isolados de setenta cavalos. Em todos estes casos, foi observada a presença de *Streptococcus dysgalactiae*, o qual se mostrou potencial produtor de AH. Foi realizado cultivo com este microorganismo, e também com *Streptococcus equi*

zooeidemicus (MTCC 3523) em meios com cinco tipos diferentes de fontes de nitrogênio: Triptona, peptona, peptona de soja (PS) e extrato de leveduras (EL). Peptona de soja foi considerada a melhor fonte de nitrogênio, apresentando produção de 0,245 g.L⁻¹ de exopolissacarídeos, quando utilizada em concentração previamente otimizada.

Em 2009, Izawa *et al.* utilizou *Streptococcus thermophilus* 2084 em fermentação com leite, com finalidades de otimizar produção de AH, realizando variações na rotação, pH e temperatura. Em condições ótimas de fermentação, foi observado que a adição de peptídeos de soja levaram a produção de 0,21 g.L⁻¹ de AH em condições ótimas (pH 6.8, 35 °C, 100 rpm).

Ainda em 2009, Lee *et al.* testou dezesseis fontes de nitrogênio não animais, com finalidade de produzir ácido hialurônico a partir de cultivo de *Streptococcus sp.* KL0188. Após otimização de concentração de fontes de nitrogênio, foi observada produção de AH superiores em fermentações realizadas com PS A2SC (1,3 g.L⁻¹), quando comparadas com fermentações realizadas com EL (0,7 g.L⁻¹). Neste caso, fermentações foram realizadas sem controle de aeração e pH

A Tabela 3.2 a seguir lista todos os aminoácidos presentes em peptonas de trigo, peptonas de soja, peptonas de batata e extrato de leveduras (Organotech, França).

Tabela 3.2 – Quantificação de aminoácidos livres e totais em peptonas de soja (PS), trigo (PT), batata (PB) e em extrato de leveduras (EL) .

Aminoacid	PS (g.100g⁻¹)		PT (g.100g⁻¹)		PB (g.100g⁻¹)		EL (g.100g⁻¹)	
	<i>Total</i>	<i>Livre</i>	<i>Total</i>	<i>Livre</i>	<i>Total</i>	<i>Livre</i>	<i>Total</i>	<i>Livre</i>
Alanina	2.6	0.7	2.1	0.4	2.8	1.3	4.1	3.8
Arginina	3.8	1.5	3.1	0.7	2.6	2.1	2.8	1.5
Ác. aspártico	5.8	0.3	2.9	0.1	6.7	1.2	6.0	1.8
Cistina	1.1	0.1	2.0	0.1	0.0	0.0	0.6	0.1
Ác. glutâmico	11.0	2.1	29.0	0.3	6.3	1.6	11.0	6.8
Glicina	2.4	0.5	3.1	0.7	2.8	0.7	2.5	1.3
Histidina	1.3	0.3	2.1	0.4	1.4	1.4	1.1	0.6
Isoleucina	2.6	0.4	2.2	0.2	3.2	1.9	2.6	2.2
Leucina	3.8	1.3	4.7	1.5	5.4	4.2	3.7	3.6
Lisina	3.8	0.9	1.7	0.3	4.3	2.6	4.2	1.8
Metionina	0.5	0.2	1.4	0.3	0.0	0.9	0.8	0.7
Fenilalanina	2.3	0.7	3.4	0.5	1.9	1.5	2.5	2.1
Prolina	2.6	0.1	9.2	0.0	3.0	1.0	2.2	1.1
Serina	2.7	0.8	4.3	0.7	2.8	1.7	2.7	1.9
Treonina	2.2	0.4	2.2	0.3	3.1	2.5	2.6	1.7
Triptofano	0.4	0.2	0.4	0.1	1.3	1.1	0.8	0.6
Tirosina	1.7	0.4	1.8	0.5	2.1	2.1	0.8	0.8
Valina	2.5	0.6	2.9	0.2	3.7	2.5	3.1	2.5

Fonte: Organotechnie. Fichas catalográficas de peptonas vegetais, acessadas no endereço eletrônico <http://www.organotechnie.com/vegetabl.htm> em março, 2011.

De acordo com Armstrong *et al.*, 1997, onze dos dezoito aminoácidos listados nas tabelas anteriores são considerados essenciais para o metabolismo de *Streptococcus zooepidemicus* e produção de AH. São eles: arginina, lisina, cisteína, isoleucina, tirosina, metionina, histidina, valina, fenilalanina, leucina e triptofano. Uma forma de justificar o uso de peptonas vegetais para o cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* é através da avaliação da quantidade relevante de aminoácidos essenciais presentes nestes nutrientes. A Tabela 3.3 demonstra uma quantificação destes onze aminoácidos presentes em peptonas de soja (PS), de trigo (PT), de batata (PB) e extrato de leveduras (EL).

Tabela 3.3 – Quantificação de aminoácidos essenciais para a produção de AH em PT, PS, PB e EL

Fonte	PT (%)	PS (%)	PB (%)	EL (%)
Arginina	3,1	3,80	3,8	1,01
Lisina	1,7	3,77	5,1	8,58
Cisteína	2	0,00	0	1,3
Isoleucina	2,2	2,23	3,8	5,69
Tirosina	1,8	1,70	2,4	2,17
Metionina	1,4	0,53	0	1,26
Histidina	2,1	1,33	1,6	3,01
Valina	2,9	2,53	4,3	6,76
Fenilalanila	3,4	2,27	3,7	4,74
Leucina	4,7	3,77	6,3	8,07
Triptofano	0,4	0,43	0	1,31
Total	25,7	22,37	31	43,9

Fonte: Organotechnie. Fichas catalográficas de peptonas vegetais, acessadas no endereço eletrônico <http://www.organotechnie.com/vegetabl.htm> em março, 2011.

É possível se notar que todas as peptonas vegetais possuem quantidade inferior de aminoácidos essenciais, quando comparadas ao extrato de leveduras. No entanto, o EL apresenta um elevado teor de ácidos nucléicos, particularmente RNA, o que pode oferecer certas restrições à sua utilização como suplemento do meio de cultura, considerando-se a exigência de maior número de etapas no processo de recuperação e purificação do bioproduto.

A partir dos argumentos apresentados acima, este trabalho objetiva substituir o extrato de leveduras por peptonas vegetais, com finalidade de observar se as características destas fontes de nitrogênio suprem as necessidades nutricionais de *Streptococcus zooepidemicus* para produção de AH.

4. Resultados e discussão

Esta seção será apresentada na forma de artigos que foram submetidos a periódicos científicos.

4.1. INFLUÊNCIA DE PEPTONAS VEGETAIS SOBRE A PRODUÇÃO MICROBIANA E PUREZA DO AH

**ARTIGO SUBMETIDO AO PERÍODICO “BIORESOURCE
TECHNOLOGY” COM O “ORIGINAL ARTICLE”.**

EFFECTS OF VEGETABLE PEPTONES ON THE MICROBIAL PRODUCTION AND PURITY OF HYALURONIC ACID

Leandro Junqueira Benedini and Maria Helena Andrade Santana*

University of Campinas - UNICAMP

Laboratory of Development of Biotechnological Processes

School of Chemical Engineering, P.O. Box 6066

13083-970, Campinas-SP, Brazil

ABSTRACT – The objective of this work is to contribute to the current appeal of using plant compounds in culture media to obtain products for medical and cosmetic applications. To this end, vegetable soy (SP), wheat (WP), potato (PP) and a commercial mixture (MVP) of peptones were studied as nitrogen sources for the production of hyaluronic acid (HA) by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. The purity of HA in terms of protein content (TPP) also was considered. The production of HA was correlated with the ratio of free to total essential amino acids of SP, PP and WP. The best performance was due to SP, with the highest HA production (0.28 g.L^{-1}), yield HA/cells (1.35 g.g^{-1}) and the lowest TPP/HA (1.4 g.g^{-1}). The major changes occurred within the first 5 hours of fermentation and HA from SP presented a high molecular weight ($3.24 \times 10^6 \text{ Da}$).

