



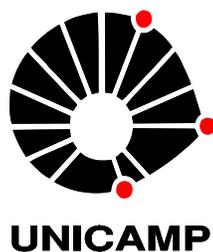
FELIPE AUGUSTO FERRARI

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR CULTIVO DE
“STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS” EM ESPUMA DE POLIURETANO**

**STUDY OF THE PRODUCTION OF HYALURONIC ACID BY
“STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS” CULTIVATION IN
POLYURETHANE FOAM**

Campinas

2012



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química

FELIPE AUGUSTO FERRARI

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR CULTIVO DE “*STREPTOCOCCUS*
ZOOEPIDEMICUS” EM ESPUMA DE POLIURETANO**

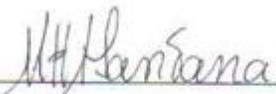
Study of the Production of Hyaluronic Acid by “*Streptococcus zooepidemicus*” Cultivation in Polyurethane Foam

Orientador(a): Profa Dra Maria Helena Andrade Santana

Co-Orientador: Prof Dr Reinaldo Gaspar Bastos

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.

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Felipe Augusto Ferrari e aprovado pela comissão julgadora em 16 de outubro de 2012.



Profa Dra Maria Helena Andrade Santana
Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos

Campinas - 2012

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

F412e Ferrari, Felipe Augusto
Estudo da produção de ácido hialurônico por cultivo de streptococcus zooepidemicus em espuma de poliuretano / Felipe Augusto Ferrari. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientadores: Maria Helena Andrade Santana
Coorientador: Reinaldo Gaspar Bastos.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Ácido hialurônico. 2. Estreptococo. 3. Fermentação. 4. Espuma. I. Santana, Maria Helena Andrade, 1951. II. Bastos, Reinaldo Gaspar. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Study of the production of hyaluronic acid by streptococcus zooepidemicus cultivation in polyurethane foam

Palavras-chave em Inglês: Hyaluronic acid, Streptococcus, Fermentation, Foam

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

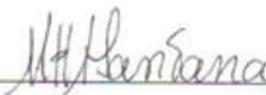
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Elias Basile Tambourgi, Gabriela Alves Macedo

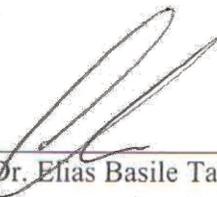
Data da defesa: 16-10-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Felipe Augusto Ferrari e aprovada em 16 de outubro de 2012 pela banca examinadora constituída pelos doutores.



Profa Dra Maria Helena Andrade Santana



Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi



Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo

Resumo

Neste trabalho estudou-se a produção de ácido hialurônico por cultivo em estado sólido de *Streptococcus zooepidemicus* em colunas de leito fixo utilizando espuma de poliuretano (EPU) como suporte inerte. Em um primeiro momento, ensaios preliminares foram desenvolvidos visando um melhor conhecimento do sistema. Constatou-se que este não apresentava robustez suficiente para a otimização e escalonamento do processo. Tendo em vista tais aspectos, foi desenvolvido um novo sistema de leito fixo, o CAS-SSF (central aeration system to solid state cultivation), que direciona o fluxo de ar diretamente no interior do leito, aumentando a eficiência na distribuição de oxigênio. Um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi desenvolvido para a concentração inicial de glicose (CIG) e aeração (Aer) objetivando a otimização para essas duas variáveis. Entretanto não foi possível estabelecer um modelo estatístico que se ajustasse satisfatoriamente aos dados experimentais, impossibilitando a análise da superfície de resposta para as variáveis em questão. Contudo, avaliando-se a CIG, pode-se observar que, dentre as condições estudadas, a concentração inicial de 15g.L^{-1} apresentou maior rendimento de AH por massa de substrato, sendo este de 0,24 g de AH por g de glicose consumida. Avaliado-se o comportamento do sistema ao longo de 12 ensaios sequências, fazendo o reuso do suporte nos cultivos, pode-se observar que a EPU manteve constante as propriedades do leito quanto ao tamanho médio dos poros e área superficial. Os valores obtidos ao longo dos ensaios não apresentaram diferença significativa ao nível de 5%, obtendo-se uma produção média de 1,24 mg de AH por grama de EPU.

Palavras-chave: ácido hialurônico, *Streptococcus zooepidemicus*, cultivo em estado sólido, espuma de poliuretano, planejamento experimental, aeração.

Abstract

In this work we studied the production of hyaluronic acid by solid state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in packed bed columns using polyurethane foam (PUF) as inert support. At first, preliminary experiment were conducted to better understanding of the system. It was verified that the system, initially employed did not have enough reliability of results for optimization and scheduling process. In view of these aspects were carried out modifications and developed a new system of packed bed, the CAS-SSC (Central Aeration System to Solid State Cultivation), to directly flow air into the bed, increasing the efficiency of oxygen distribution. A central composite rotational design (CCRD) was developed for the initial glucose concentration (IGC) and aeration (Aer) aiming the optimization for these two variables. However it was not possible to establish a statistical model that satisfactorily fits the experimental data, precluding the analysis of response surface for the variables in question. However, evaluating the IGC, among the conditions studied, the initial concentration of 15g.L^{-1} showed the highest AH yield per mass of substrate, 0.24 g of HA per g of glucose consumed. When we observe the system behavior over a sequence of 12 test, reusing the support over the cultivations, the EPU kept constant the bed properties average pore size and surface area. The values obtained during the tests showed no significant difference at 5% level, giving a average production of 1.24 mg of HA per gram of EPU.