¹ Key words: Hyaluronic Acid, *Streptococcus zooepidemicus*, vegetable peptone, Submerge fermentation.

* 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 an endogenous glucosaminoglycan with various biological functions due to its unique hydrodynamic properties, viscoelasticity and molecular signaling. These properties have been used in medical, pharmaceutical and cosmetic applications. Currently the HA and its derived products have high aggregated value (US \$ 2,000 to 60,000.kg⁻¹) and have been used in viscosupplementation, viscosurgery, wound healing and tissue fillers.

Nowadays, the microbial production of HA has become increasingly attractive for large scale production, due to the flexibility of controlling production and purification processes, and eliminating the risk of viral contamination of the HA extraction from animal tissues. The most known microbial production of HA uses Lancerfield group A and C streptococci. The HA produced is extruded through the cell membrane, forming a capsule around the cells (Weigel, 2010). The HA is separated from the fermentation medium by centrifugation and purified by successive precipitations with ethanol (Akasaka et al., 1989).

Considering the composition of the culture medium, studies from the 90 decade have shown that the groups A and C streptococci possess fastidious nutrient requirements with respect to organic nitrogen (Bio-Technology General Corporation, 1986). These sources are considered essential for the growth of streptococci, since they also supply a large proportion of carbon for cellular biosynthesis (O'Regan et al., 1994). Eleven amino acids plus glutamine were reported as essential to the group B (Milligan et al., 1978) and 21 amino acids for group A streptococci (Van de Rijn and Kessler, 1980). In 1997, Amstrong and Johns found the same 11 amino acids (excluding glutamine) reported by Milligan et al.,

1978, for the growth of *Streptococcus zooepidemicus* cultured in chemically defined medium: arginine, cystine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine, and valine. Although the similar metabolic activity of the cells regarding HA synthesis in complex or chemically defined medium, the specific growth rate and volumetric HA production rate were higher in complex media. The authors attributed this behavior to the difference in the transport of individual amino acids and peptides to the cells. Moreover, individual amino acids, peptides and proteins also may interfere on the purity of the final product. Nowadays, a downstream process has been benefited with changes in the upstream related to the composition of the culture media.

In the last 10 years, the pharmaceutical and cosmetic industries have demanded non-animal substances in microbial culture media for the production of compounds, for security reasons. Therefore, the development of alternative media has been encouraged for production of valuable products. Lee et al. (2009), studied various non-animal-derivative nitrogen sources from yeast, soybean, and wheat, replacing tryptone for the production of HA by *Streptococcus sp.* KL0188. Yeast extract is the most used complex nitrogen source for the production of HA by streptococci. In previous studies, we reported the microbial production of HA from agricultural derivatives (Pires et al., 2010). Cashew apple juice supplemented with yeast extract (Sigma-Aldrich) was the more promising media compared to a soy protein hydrolysate concentrate and whey protein concentrate. However, it was also found that the protein content in the yeast extract was difficult to remove by precipitation of HA with ethanol at pH 7.0 which is the optimum pH for HA precipitation (Pires, 2010).

Considering this context, and also the demand of culture media from vegetal sources, the objective of the present work was to evaluate the effects of vegetable peptones (VPs) as nitrogen sources on the production of HA from the cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. ATCC 39920 and its purity after precipitation by ethanol.

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 frozen at -80 °C in ampoules containing 10% glycerol as cryoprotectant.

2.2 Nitrogen Sources. The vegetable soy (SP), wheat (WP), potato (PP) and a commercial mixture (MVP) of vegetable peptones were studied as nitrogen sources. Yeast extract (YE) was used as control. The VPs were a gift of Organotechnie (France). Table 1 shows comparatively a complete list of total and free amino acids for SP, PP and WP. Such peaces of information were not available for MVP and for the used YE.

Table 1 – Total and free amino acids contents in soy (SP) wheat (WP) and potato (PP) peptones. Data from the manufacturer Organotechnie (France).

Aminoacid	SP (g.100g⁻¹)		WP (g.100g⁻¹)		PP (g.100g⁻¹)	
	<i>Total</i>	<i>Free</i>	<i>Total</i>	<i>Free</i>	<i>Total</i>	<i>Free</i>
Alanine	2.6	0.7	2.1	0.4	2.8	1.3
Arginine	3.8	1.5	3.1	0.7	2.6	2.1
Aspartic acid	5.8	0.3	2.9	0.1	6.7	1.2
Cystine	1.1	0.1	2.0	0.1	0.0	0.0
Glutamic acid	11.0	2.1	29.0	0.3	6.3	1.6
Glycine	2.4	0.5	3.1	0.7	2.8	0.7
Histidine	1.3	0.3	2.1	0.4	1.4	1.4
Isoleucine	2.6	0.4	2.2	0.2	3.2	1.9
Leucine	3.8	1.3	4.7	1.5	5.4	4.2
Lysine	3.8	0.9	1.7	0.3	4.3	2.6
Methionine	0.5	0.2	1.4	0.3	0.0	0.9
Phenylalanine	2.3	0.7	3.4	0.5	1.9	1.5
Proline	2.6	0.1	9.2	0.0	3.0	1.0
Serine	2.7	0.8	4.3	0.7	2.8	1.7
Threonine	2.2	0.4	2.2	0.3	3.1	2.5
Tryptophan	0.4	0.2	0.4	0.1	1.3	1.1
Tyrosine	1.7	0.4	1.8	0.5	2.1	2.1
Valine	2.5	0.6	2.9	0.2	3.7	2.5

2.3. Culture media. The media were composed by glucose, and one of the studied VPs. No mineral ions were used according to Pires and Santana, 2010. YE was used as a control of nitrogen source. The concentrations were adjusted to achieve glucose: nitrogen ratio of 7.8:1, according to Pires *et al.* (2009). The total Kjeldhal (TKN) nitrogen in Table 2 was determined by the Kjeldahl method (AOAC, 1995). The total protein and peptides (TPP) content in the VPs was calculated by multiplying total nitrogen percentage by the factor 5.75, as recommended by the Ordinance No. 41, from Anvisa. The TPP in YE was determined by Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA). The glucose

was quantified using a glucose oxidase commercial kit (Laborlab Ltda. Guarulhos, São Paulo, Brazil).

Table 2 - Total Kjeldhal nitrogen (TKN), total protein and peptides (TPP) and glucose (G) in the vegetable peptones and in the yeast extract in the fermentation media at the starting of the fermentations

Nitrogen source	TKN (g.L ⁻¹)			TPP (g.L ⁻¹)			G (g.L ⁻¹)		
Vegetable peptone (MVP)	104.48	±	2.4	600.76	±	13.8	7.02	±	0.56
Potato peptone (PP)	86.8	±	3.84	499.1	±	22.08	4.03	±	0.76
Wheat peptone (WP)	80.88	±	2.16	465.06	±	12.42	4.92	±	0.67
Soy peptone (SP)	76.4	±	1.44	439.3	±	8.28	4.11	±	0.54
Yeast extract (YE)	86.64	±	1.6	498.18	±	9.2	4.34	±	0.51

TKN – Total nitrogen, TPP – Total proteins and peptides, G – Glucose concentration.

2.4. Pre-inoculum 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 three steps: In the first step, the beads were unfreezed and streaked on agar plates containing BHI medium and supplemented with 5% (v/v) of sheep blood (Biotério Boa Vista, SP, Brazil). The plates were incubated at 37°C during 24 h. In the second step, the grown colonies from the plates were transferred to 125 mL Erlenmeyer flasks for preparation of a pre-inoculum, containing 100 mL culture medium composed by 37 g/L of BHI and 23 g/L of glucose and incubated under reciprocal shaking at 150 rpm, 37 °C, during 6 h. In the third step, the pre-inoculum was transferred 10% v/v to Erlenmeyer flasks for preparation of five inocula, in 100 mL culture media. It was used one inoculum

for each VP medium described in item 2.3. The flasks were also were incubated under reciprocal shaking at 150 rpm, 37 °C, during 6 h.

For the kinetic assay, the grown colonies from the plates were transferred to two 250 mL Erlenmeyer flasks, containing 100 mL of the culture medium. The flasks were incubated under reciprocal shaking at 150 rpm, 37 °C, during 12 h.

2.5. Fermentations. Initially the fermentations were performed in batch culture, using 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of medium. Each medium was inoculated with 10% (v/v) of its respective inoculum. Flasks were maintained under reciprocal shaking, at 37 °C, 150 rpm during 24 h. The fermentations were performed in triplicate for each medium described in item 2.3. Concentrations of cells, HA and glucose were determined for each flask at the initial and final times. The average molecular weight of HA was determined at the end of fermentations.

For the kinetic assay, the fermentations were carried out with SP and WP only. They were also performed in batch culture, but in 1 L Erlenmeyer flasks containing 340 mL of each medium, which were inoculated with 10% (v/v) of cells. Flasks were maintained under reciprocal shaking, at 37 °C, 150 rpm during 33 hours, and samples were withdrawn each three hours along time. Concentrations of cells, HA, glucose, nitrogen and lactate, as well as the average molecular weight of HA were determined in the collected samples. The analyses were performed in triplicate.

2.6. HA separation and purification. The culture broth was centrifuged at 22400 g during 20 min. The cell-free broth was then treated with ethanol in a proportion 1.5×10^{-1} v.v⁻¹ ethanol.supernatant⁻¹. The solution was cooled down, remaining at 4°C during 1 h for the precipitation of HA. Finally, the HA precipitated was redissolved in a 0.15mol.L⁻¹ NaCl

solution. Three precipitation and redissolution steps were performed to increase the amount of HA precipitated. HA and TPP contents were analyzed at the end of the purification.

2.7. Analytical methods.

2.7.1. Cell growth. Cell growth was determined by cell dry weight according to the gravimetric method. To this end, 10 mL of the culture broth were centrifuged in tubes previously dried to constant weight at 60 °C. After centrifugation, the cell pellet was washed twice with deionized water and dried to constant weight under these same conditions.

2.7.2. Glucose concentration. Glucose concentration was determined using a glucose oxidase commercial kit (Laborlab Ltda, Guarulhos, São Paulo, Brazil).

2.7.3. HA concentration. The concentration of HA was determined by the carbazol reagent (Dische, 1946). Sodium hyaluronate (Hylumed™) from Genzyme Corporation (Cambridge, MA, USA) was used as a standard.

2.7.4. Lactate, Acetate and Formate Concentrations. Culture samples were filtered through membranes with a pore size of 0.2 µm (Sartorius, Goettingen, Germany), and 20 µL of filtered sample was injected into an ion exchange High Performance Liquid Chromatography (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a 7.8 mm×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 solution pumped at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹, as described by Chong et al., 2005. 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).

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

2.7.6. Statistical analysis. All the data of this work were compared by the Tukey test at 5% probability level ($p < 0.05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Table 3 shows a comparative analysis of the performance of the VPs and YE in terms of cell growth, HA production and its average molecular weight, glucose consumption, yield parameters and purity of HA after the precipitations.

Table 3 - Performance of the vegetable peptones and yeast extract on the production of HA from *Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 39920) during 24h fermentation and its purity after three precipitations with ethanol.

Nitrogen Source	MVP	PP	WP	SP	YE
Cell growth (g.L⁻¹)	1.66 ± 0.14 ^a	0.15 ± 0.06 ^d	0.82 ± 0.03 ^c	0.21 ± 0.06 ^d	1.32 ± 0.04 ^b
HA (g.L⁻¹)	0.12 ± 0.02 ^a	0.19 ± 0.02 ^b	0.05 ± 0.01 ^c	0.28 ± 0.02 ^d	0.21 ± 0.01 ^b
Y_{P/X}	0.07 ± 0.01 ^a	1.24 ± 0.51 ^b	0.06 ± 0.02 ^a	1.35 ± 0.43 ^b	0.16 ± 0.01 ^c
Y_{P/S}	0.02 ± 0.003 ^a	0.16 ± 0.05 ^b	0.02 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.05 ^c	0.04 ± 0.01 ^d
Y_{X/S}	0.29 ± 0.06 ^a	0.13 ± 0.07 ^b	0.33 ± 0.20 ^a	0.10 ± 0.05 ^b	0.25 ± 0.06 ^a
Y_{Lactate/S}	0.16 ± 0.03 ^c	2.19 ± 0.59 ^a	0.00 ± 0.00 ^d	1.90 ± 0.72 ^a	0.30 ± 0.09 ^b
Y_{Acetate/S}	0.15 ± 0.03 ^b	0.22 ± 0.06 ^b	0.69 ± 0.37 ^a	0.74 ± 0.28 ^a	0.21 ± 0.09 ^b
Formate (g.L⁻¹)	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.23 ± 0.03 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
Ethanol (g.L⁻¹)	1.76 ± 0.15 ^a	0.00 ± 0.00 ^c	0.39 ± 0.05 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c
FE.TE⁻¹	-	0.78 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.28 ± 0.00	-
TPP (g.L⁻¹)	0.31 ± 0.00 ^a	0.30 ± 0.01 ^a	0.41 ± 0.01 ^b	0.40 ± 0.02 ^b	0.88 ± 0.11 ^c
TPP.HA⁻¹	2.50 ± 0.37 ^a	1.60 ± 0.15 ^b	7.90 ± 2.00 ^c	1.40 ± 0.14 ^b	4.10 ± 0.58 ^d
HA average MW (10⁻⁶.Da)	3.31 ± 0.15 ^a	3.36 ± 0.03 ^a	4.57 ± 0.23 ^b	3.31 ± 0.21 ^a	3.37 ± 0.16 ^a

HA – Hyaluronic acid; Y_{P/X} – HA production per cell growth; Y_{P/S} – HA production per glucose consumption; Y_{X/S} – Cell growth per glucose consumption; Y_{Lactate/S} – Lactate production per glucose consumption; Y_{Acetate/S} – Acetate production per glucose consumption; FE – Free essential amino acids; TE – Total essential amino acids; TPP – Total proteins and peptides; MW – Average molecular weight.

Different lower-case letters indicate statistical difference at $\alpha = 0.05$ level in each line. Values with the same letters in the same parameters indicate that the values did not differ by the Tukey test at 0.95 confidence interval.

The cell growth was higher than YE only for MVP. Among the VPs, the cell growth followed the order: MVP>WP>SP=PP. The order for HA production was SP>PP=YE>MVP>WP.