Keywords: hyaluronic acid, *Streptococcus zooepidemicus*, solid state fermentation, polyurethane foam, experimental design, aeration.

Sumário

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xii
Abreviações.....	xiii
1. Introdução	1
1.1 Introdução Teórica.....	1
1.2 Objetivo	4
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1 História do Ácido Hialurônico (AH).....	5
2.2 Ácido Hialurônico: Estrutura Química e Comportamento em Solução	5
2.3 Fontes de Ácido Hialurônico.....	8
2.4 Mercado e Aplicações para o Ácido Hialurônico.....	9
2.5 O Ácido Hialurônico de Origem Microbiana.....	10
2.5.1 Meio de Cultivo.....	13
2.6 Cultivo em Estado Sólido.....	14
2.7 Espuma de Poliuretano como Suporte Inerte	17
2.8 Poliuretano: Histórico e Mercado.....	20
2.9 Espuma de Poliuretano	21
2.10 Referências Bibliográficas.....	23
3. Resultados e Discussão	29
3.1 Apresentação dos Resultados	29

The solid state cultivation of Streptococcus zooepidemicus in polyurethane foam as a strategy for the production of hyaluronic acid	30
4. Conclusões	51
5. Sugestões para Trabalhos Futuros.....	52

Lista de Figuras

- Figura 2.1** - Estrutura do tetrassacarídeo de uma cadeia de ácido hialurônico. (Lapcik Jr. *et al.*, 1998).....6
- Figura 2.2** – Estrutura terciária do AH em solução, com faces hidrofílicas (azuis) e hidrofóbicas (vermelhas) (Macedo, 2006, adaptado de Hascall & Laurent, 1997).....7
- Figura 2.3** - Modelos para AH em Solução (Macedo, 2011, adaptado de Cowman *et al.*, 2005).....8
- Figura 2.4** - Micrografia eletrônica de transmissão de células de *Streptococcus zooepidemicus* após cultivo em biorreator aerado. (Chong *et al.*, 2005).....11
- Figura 2.5** - Esquema para a representação da síntese de AH. À esquerda: (1) UDP-GlcNAc começa a se ligar para a formação da cadeia de AH-GlcUA-UDP intracelular; (3) AH-GlcUA-UDP é montado; (5) AH-GlcUA-UDP: UDP-GlcNAc, β -1,3 (AH-GlcUA) transferase. À direita: (2) UDP-GlcUA começa a se ligar para a formação da cadeia de AH-GlcNAc-UDP intracelular; (4) AH-GlcNAc-UDP é montado; (6) AH-GlcNAc-UDP: UDP-GlcUA, β -1,3 (AH-GlcNAc) transferase. Em ambos a extrusão em (7). (Macedo, 2011. Adaptado de Yamada & Kawasaki, 2005 e Weigel, 2004).....11
- Figura 2.6** - Esquema de uma coluna de leito fixo para cultivo em estado sólido. (Adaptado de Durand, 2003).....17

Figura 2.7 – Microscopia eletrônica de varredura de uma espuma de poliuretano flexível. (Adaptada de Lemos *et al.*,2007).....22

Figuras Artigo

Figure 1 - Schematic of the experimental setup-. A: dental compressor. B: rotameter. C: bacteriological incubator. D: packed bed columns and air humidifier. E: fan. F: air outlet.....36

Figure 2- Scanning electronic micrographs of the porous structure of the PUF and schematic representations of a longitudinal section of the PUF. A: Pore structure superimposed and interconnected in the bed (magnified 500 times). B: The dry liquid fraction, as identified by white arrows, containing culture medium rich in HA within the pores of the PUF after fermentation. Schematics of a longitudinal section of the PUF. C: Arrows indicate the location of polyurethane relative to the pores (white region) in the foam. D: Arrow indicates the biofilm formed by the culture medium in the pores of the foam.....40

Figure 3 – PUF-packed bed with central aeration (CAS). A: Inlet air in moisturizer. B: Inlet air in columns and central aeration tube. C: An aeration tube that is 10 cm long and is drilled from 8 cm toward the bottom. D: PUF-packed bed impregnated with culture medium and inoculum. E: Outlet of air from the columns.....41

Figure 4 – Capability of strain under constant stress of a dowel of PUF after reuse in 12 fermentation cycles: 1(open square), 4 (open diamond), 6 (open circle), 9 (open triangle) and 12 (x).....43

Lista de Tabelas

Table 1- Levels of the independent variables, aeration (Aer) and initial glucose concentration (CIG), in the experimental planning type Central Composite Rotational Design (CCRD).....39