The glucose consumption followed the same order of cell growth for the VPs and YE. In consequence of that, $Y_{P/S}$ values were the highest and $Y_{X/S}$ were the lowest ones for SP and PP. Therefore, it could be inferred that SP and PP were also assimilated as carbon source.

The $Y_{P/X}$ values were higher than 1 for SP and PP, indicating redirection of the metabolic pathway in favor of HA. For the other VPs as well as YE, the competition for energy favored the production of cells.

The yields of the secondary metabolites lactate and acetate $Y_{Lactate/S}$, $Y_{Acetate/S}$ followed the order PP=SP>YE>MVP>WP and WP=SP>MVP=YE=PP. Despite the equal yields of cells and lactate, PP produced less HA due to its yield on acetate which is lower than SP. The biosynthesis of the polymer is expensive for the organism in relation to energy consumption and carbon (Chong and Nielsen, 2003). A total of 4 moles of ATP are consumed to produce 1 mol of disaccharide unit of HA. The production of ethanol and formate are due to anoxic conditions in the media, which were mainly present in WP.

Analyzing the compositions in Table 1, SP, PP and WP contained similar amounts of 11 essential amino acids for growing *S. zooepidemicus* found by Armstrong et al., 1977. However, they differed in the amounts of free essential amino acids (FE) in relation to the total (TE) as shown in Table 3. Therefore, a correlation between the production of HA and FE/TE in WP, SP and PP could be inferred with the best production of HA close to 0.28 FE/TE as in SP. Although other components also contribute for HA production, the

differences in the transport of individual amino acids and peptides to the cells are important to the production of HA.

Table 3 also shows that the three successive precipitations of HA from the fermentation media after cell separation, yielded TPP concentrations between 0.3-0.4 g.L⁻¹ except to YE which was twice higher. However, in terms of HA in purity, TPP/HA ratios followed the order: WP>YE>MVP>SP=PP.

The average molecular weight of HA were statistically equal for the VPs except for WP which was the highest.

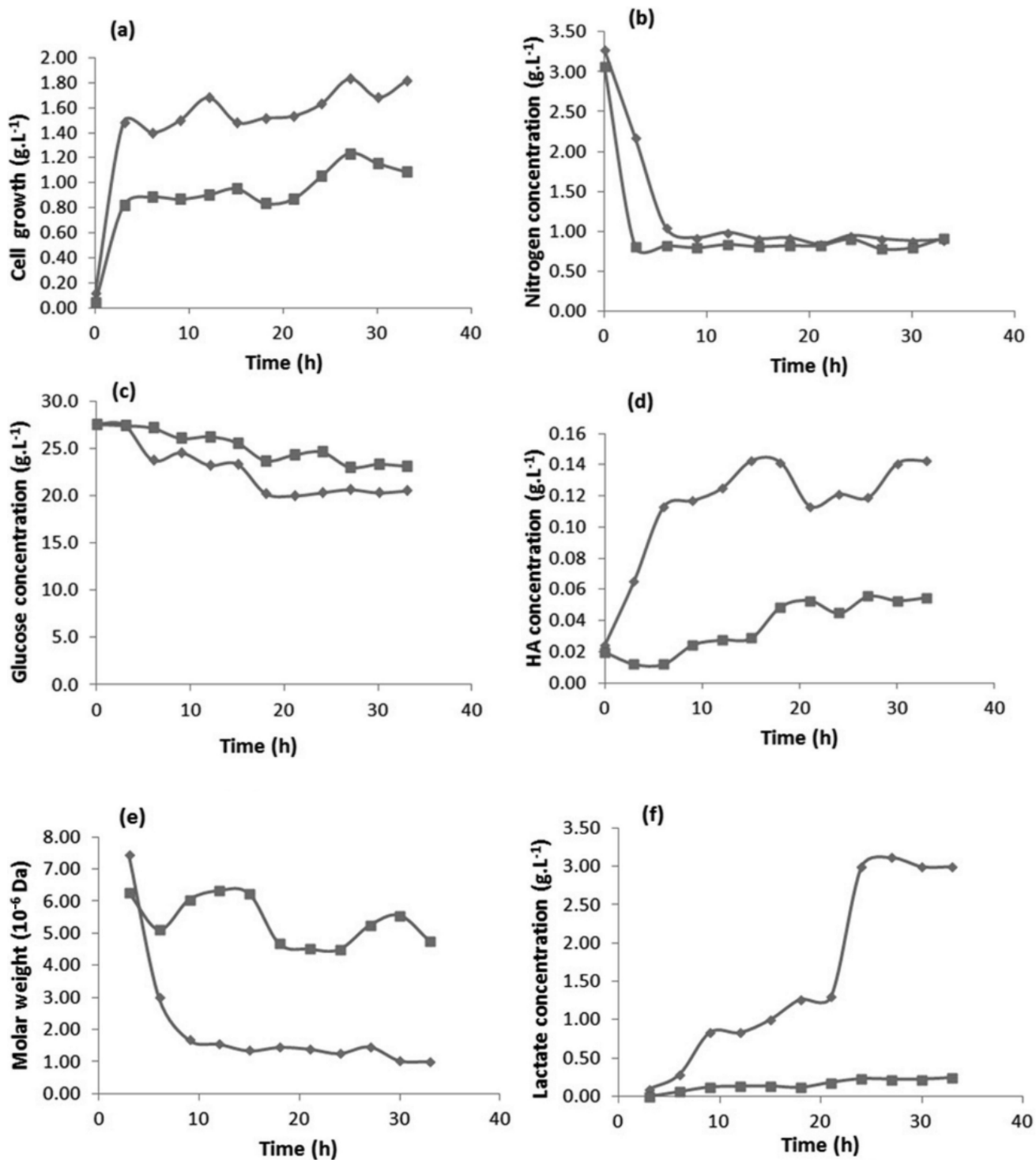


Figure 4.1 – Kinetic profiles of (a) cell growth (b) nitrogen concentration (c) glucose concentration (d) HA concentration (e) molar weight and (f) lactate concentration along cultivations of *Streptococcus zooepidemicus* in SP (◆) and WP (■) media.

The kinetic assays (Figure 4.1) show the behavior along fermentations with SP and WP media, which were the best and the worst for the production of HA. It is observed that the major events occur in the first 5 hours of fermentation. Like in the final point assay (Table 3), cell growth was higher to SP than to WP (Figure 4.1a). The nitrogen uptake was higher for WP than SP (Figure 4.1b). Therefore, the transport of peptones and proteins seemed to be favored over the free amino acids, since the ratio $FE.FT^{-1}$ for WP was much smaller (0.19) than for SP (0.28) as shown in Table 3. The highest differences were due to the HA production (Figure 4.1d) and the molar weight (MW) of HA (Figure 4.1e). The results of HA production followed similar behavior between SP and WP compared to the final point assay (Table 3). The differences in values were due to the mixture and availability of oxygen in these fermentations. However, the MWs of HA from SP and WP were similar up to 5 hours of fermentation but both decreased after this time, with a much greater reduction for SP. These results explained the MW values found in the final point assay, and they were due to exposure to pH when HA and cells were produced, which is in accordance with the higher production of lactic acid for SP (Figure 4.1f).

4. CONCLUSIONS

Vegetable peptone SP is promising for the production and purity of HA and replaces with advantages the source of microbial nitrogen YE. HA from SP also had a high MW with the order of magnitude of 10^6 Da, which gives it a high aggregated-value when marketed. The main transformations occurred up to the first 5 hours, and fermentation time should not be higher, due to the sharp reduction of the MW of the HA with the lowering of the pH along the fermentation.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA. for the financial support and Organotechnie for the provided free samples of vegetable peptones, which were used for the preparations of the culture media.

6. REFERENCES

Akasaka, H., Komasaki, H.C., Arai, T., 1989. Fermentation method for producing hyaluronic acid. US Patent 4,801,539.

Armstrong, D.C., Cooney, M.J., Johns, M.R., 1997. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 309–312.

Armstrong, D.C., Johns, M.R., 1997. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (7), 2759–2764.

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

Biotechnology General Corporation, 1986. Method of producing high molecular weight sodium hyaluronate by fermentation of *Streptococcus*. World patent WO 8.604.355 A.

Chong, B.F., Blank, L.M., Mclaughlin, R., Nielsen, L.K., 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 341–351.

Dische, Z., 1946. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.* 167, 189–198.

Heldin, P., 2003. Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation. *Braz. J. Med. Biol. Res. Brazil*, 36, 967-973.

Junguo, L., Xing, J., Chang, T., Ma, Z., Liu, H., 2004. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. *Process. Biochem.* 40, 2757-2762.

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.

Lee, G.Y., Ha, S.J., Jung, J.H., Seo, D.H., 2009. Effect of Non-animal-Derived Nitrogen Sources on the Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus* sp. KL0188. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 52(3), 283-289

Milligan T.W., Doran T.I., Straus D.C., Mattingly S.J., 1978. Growth and amino acid requirements of various strains of group B *Streptococci*. *J. Clin. Microbiol.*, 7, 28-33

O' Regan M., Martini I., Crescenzi F., De Luca C., Lansing M., 1994. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.*, 16, 283-286

Pisarcik, M., Bakos, D., Ceppa, M., 1995. Non-newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution. *Colloids Surf. A* , 6, 197-202.

Pires, A., Macedo, A.C., Eguchi, S.Y., Santana, M.H.A., 2010. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresour. technol.*, 101, 6506-6509.

Pires, A., Santana, M.H.A., 2010. Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162, 1751–1761.

Pires, A. B., Eguchi, S. Y. Santana, M. H. A., 2010. The Influence of Mineral Ions on the Microbial Production and Molecular Weight of Hyaluronic Acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1, 1-20.

Van De Rijn.and Kessler, R.E.,1980. Growth Characteristics of Group A Streptococci in a New Chemically Defined Medium. *Infect. Immun.*, 16, 444-448

Weigel, P.H., 2004. Bacterial hyaluronan synthases – an update. Hyaluronan today; Available at: <www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html>. Access: Aug. 01, 2010.

Yoo, I, Chang, H., Lee, E., Chang, Y, Moon, S., 1997. Effect of B Vitamin Supplementation on Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei*. *J. Biosci. Bioeng.*, 84, 172-175.

Zisu, B., Shah, N., 2003. Effects of PH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of Exopolysacharides by *Streptococcus thermophylus* 1275. *J. dairy sci.* 3405-3415.

4.2. EFEITOS DA PEPTONA DE SOJA SOBRE A PREPARAÇÃO DE PLACAS PETRI E PRODUÇÃO DE AH

**ARTIGO SUBMETIDO AO
PERIÓDICO “BIORESOURCE TECHNOLOGY” COMO “SHORT
COMMUNICATION”**

**EFFECTS OF SOY PEPTONE ON THE INOCULUM PREPARATION OF
Streptococcus zooepidemicus FOR PRODUCTION OF HYALURONIC ACID**

Leandro Junqueira Benedini and Maria Helena Andrade Santana*

University of Campinas - UNICAMP

Laboratory of Development of Biotechnological Processes

School of Chemical Engineering, P.O. Box 6066

13083-970, Campinas-SP, Brazil

ABSTRACT - Soy peptone (SP) was studied as nutrient source in replacement of Brain and Heart Infusion (BHI) and sheep blood in the first culture medium in Petri dishes of *Streptococcus zooepidemicus*. The animal sources were used as a control. The effects of this substitution were studied in 100 mL fermentations, carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks at 37 °C and 150 rpm with a culture medium containing glucose and SP. The replacement of animal nutrient sources by SP to about twice the BHI concentration did not alter the amount of the produced HA, or caused deviations in the metabolism of the microorganism in favor of HA instead of cell growth. Therefore, SP can totally to replace the animal sources in culture media for inocula preparations of *S. zooepidemicus*.

Key words: Hyaluronic Acid, *Streptococcus zooepidemicus*, vegetable peptone, Submerge fermentation, Petri dishes

* 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 natural polysaccharide with a wide range of pharmaceutical, medical and cosmetic applications (Weigel, 2004). Due to its biological applications, it is necessary to produce highly pure and free from viral agents HA. Nowadays, the microbial production is the preferred alternative, compared to the extraction from animal tissues such as rooster combs, umbilical cord blood or synovial fluid. The microbial route uses *Streptococci* mainly, which produce HA as a protective capsule around its cell wall (Weigel, 2004; Chong, 2005).

In general, the first seed culture media for propagation of *Streptococci* contain animal-derived sources, such as sheep blood (SB) and/or Brain Heart Infusion (BHI), for the cell growth. (Pires, 2010).

Although the animal sources are effective for cultivation of the microorganism, there is a risk of HA contamination even when these components are used in the first steps of inoculum preparation, such as in Petri dishes growth.

Recently, vegetable peptones have been used as nitrogen sources in culture media for cell cultivation (Heenan, 2002; Fakhfakh-Zouari et al., 2009; Junguo et al., 2004; Le Marrec et al., 2007; Siaterlis et al., 2008), including the cultivation of *Streptococcus* and *HA production* (Cazzola et al., 1994; Zisu and Shah, 2003; Kanchankumar et al., 2009; Izawa et al., 2010; Lee et al., 2009). On the other hand, the pharmaceutical and cosmetics applications have demanded non-animal nutrients in microbial culture media for the production of their components, for security reasons.

In this context, the objective of this study was to substitute BHI and sheep blood for soy peptone (SP) in the culture medium for the growth of *Streptococcus zooepidemicus* in

the Petri dishes. The effects of the substitution were studied in fermentations, in which cell growth, HA production, glucose consumption, and secondary metabolites were quantified. Additionally, the average molecular weight of the produced HA was also characterized.

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 frozen at -80 °C in ampoules containing 10% glycerol as cryoprotectant.

2.2. Solid and liquid inocula preparations. The first seed culture in Petri dishes, propagation in liquid medium and fermentations were carried out according to the scheme in Figure 4.2. P_c is the control Petri dishes. P_I and P_{II} are the compositions of the solid medium with sequential replacement of BHI and sheep blood. The SP was used at 67 g.L^{-1} concentration, according to preliminary studies (data not shown). All the experiments were performed in triplicate.