Table 2- Influence of air distribution in the dowel of PUF on the production of HA.....41

Table 3 - Surface area (AS) and average pore diameter (TP) after reuse of the PUF bed in 12 consecutive cycles of SSF.....42

Table 4 - Parameters of the production of HA (PAH), yield substrate AH (YAH/S), the yield of cells on HA (YAH/X) and secondary metabolites within 24 h of cultivation.....44

Table 5 – Influence of aeration and glucose concentration according to a CCRD experimental design45

Table 6 – Lactic acid (Lac), acetic acid (Ace) and formic acid (For) in mg per g of PUF produced as intermediate metabolites in the AH synthesis (4 and 7 assays in Table 6).....45

Table 7- Assays at low aeration range with initial glucose concentration 15 g.L⁻¹47

Abreviações

Ace	Ácido Acético
ADP	Adenosina difosfato
Aer	Aeração/ Aeration
AH	Ácido Hialurônico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
CCRD	Central Composite Rotacional Design
CIG	Concentração Inicial de Glicose
ClcUA	Ácido D-glucurônico
cm	Centímetro
CTAB	Brometo de Cetil Trimetilamônio
Da	Daltons
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DO	Densidade óptica
EPU	Espuma de Poliuretano
Etoh	Etanol
FES	Fermentação em Estado Sólido

For	Ácido Fórmico
GlcNac	N-acetil- glicosamina
HA	Hyaluronic Acid
HAS	Hialuronato sintase
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
k_{1a}	Coefficiente Global de Transferência de Massa
Lac	Ácido Lático
MQD	Meio Quimicamente Definido
MSL	Massa Seca do Leito
NaCl	Cloreto de sódio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídio oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida
P_{AH/EPU.h}	Produtividade de AH por massa de EPU por hora
pH	Potencial hidrogeniônico
pK	Potencial de Dissociação
PUF	Polyurethane Foam
R²	Coefficiente de Correlação
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
UDP	Uridina difosfato

UTP	Uridina trifosfato
$Y_{HA/S}$	Coeficiente de rendimento de HA em relação à glicose
$Y_{AH/X}$	Coeficiente de rendimento de AH em relação à massa celular
$Y_{X/S}$	Coeficiente de rendimento de células em relação à glicose
Ace	Acetic Acid
Aer	Aeration
A_s	Surface Area
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CAS	Central Aeration System
CCRD	Central Composite Rotational Design
CIG	Initial Glucose Concentration
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
DO	Dissolved Oxygen
For	Formic Acid
HPLC	High-pressure (performance) liquid chromatography
HA	Hyaluronic acid
Lac	Lactic Acid
PHA	Production of Hyaluronic Acid
PUF	Poliurethane Foam

SSF	Solid-state fermentation
SF	Submerged fermentation
$Y_{HA/S}$	Yield factor for Hyaluronic acid
$Y_{HA/X}$	Yield factor for Hyaluronic acid/Cell competition
T_P	Average Pore Diameter

1. Introdução

1.1 Introdução Teórica

O ácido hialurônico (AH) consiste em um polissacarídeo de alta massa molar formado por unidades dissacarídicas polianiónicas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc), unidas alternadamente por ligações β -1-3 e β -1-4.

Em 1934, Karl Meyer e John Palmer isolaram pela primeira vez a molécula de ácido hialurônico, oriunda do humor vítreo bovino, sendo o nome desta proveniente da junção entre o termo grego hialóide (vítreo) e ácido urônico.

Soluções de ácido hialurônico têm consistência gelatinosa, alta viscoelasticidade e alto grau de hidratação devido às suas características estruturais. AH é descrito como um polieletrólito de esqueleto enovelado e estrutura semi-rígida, que ocupa um grande volume hidrodinâmico. Mesmo em baixas concentrações (1 mg.L^{-1}), as suas cadeias são capazes de interagir formando redes. Esta substância está presente em vários tecidos conjuntivos de animais e possui importantes funções como flexibilidade e manutenção da estrutura dos tecidos. Alguns órgãos são particularmente ricos em ácido hialurônico, tais como o cordão umbilical, fluido sinovial e o humor vítreo. Na pele e em cartilagens, a sua função é ligar-se à água, manter a tonicidade e elasticidade dos tecidos. Nas articulações, o AH presente nos fluidos apresenta-se como agente de lubrificação e amortecimento de impactos físicos, proporcionando proteção às células.

Devido à sua característica não-imunogênica e suas propriedades físico-químicas, o ácido hialurônico possui grande potencial de aplicação nas áreas médicas e cosmetológicas. Dentre seus usos podemos destacar os segmentos oftálmico, ortopédico, oncológico e dermatológico. Aplicações mais recentes utilizam o AH como sistema de liberação controlada de fármacos, o que demonstra seu potencial também para a indústria farmacêutica.