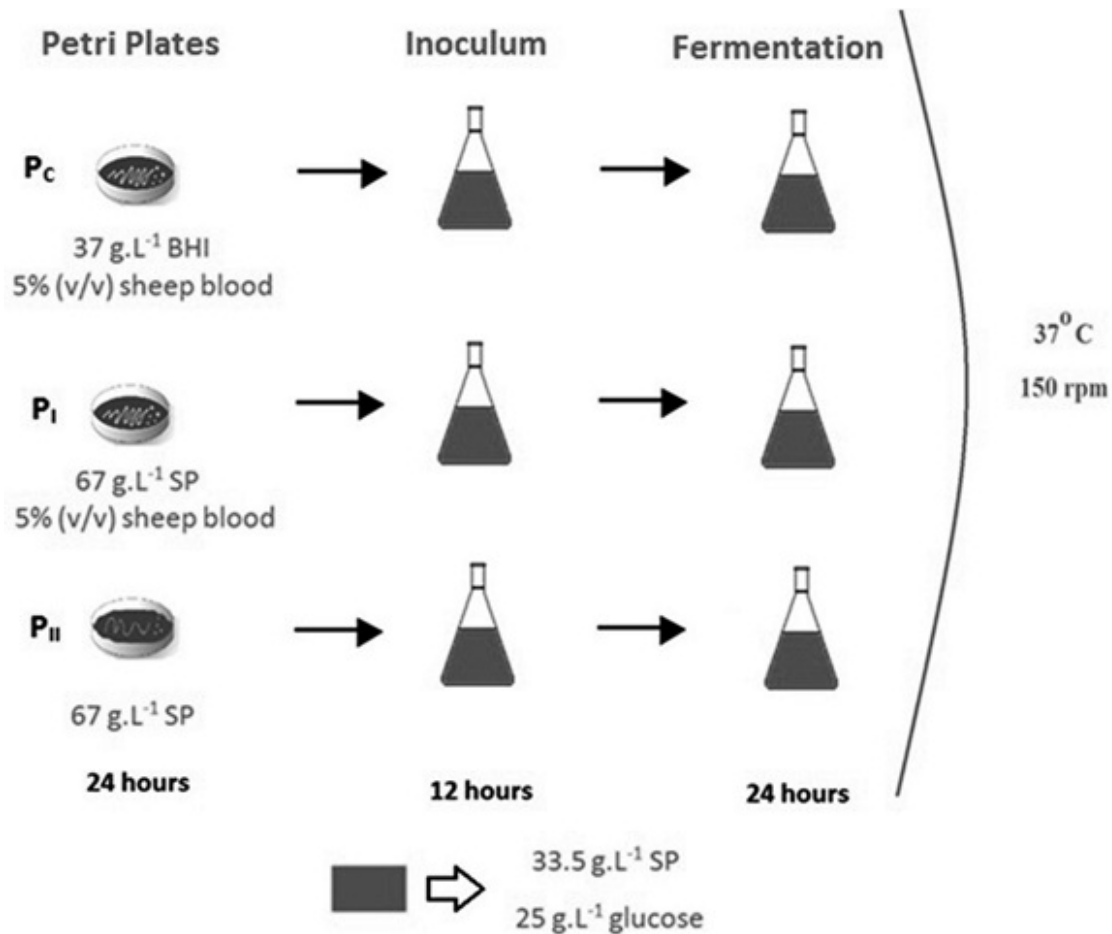


Figure 4.2 – Scheme for replacement of Brain Heart Infusion sheep blood by soy peptone in culture media on preparation of the *Streptococcus zooepidemicus* inoculum for production of hyaluronic acid.

2.3. Culture medium for liquid inocula. The culture medium for liquid inocula and fermentations was composed by 33.5 g.L⁻¹ SP and 25 g.L⁻¹ glucose, according to the 7.8 glucose/nitrogen ratio (Pires, 2010).

2.4. Fermentations. Three fermentations were performed from P_c, P_I and P_{II} as described in Figure 4.2. They were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL culture medium and 10% (v/v) for each inoculum. The flasks were maintained under

reciprocal shaking, at 37 °C, 150 rpm during 24 h. Cell mass, HA production, HA molecular weight, glucose consumption and the concentrations of acetic, lactic and formic acid secondary metabolite were determined at the initial and final times. The analyses were performed in triplicate.

2.5. Analytical methods.

2.5.1. Cell growth. Cell growth was determined by cell dry weight according to the gravimetric method. To this end, 10 mL of the culture broth were centrifuged in tubes previously dried to constant weight at 60 °C. After centrifugation, the cell pellet was washed twice with deionized water and dried to constant weight under these same conditions.

2.5.2. Glucose concentration. Glucose concentration was determined using a glucose oxidase commercial kit (LABORLAB Ltda, Guarulhos, São Paulo, Brazil).

2.5.3. HA concentration. Initially the fermented medium was centrifuged at 22400 g for 20 min. The cell free supernatant was treated with ethanol in a proportion 1.5:1 (v/v) ethanol: supernatant. The solution was then cooled down, remaining at 4 °C during 1 h for the precipitation of HA. The HA precipitated was redissolved in a 0.15 mol.L⁻¹ NaCl solution. Three steps of precipitation and redissolution were performed to increase the purity of HA precipitated. The concentration of HA was determined by the carbazol reagent (Dische, 1946). Sodium hyaluronate (Hylumed™) from Genzyme Corporation (Cambridge, MA, USA) was used as a standard.

2.5.4. Concentrations of Lactate, Acetate and, Formate. Culture samples were filtered through membranes with a pore size of 0.2 µm (Sartorius, Goettingen, Germany), and 20 µL of filtered sample was injected into an ion exchange High Performance Liquid

Chromatography (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a 7.8 mm×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 solution pumped at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹ as described by Chong et al., 2005. 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).

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

2.5.6. Statistical analysis. All the data of this work were compared by the Tukey test at 5% probability level ($p < 0,05$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Performance of the inoculum from soy peptone. Table 1 shows the performance of the fermentations with the studied inocula according Figure 4.2 and the control.

Table 1 - Performance of the fermentations with substitutions of the animal nutrient sources, Brain Heart Infusion and sheep blood, by soy protein in the first seed culture medium *Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 39920) in Petri dishes.

Parameter	P _C	P _I	P _{II}
Cell growth (g.L ⁻¹)	1.85 ± 0.17 ^a	2.00 ± 0.22 ^a	2.63 ± 0.26 ^b
Glucose consumption (g.L ⁻¹)	7.25 ± 0.74 ^a	7.29 ± 0.51 ^a	8.01 ± 0.64 ^b
HA production (g.L ⁻¹)	0.29 ± 0.03 ^a	0.27 ± 0.03 ^a	0.30 ± 0.04 ^a
Y _{P/S}	0.04 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^a
Y _{P/X}	0.16 ± 0.03 ^a	0.14 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.02 ^b
Y _{X/S}	0.25 ± 0.08 ^a	0.29 ± 0.08 ^a	0.36 ± 0.11 ^b
Lactate (g.L ⁻¹)	3.17 ± 0.21 ^a	3.08 ± 0.32 ^a	2.80 ± 0.22 ^b
Formate (g.L ⁻¹)	0.26 ± 0.02 ^a	0.27 ± 0.02 ^a	0.23 ± 0.04 ^b
Acetate (g.L ⁻¹)	1.37 ± 0.19 ^a	1.40 ± 0.09 ^a	1.08 ± 0.32 ^b
HA average MW (10 ⁻⁶ Da)	3.09 ± 0.17 ^a	3.50 ± 0.19 ^b	3.60 ± 0.20 ^b

HA – Hyaluronic acid; Y_{P/X} – HA production per cell growth; Y_{P/S} – HA production per glucose consumption; Y_{X/S} – Cell growth per glucose consumption; MW – Molecular weight.

Different lower-case letters indicate statistical difference at $\alpha = 0.05$ level in each column. Values with the same letters in the same parameters indicate that the values did not differ by the Tukey test at 0.95 confidence interval.

The results from the gradual replacement of the animal nutrient sources by the vegetal source SP (Table 1) showed that the performance of the fermentations with replacement of BHI but maintenance of the sheep blood in the media was similar to the control in all parameters, except for the HA average molecular-weight and cell growth. However, when BHI and sheep blood were substituted by SP in the solid medium, all the parameters were different from control, except for the HA production and the yield of HA related to glucose and cell growth. Despite the statistical differences, there was no metabolic deviations in the fermentations in favor of HA at the expenses of cells ($Y_{P/X} < 1$)

for none of the studied inocula. The increment of the HA molecular-weight in fermentations with the partial or total substitution of BHI and sheep blood, were directly related to the decreasing production of the lactic and acetic acids and preservation of HA exposition to a lower pH. Therefore, the solid medium of the first seed did not interfere on the performance of the inocula in the fermentations with SP.