Seu uso pode ser dividido entre aqueles que exploram suas propriedades viscoelásticas, como cirurgia de catarata e ressecção endoscópica da mucosa, e àqueles relacionados com as funções biológicas celulares, como as aplicações de oligossacarídeos de AH em tumores. Temos ainda os casos em que as duas características são exploradas concomitantemente, como

no tratamento da osteoartrite, engenharia de tecidos *scaffolds* para crescimento e diferenciação celular, cicatrização cutânea e aplicação em condutas pós-operatórias evitando adesões.

Outro segmento de grande importância no mercado do ácido hialurônico é o da medicina estética. Formulações cosméticas que promovam o restabelecimento das características de uma pele jovem têm sido propostas, como cremes e géis para preenchimento facial.

O mercado mundial para o AH de grau médico em 2008 correspondeu a aproximadamente 1 tonelada por ano, sendo comercializado a U\$ 40000 - 60000 kg⁻¹. O volume do mercado de AH empregado no setor cosmético é cerca de 10 a 20 vezes superior, enquanto o preço se encontra na faixa de U\$ 1000 – 2000 kg⁻¹, dependendo da qualidade do produto final.

O AH pode ser extraído de diversos tecidos, como por exemplo: fluido sinovial, pele, tendões, humor vítreo, cordão umbilical e, sobretudo, da crista de galo. Contudo, a possibilidade de associação do AH de origem animal a antígenos limita e onera a sua aplicação na área médica.

Desta forma, a produção do referido polímero por cultivos microbianos vem sendo estudada e proposta como opção aos processos convencionais de extração de tecidos animais. Este cultivo apresenta um aspecto importante em relação ao material de origem animal, esse obtém um produto livre de característica antigênica, tornando os esforços na sua purificação menos onerosos.

De modo geral, tais processos envolvem micro-organismos do gênero *Streptococcus* do grupo C de *Lancefield*, em particular *Streptococcus equi* sub. *zooepidemicus*. Sob condições controláveis, este grupo de organismos pode produzir AH em maiores rendimentos pela imposição de otimizações ao processo.

O meio e as condições de cultivo são fundamentais para o desempenho dos micro-organismos em processos produtivos. Os *Streptococcus* dos grupos A e C apresentam requerimentos nutricionais fastidiosos com relação a nitrogênio orgânico. De modo geral, os meios incluem extrato de levedura, peptonas ou hidrolisado de caseína como fonte de nitrogênio. O nitrogênio orgânico foi evidenciado como grande fonte de carbono para a biossíntese celular, o que o torna essencial para um bom crescimento celular.

Para o cultivo microbiano em sistema submerso pode-se encontrar trabalhos utilizando processos contínuos, batelada e batelada alimentada. Os processos contínuos apresentam uma menor produtividade volumétrica, sendo os processos em batelada os mais estudados.

Já o processo em estado sólido ou semi-sólido, tem sido amplamente empregado nos cultivos com fungos, sobretudo os filamentosos. Produção de moléculas ativas como enzimas, ácidos orgânicos, fármacos e tratamento de resíduos estão entre os segmentos que se utilizam do processo em estado sólido.

O cultivo em estado sólido (CES) é caracterizado por ser um sistema em condições de ausência ou quase ausência de água livre. Desta forma, os micro-organismos se desenvolvem em um filme líquido formado no suporte utilizado. Recentes estudos mostraram que o AH pode ser produzido por cultivo em estado sólido, utilizando suporte natural de bagaço de caju. A grande justificativa para a utilização desse sistema é a maior disponibilidade de oxigênio à célula. Contudo, o emprego de substratos fibrosos, característicos de resíduos agro-industriais, como suporte para cultivo microbiano, apresentam alguns problemas, sobretudo em cultivos aeróbios. Suscetíveis à compactação, esses suportes apresentam limitações quanto à altura de leito de modo a preservar as características da fermentação em meio sólido, sem o acúmulo de água livre. Adicionalmente, o aumento do leito dificulta a sua aeração homogênea levando a ocorrência de caminhos preferências o que acarreta em zonas anóxicas, prejudicando o desempenho do processo. Outro ponto relevante é quanto à recuperação do meio pós-cultivo. Na etapa de extração pode ocorrer contaminação do meio por substâncias oriundas do suporte, o que não ocorre com o emprego de suportes inertes, como por exemplo a espuma de poliuretano (EPU).

A EPU é um material de fácil fabricação e de baixo valor agregado, possui alta capacidade de retenção d' água e apresenta uma estrutura estável as condições de cultivo estabelecidas no presente trabalho. O material apresenta características hidrofóbicas, o que facilita a extração do material líquido e recuperação dos produtos após o cultivo microbiano. Desta forma, estas características sugerem que a EPU pode representar um material promissor para os cultivos em estado sólido.

O emprego EPU no presente trabalho apresenta uma abordagem diferenciada do cultivo em estado sólido, onde o meio líquido encontra-se disposto em gotículas retidas em

meio à estrutura polimérica porosa da EPU e não em biofilmes como normalmente acontece nos cultivos em estado sólido.