4. CONCLUSIONS

The animal nutrient sources BHI (37 g.L⁻¹) and 5% v/v sheep blood in the first seed in solid culture medium can be totally replaced by 67 g.L⁻¹ soy peptone, for inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus*. This replacement preserves the HA produced by fermentation of contaminations from animal sources, and also benefits pharmaceutical and cosmetic applications.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA. for the financial support and the french Organotechnie for the provided free samples of soy peptone, which was used for the preparations of the culture media.

6. REFERENCES

Armstrong, D.C. The molecular weight properties of hyaluronic acid produced *Streptococcus zooepidemicus*. 1997. Queensland: University of Queensland, 1997. (PhD. Thesis).

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

Cazzola, F., Oregan, M., Corsa, V., 1994. Culture medium and process for the preparation of high molecular weight hyaluronic acid. European patent: P071668B1.

Chong, B.F., Blank, L.M., McLaughlin, R., Nielsen, L.K., 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 341-351.

Dische, Z., 1946. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.* 167, 189-198.

Fakhfakh-Zouari, N.; Haddar, A.; Hmidet, N.; Frikha, F.; Nasri, M., 2010. Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. *Process Biochem.* 45(5), 617-626.

Heenan, C., Adams, M., Hosken, R., Fleet, G., 2002. Growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in vegetarian food products. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 35(2), 171-176.

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.

Junguo, L., Xing, J., Chang, T., Ma, Z., Liu, H., 2004. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. *Process. Biochem.* 40, 2757-2762.

Kanchankumar, P.P., Chaudhari B.L., Chincholkar S.B., 2009. Screening for pharmaceutically important exopolysaccharide producing Streptococci and partial optimization for EPS production. *Curr. Trend Biotechnol. Pharm.*, 3(3), 329-340.

Kim, J., Yoo, S., Oh, D., Kweon, Y., Park, D., Lee, C., Gil, G., 1996. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 440-445.

Lee, G.Y., Ha, S.J., Jung, J.H., Seo, D.H., 2009. Effect of Non-animal-Derived Nitrogen Sources on the Production of Hyaluronic Acid by Streptococcus sp. KL0188. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 52(3), 283-289

Le Marrec, C., Bom, E., Lonvaud-Funel, A., 2007. Tolerance to high osmolality of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* and identification of potential osmoprotectants. *Int. J. Food. Microbiol.* 115(3),335-42.

Pires, A., Macedo, A.C., Eguchi, S.Y., Santana, M.H.A., 2010. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresour. technol.*, 101, 6506-6509.

Pires, A., Santana, M.H.A., 2010. Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162, 1751–1761.

Pires, A. B., Eguchi, S. Y. Santana, M. H. A., 2010. The Influence of Mineral Ions on the Microbial Production and Molecular Weight of Hyaluronic Acid. *Appl. Biochem Biotechnol*, 1, 1-20.

Siaterlis, A., Deepika, G., Charalampopoulos, D., 2008. Effect of culture medium and cryoprotectants in the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48(3) 295-301

Weigel, P.H., 2004. Bacterial hyaluronan synthases – an update. Hyaluronan today; Available at: <www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html>. Access: Aug. 01, 2010.

Yoo, I, Chang, H., Lee, E., Chang, Y, Moon, S., 1997. Effect of B Vitamin Supplementation on Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei*. J. Biosci. Bioeng., 84, 172-175.

Zisu, B., Shah, N., 2003. Effects of PH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of Exopolysacharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *J. dairy sci.* 3405-3415.

5. Conclusões finais

Dentre todas as peptonas vegetais estudadas, PS foi considerada a mais promissora para a produção de AH, substituindo EL como fonte de nitrogênio microbiana e produzindo AH com alta massa molar (10^6 Da), o que aumenta o valor agregado do polímero no mercado. Estudos cinéticos demonstraram que a maior quantidade de AH foi produzida nas primeiras 5 horas do cultivo. Desta forma, conclui-se que o tempo de fermentação não deve ser maior do que isso, já que o aumento de pH durante fermentações muito longas acarreta redução de massa molar do polímero.

Em relação à utilização de PS na preparação de placas Petri utilizadas para adaptação inicial de *Streptococcus zooepidemicus*, verificou-se que a fonte animal BHI (37 g.L^{-1}) e 5% v/v de sangue de carneiro podem ser totalmente substituídos por 67 g.L^{-1} de PS. Esta substituição preserva os AH produzido de contaminações provenientes de fontes animais, além de beneficiar suas aplicações farmacêuticas e cosméticas.

6. Sugestões para trabalhos futuros

- Realização de planejamento experimental para estimativa da ótima relação $C_6H_{12}O_6/N$, tanto para a produção de AH quanto para a sua pureza (TPP).
- Utilização de peptona de soja em fermentações com choque ácido.
- Desenvolvimento de novos métodos para purificação do AH.

7. Referências Bibliográficas

AKASAKA, H., KOMASAKI, H., ARAI, T. Fermentation Method for Producing Hyaluronic Acid. United States Patent n. 4,801,539. January 31, 1989.

AKASAKA, H.; SUSUMU, S.; YANAGI, M.; FUKUSHIMA, S.; MITSUI, T.. *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, v.22, p.35-42, 1988.

ARMSTRONG, D.C., COONEY, M.J., JOHNS. M.R. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 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*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 63, no 7. P. 2759-2764. 1997.

ARMSTRONG, D.C. The molecular weight properties of hyaluronic acid produced *Streptococcus zooepidemicus*. Queensland: University of Queensland, 1997. (PhD. Thesis).

ASARI, A., MIYAUCHI, S. Medical applications of hyaluronan. 2000; Available at: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA13/HA13E.html>>. Access: Access: May, 27, 2011.

BATISTOTE, M. **Estudo fisiológico do efeito da complexidade estrutural da fonte de nitrogênio no meio de cultura no metabolismo de leveduras**. 155 f.(Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual de São Paulo. 2006

BALKE, S., HAMIELEC, A., LECLKAIR, B and PEARCE , S. (1969). *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 8 (1), 54-57.

BLANK, L.M., MCLAUGHLIN, R.L., NIELSEN, L.K. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. *Biotechnol. Bioeng.*, v.90

CAZZOLA, F; OREGAN, M; CORSA, V. Culture medium and process for the preparation of high molecular weight hyaluronic acid. European patent specification: P071668B1.

CHONG, B.F.; BLANK, L.M.; MCLAUGHLIN, R.; NIELSEN, L.K. Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.66, n.4, p.341-351, 2005.

CHONG, B.F., NIELSEN, L.K. Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. *Biochemical Engineering Journal.*, v.16, p.153-162, 2003.

CHONG, B.F., NIELSEN, L.K. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Biotechnol.*, v.100, p.33-41, 2003.

COOPER, T.G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.

DAY, A. J., SHEEHAN, J. K.. Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v.11, p.617–622, 2001.

Dische, Z., 1946. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.* 167, 189–198.

FAKHFAKH-ZOUARI, N.; HADDAR, A.; HMIDET, N.; FRIKHA, F.; NASRI, M. Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by

Bacillus pumilus A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. *Process Biochemistry*. Volume 45, Issue 5, May 2010, Pages 617-626.