Considerando à disponibilidade da espuma de poliuretano, bem como a sua potencialidade como suporte inerte, foi estudado no presente estudo o emprego deste material como suporte para o cultivo microbiano de *Streptococcus zooepidemicus* em colunas de leito fixo visando à produção de AH. Este trabalho dá continuidade aos estudos desenvolvidos no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos da FEQ/UNICAMP.

1.2 Objetivo

O objetivo deste trabalho é avaliar a produção de AH por cultivo em estado sólido de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em espuma de poliuretano como suporte inerte a partir de uma nova estratégia de aeração em colunas de leito fixo.

Em específico:

- avaliar a performance do novo reator em comparação ao sistema clássico das colunas de Raimbault;
- caracterizar o suporte quanto suas propriedades morfológicas;
- avaliar o comportamento do sistema quando submetido a ensaios sucessivos e reutilização do suporte;
- explorar a influência das variáveis concentração inicial de glicose e aeração sobre a produção de AH.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 História do Ácido Hialurônico (AH)

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

O ácido hialurônico é freqüentemente referenciado por hialuronato (Yamada *et al.*, 2005). Justifica-se essa referência pelo fato desta molécula estar presente na natureza ou em condições fisiológicas, na forma de um poliânion e não na forma de ácido. O uso do nome ácido hialurônico é comum, no entanto, na área farmacêutica.

Na década de 40, Meyer e outros colaboradores se dedicaram a isolar o AH de fluido das articulações, da pele, cordão umbilical e crista de galo.

Em 1937, Kendall, Heidelberger e Dawson observaram a semelhança entre um polissacarídeo da cápsula de *Streptococcus* do grupo A hemolítico e o ácido hialurônico. O procedimento de preparo original do ácido hialurônico incluía remoção de proteínas por desnaturação ou digestão proteolítica e, então, uma precipitação dos polissacarídeos com álcool ou acetona. Uma importante melhoria foi introduzida por John Scott quando desenvolveu a precipitação fracionada com uso de detergente catiônico (Laurent, 2002).

2.2 Ácido Hialurônico: Estrutura Química e Comportamento em Solução

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear de alta massa molar constituído de unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina unidos por ligações glicosídicas β -1-3 e β -1-4, (Lapcik Jr. *et al.*, 1998), conforme demonstrado na Figura 2.1.

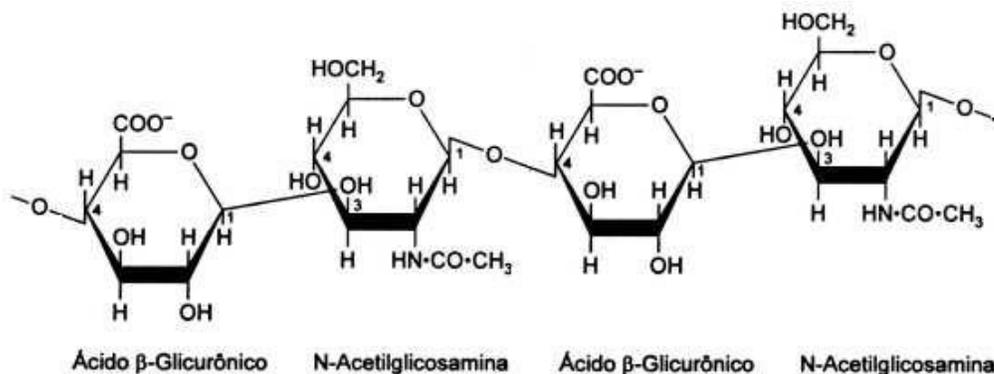


Figura 2.1: Estrutura do tetrassacarídeo de uma cadeia de ácido hialurônico. (Lapcik Jr. *et al.*, 1998).

O AH pertence a um grupo de polissacarídeos similares denominados glicosaminoglicanos, que inclui condroitina sulfato, dermatana sulfato e heparina (Lapcik Jr. *et al.*, 1998). O número de unidades dissacarídicas repetitivas na molécula de ácido hialurônico pode exceder 30.000.000, ou seja, a massa molar deste pode alcançar valores da ordem de 1×10^7 Da (Kogan *et al.*, 2007). O AH presente em tecidos saudáveis apresenta massa molar média entre 5 e 10 milhões de Daltons a qual frequentemente decresce em pacientes com doenças articulares tais como a osteoartrite (Romagnoli e Belmontesi, 2008).

Além da estrutura primária, o AH apresenta estruturas secundárias e terciárias. A estrutura secundária do AH envolve as ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares formadas em solução aquosa. Estas ligações são formadas pelos grupos acetamida, carboxilato e hidroxílico da molécula e por moléculas de água do solvente.

A estrutura tridimensional do AH, que representa sua estrutura terciária, é formada por duas cadeias antiparalelas que se enovelam formando uma estrutura de fita torcida (Figura 2.2), estabilizada através de interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Brown e Jones, 2005, Hascall e Laurent, 1997).

As regiões hidrofóbicas são responsáveis pela estabilização da formação dupla entre duas cadeias de AH, e também base da formação da rede e agregação lateral de cadeias de AH (Lapcik Jr. *et al.*, 1998).

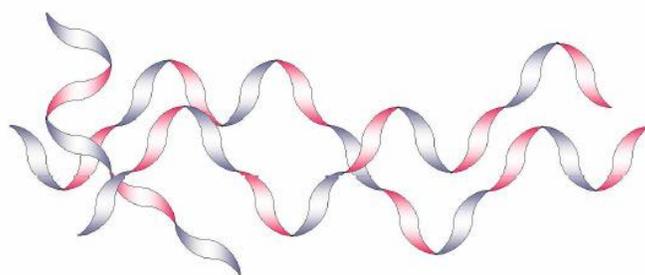


Figura 2.2: Estrutura terciária do AH em solução, com faces hidrofílicas (azuis) e hidrofóbicas (vermelhas) (Macedo, 2006, adaptado de Hascall & Laurent, 1997).

O pK dos grupos carboxílicos presentes nos resíduos de ácido D-glicurônico varia entre 3,0 e 4,0 dependendo das condições iônicas. Portanto, a pH 7,0 esses grupos estão predominantemente ionizados sendo a molécula de AH um poliânion (Hascall e Laurent, 1997). Balazs e Laurent (1951) demonstraram um padrão de viscosidade típico de polieletrólito para o AH, apresentando cargas ionizadas dos grupos carboxílicos presentes nos resíduos de ácido D-glicurônico. Essas cargas são influenciadas pela força iônica e pH do ambiente, influenciando assim a forma das cadeias e sua interação com as moléculas vizinhas. Cleland (1968) demonstrou que cadeias de AH se contraem com o aumento da força iônica e diminuição do pH, o que confirma seu comportamento de polieletrólito.

Em soluções semi diluídas ou concentradas, os domínios hidrodinâmicos das cadeias de AH se sobrepõem. Esse sistema molecular compacto apresenta propriedades viscosas e elásticas significativas, que dependem da estrutura primária e comprimento da cadeia molecular, sua conformação e concentração.

O AH é polidisperso e, dependendo de sua fonte, apresenta massa molar variando de 10^4 a 10^7 Da. As propriedades físico-químicas e fisiológicas do AH são caracterizadas por sua massa molar sendo o desempenho do produto, em muitas de suas aplicações, diretamente relacionada a esse parâmetro (Armstrong e Johns, 1997). Consequentemente, a massa molar do polímero deve ser um dos principais critérios na determinação de sua qualidade, sendo de extrema importância o controle da massa molar média e polidispersidade ao longo do processo.

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

Como resultado, Cowman *et al.* (2005) mostram prováveis formas para condensação do AH (Figura 2.3).

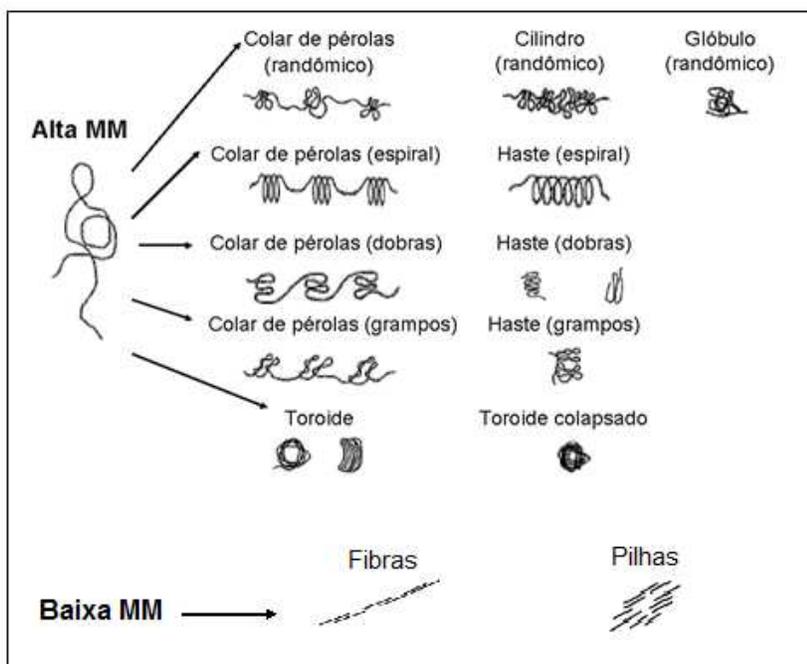


Figura 2.3: Modelos para AH em Solução (Macedo, 2011, adaptado de Cowman *et al.*, 2005)

2.3 Fontes de Ácido Hialurônico

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

Além de estar presente em tecidos animais, o AH também é encontrado em procaríotos, principalmente em *Streptococcus* dos grupos A e C de *Lancefield*, que sintetizam esse composto naturalmente como parte de sua cápsula externa (Armstrong & Johns, 1997 e Wessels *et al.*, 1991).

O AH proveniente de tecidos animais possui a mesma estrutura química que o produzido por fermentação microbiana, diferindo basicamente pela massa molar do polímero (Cooney *et al.*, 1999). Como pode ser observado na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Massa molar do Ácido Hialurônico em virtude de sua fonte.