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.

GLAIZER, A. N., NIKALDO, H. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology, second edition. United Kingdom: Cambridge University Press. 2007. 553 f

HASCALL, V.C.; LAURENT, T.C. Hyaluronan: structure and physical properties. In: HASCALL, V.C.; YANAGISHITA, M. (Eds) Hyaluronan Today, 1997. Disponível em: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>.

Heldin, P., 2003. Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation. *Braz. J. Med. Biol. Res. Brazil*, 36, 967-973.

HASHIMOTO, M; KAKEMA, T; FUJII, K. Method for producing hyaluronic acid. *European patent application*: EP2311971A1.

HOEVEN, H., GOTTSCHAL, J. Growth of mixed cultures of *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus mutans* under dual limitation of glucose and oxygen. *Microbiology Letters*, v. 62, issue 5. P. 275-283, 1989.

HEENAN, C.; ADAMS, M.; HOSKEN, R.; FLEET, G. Growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in vegetarian food products. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. Volume 35, Issue 2, March 2002, Pages 171-176.

HOLMSTRÖM, B., RICICA, J. Production of hyaluronic acid by a Streptococcal strain in batch culture. *Appl. Microbiol.*, v.15, p.1409-1413, 1967.

HOLMSTRÖM, B., RICICI, J. Production of Hyaluronic Acid by a *Streptococcal* Strain in Batch Culture. *Applied Microbiology*. v.15, p.1409-1413, 1967.

IZAWA, N; HANAMIZU, T; SONE, T. Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by *Streptococcus thermophilus* strain YIT 2084 in milk. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Volume 109, Issue 4, April 2010, Pages 356-360

JOHNS, M.R.; GOH, L.T.; OEGGERLI, A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biotechnol. Lett.*, v.16, n.5, p.507-512, 1994.

Kanchankumar PP, Chaudhari BL, Chincholkar SB (2009). Screening for pharmaceutically important exopolysaccharide producing Streptococci and partial optimization for EPS production. *Curr. Trend Biotechnol. Pharm.*, 3(3): 329-340.

KAISER, F. H., BIENZ, K. A., ECKERD, J., ZINKERNAGEL, R. M. *Medical Microbiology*. New York: Thieme Stuttgart. 2005. 697 f.

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 Microb. Technol.*, 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. *Biotechnol. Lett.*, v.29, p.17-25, 2007.

LAPCIK JR., L.; LAPCIK, L.; DE SMEDT, S.; DEMEESTE, J.; CHABRECEK, P. Hyaluronan: preparation, structure, properties and applications. *Chem. Rev.*, v.98, n.8, p.2663-2684, 1998.

LEE, G.Y; HA, S.J; JUNG, J. H. Effect of Non-animal-Derived Nitrogen Sources on the Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus* sp. KL0188. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 52(3), 283-289 (2009).

LE MARREC, C.; BOM, E.; LONVAUD-FUNEL, A. Tolerance to high osmolality of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* and identification of potential osmoprotectants. *International Journal of Food Microbiology*. 115(3):335-42. Epub 2007 Jan 26.

ARENZANA, J. M. Género *Streptococcus*: Una revisión práctica para el laboratorio de microbiología. *Programa de control externo de calidad seimc*. P 14-20 (2006).

Organotechnie. Fichas catalográficas de peptonas vegetais, acessadas no endereço eletrônico <http://www.organotechnie.com/vegetabl.htm> em março, 2011.

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.

OGRODOWSKI, C. S. **Produção de ácido hialurônico por *Streptococcus*: Estudo da fermentação e caracterização do produto.** 103 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.

PIRES, A. **Estudos metabólicos para otimização de condições nutricionais e de cultivo para produção microbiana de ácido hialurônico**. 184 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2009.

PATEL, H.; MACKINTOSH, D.; AYLING, R.; NICHOLHAS, R.; FIELDER, M. A novel medium devoid of ruminant peptone for high yield growth of *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Veterinary Microbiology*. Pp 309-314, 2008.

PIRES, A., MACEDO, A.C., EGUCHI, S.Y., SANTANA, M.H.A. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource Technology* 101, 6506-6509, 2010.

PIRES, A., SANTANA, M.H.A. Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. *Appl Biochem Biotechnol* (2010) 162, 1751–1761, 2010.

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.

SCOTT, J.E.; CUMMINGS, C.; BRASS, A.; CHEN, Y. Secondary and tertiary structures in aqueous solution: a C-13 NMR study. *PNAS*, v.96, p.4850-4855, 1999.

SCHLEIFER, K.H. Gram-positive cocci. In: SEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARP, M.E.; HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, v. 2. Baltimore: The Williams & Wilkins. 1986. p.999-10002.

SEWARD, N.; JAKUBKE, H. *Peptides: Chemistry and Biology*. Alemanha: Wiley-Vch, 2002. 562 f.

SHENE, C., CANQUIL, N., BRAVO, S., RUBILAR, M. Production of the exopolysacchzrides by *Streptococcus thermophilus*: Effect of growth conditions on fermentation kinetics and intrinsic viscosity. *International Journal of Food Microbiology*, V. 124, p. 279-284. 2008

SHERA, J., SRIPAKASH, K. S., MCMILLAN, D. J. The nutritional requirements for biofilm formation by Group A streptococcus. *International Congress Series*, v. 1289. P. 139-142. 2006.

SHU X.Z., LIU Y., PALUMBO¹ F.S., LUO Y., PRESTWICH G.D. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*, v.25, p.1339–1348, 2004.

SIATERLIS, A.; DEEPIKA, G.; CHARALAMPOPOULOS, D. Effect of culture medium and cryoprotectants in the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Letters in Applied Microbiology*. Pp 295-301, 2008.

SINGLETON, P., SAINSBURY, D. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, third edition. United Kingdown: John Wiley and Sons ltd. 2006. 895 f.

STANGOHL, S. Method and means for the production of hyaluronic acid. United States Patent n. 6,090,596, 2000.

SVENSSON, M., LOHMEIER-VOGEL, E., WAAK, E., SVENSSON, U., RADSTROM, P. Altered nucleotide sugar metabolism in *Streptococcus thermophilus* interferes with nitrogen metabolism. *Int. J. Food. Microbiol.*, v. 113, p. 195-200. 2006.

TAKAO, A., NAGAMUNE, H., MAEDA, N. Hyaluronate lyase and sialidase in the anginosus streptococci: As the putative virulence factors. *International Congress Series* 1289, p. 231-234 (2006).

TAMMI, M.I.; DAY, A.J.; TURLEY, E.A. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J. Biol. Chem.*, v.277, p.4581-4784, 2002.

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.

TORVARD, L.C., FRASER, J.E. Hyaluronan. 1992.

WEIGEL, P.H. Bacterial hyaluronan synthases – an update. *Hyaluronan today*. 2004; Available at: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html>>. Access: Aug. 01, 2010.

WIDNER, B.; BEHR, R.; VON DOLLEN, S.; TANG, M.; HEU, T.; SLOMA, A.; STERNBERG, D.; DEANGELIS, P.L.; WEIGEL, P.H.; BROWN, S. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.71,n.7, p.3747-3752, 2005.

ZHURBENKO, R.; MARTÍNEZ, C.; PÉREZ, L.; VILA, L. Caracterización de la peptona de soya para el cultivo de microorganismos. *Centro Nacional de Biopreparados*. Pp 109-118, 2006.

ZISU, B.; SHAH, N. Effects of PH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of Exopolysacharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of Dairy Science*. Pp 3405-3415, 2003.