Fonte	Massa Molar (Da)
Fluido Sinovial	1,0 – 8,0 x 10 ⁶
Cordão Umbilical	3,6 – 4,5 x 10 ⁶
Crista de Galo	1,2 – 1,4 x 10 ⁷
Humor Vítreo Bovino	3,8 – 20 x 10 ⁵
Cultivo Microbiano	2,4 – 3,4 x 10 ⁶

(Adaptado de Macedo, 2011)

Entretanto podemos ressaltar algumas desvantagens ao AH extraído e purificado de tecidos animais. (Chong, 1998).

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

2.4 Mercado e Aplicações para o Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico (AH) é não imunogênico e, portanto possui um grande potencial para aplicações médicas e cosméticas nas áreas de oftalmologia, em cirurgias oftálmicas (Balazs, 1983); ortopedia, em terapia de artrite (Balazs e Denlinger, 1993), implante de próteses; cicatrização de feridas; prevenção de adesão de tecidos em cirurgias; oncologia e dermatologia (Holmström e Ricici, 1967). Além disso, devido a suas propriedades físico-

químicas e funções biológicas, o ácido hialurônico e seus derivados modificados têm sido amplamente utilizados para administração de fármacos (Kim *et al.*, 2005; Hahn *et al.*, 2006; Vercruyse e Prestwich, 1998), engenharia de tecidos (Ohri *et al.*, 2004; West *et al.*, 1985), na prevenção de envelhecimento (Haruo e Yoshiriro, 2000, Tae-Seok *et al.*, 2004) e no preenchimento facial.

Estima-se que atualmente o mercado de AH seja superior a 1 bilhão de dólares, sendo comercializado a US \$40,000-60,000/kg. O segmento de viscosuplementação representa uma parcela substancial destes valores com grande potencial de crescimento na Europa e Ásia, com o aumento da população idosa na região. Contudo a parcela norte americana ainda representa o maior mercado deste segmento. Já na área cosmética, houve um crescimento de 21% no mercado mundial de produtos destinados ao preenchimento dérmico, somando um montante de US\$ 1,5 bilhões em vendas destes produtos em 2011. (Liu *et al.*, 2011)

Hoje há uma nova tendência no mercado do AH, em especial no segmento de preenchimento dérmico. Os produtos com a tecnologia NASHA (non-animal stabilized HA) são cada vez mais presentes, aumentando a inserção no mercado de produtos de origem microbiana. (Liu *et al.*, 2011)

2.5 O Ácido Hialurônico de Origem Microbiana

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

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

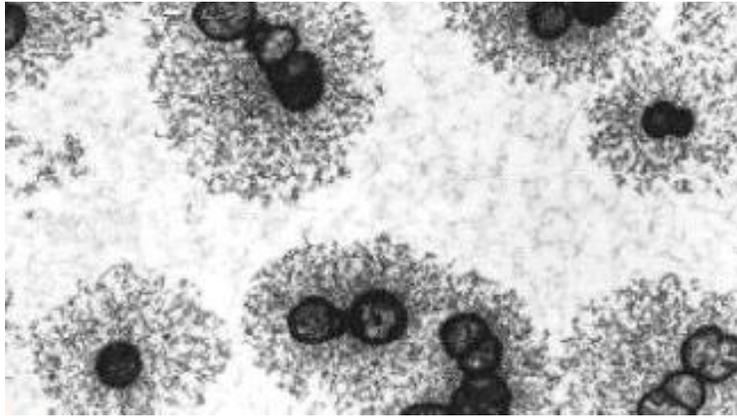


Figura 2.4: Micrografia eletrônica de transmissão de células de *Streptococcus zooepidemicus* após cultivo em biorreator aerado. (Chong *et al.*, 2005)

A síntese de AH ocorre na extremidade redutora por transferência alternada dos substratos UDP-GlcNAc e UDP-GlcAc para o UDP-hialuronato. Esse mecanismo difere das 20 sínteses de glicopeptídios e proteoglicanos, os quais são alongados na extremidade não redutora (Prehm, 1984).

Yamada e Kawasaki (2005) apresentaram em seus estudos um modelo teórico para a síntese e alongação da cadeia do AH no interior da membrana plasmática, conforme figura 2.5.

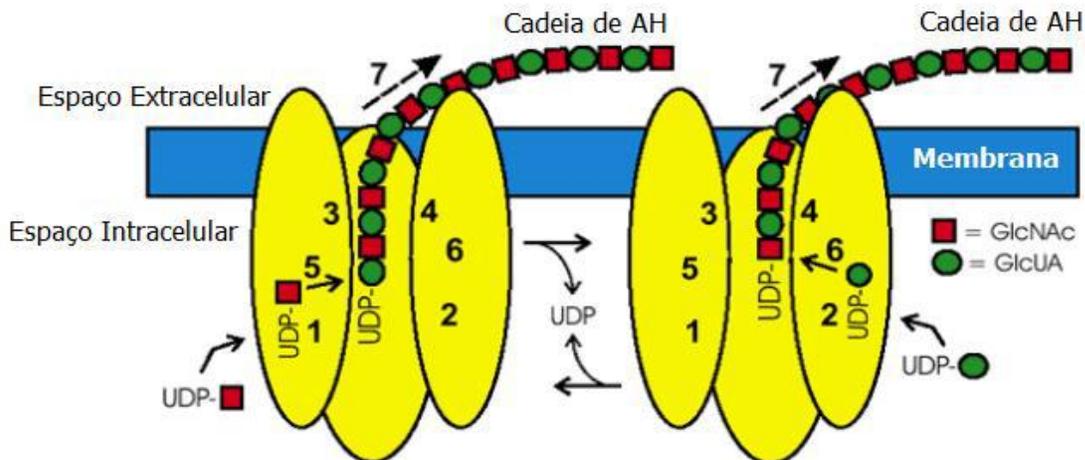


Figura 2.5: Esquema para a representação da síntese de AH. À esquerda: (1) UDP-GlcNAc começa a se ligar para a formação da cadeia de AH-GlcUA-UDP intracelular; (3) AH-GlcUA-UDP é montado; (5) AH-GlcUA-UDP: UDP-GlcNAc, β -1,3 (AH-GlcUA) transferase. À direita: (2) UDP-GlcUA começa a se ligar para a formação da cadeia de AH-GlcNAc-UDP intracelular; (4) AH-GlcNAc-UDP é montado; (6) AH-GlcNAc-UDP: UDP-GlcUA, β -1,3 (AH-GlcNAc) transferase. Em ambos a extrusão em (7). (Macedo, 2011. Adaptado de Yamada & Kawasaki, 2005).

A biossíntese do polímero é dispendiosa para o micro-organismo com relação ao consumo de energia e de carbono (Chong e Nielsen, 2003). Um total de 4 moles de ATP são consumidos para produzir 1 mol da unidade dissacarídica de AH. 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 peptidoglicano 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. 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. Em condições 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.

O AH normalmente é produzido por cultivos microbianos em batelada, uma vez que sua síntese apresenta-se instável em processos contínuos, exceto em taxas de diluição muito baixas (Blank *et al.*, 2005). A produção de AH por *Streptococcus* é conhecida por mais de 50 anos, e a maioria dos sistemas divulgados na literatura referem-se ao uso de *Streptococcus* dos grupos A e C de Lancefield, onde o grupo A é considerado patógeno humano e o grupo C, patógeno de animais. Desvantagens da utilização de cepas selvagens de *Streptococcus* incluem a produção da estreptolisina, uma vez que são β -hemolíticos, e a síntese da hialuronidase, enzima que despolimeriza AH. Assim, a utilização de mutagênese química seguida por um esquema de seleção tem sido realizada com sucesso para obtenção de mutantes não-hemolíticos e hialuronidase negativo (Kim *et al.*, 1996). Mutagênese randômica também vem sendo empregada para desenvolver cepas produtoras de AH de alta massa molar. Diversos mutantes de *S. zooepidemicus* são descritos na literatura (Akasaka *et al.*, 1989; Ellwood, *et al.*, 1996; Swann *et al.*, 1990). A cepa a ser empregada neste projeto, *S. zooepidemicus* ATCC 39920, foi previamente selecionada por nosso grupo (Lab. de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos - FEQ/UNICAMP). Esta foi depositada por Nimrod *et al.* (1988) e apresenta como principal característica grande produção de AH de alta massa molar.

Streptococcus são bactérias lácticas nutricionalmente fastidiosas que requerem meio de cultivo rico para crescimento (Armstrong *et al.*, 1997). Sob condições anaeróbias, o principal produto fermentativo derivado do catabolismo de glicose é o ácido láctico, com baixos níveis de formato, acetato e etanol. Típico para bactérias lácticas, cujas necessidades biossintéticas são supridas principalmente pela fonte de nitrogênio orgânico, maior parte do carbono é recuperado nos produtos de fermentação com baixos níveis recuperados em biomassa.

2.5.1 Meio de Cultivo

Para estudo do metabolismo da bactéria, recomenda-se um meio quimicamente definido (MQD). Variações do MQD são descritas na literatura sustentando características de crescimento similares a meios complexos (Rijn e Kessler, 1980). As formulações geralmente incluem glicose ($10-60 \text{ g.L}^{-1}$), aminoácidos, nucleotídeos, sais e vitaminas.

A fonte de carbono mais comum nos diversos trabalhos envolvendo produção de AH por fermentação é a glicose (Chong e Nielsen, 2003; Cooney *et al.*, 1999; Armstrong *et al.*, 1997; Armstrong e Johns, 1997; Kim *et al.*, 1996; Johns *et al.*, 1994). De modo geral, os meios incluem extrato de levedura, peptonas ou hidrolisado de caseína como fonte de nitrogênio e fatores de crescimento como magnésio e sais fosfato (Armstrong *et al.*, 1997). As fontes de nitrogênio orgânico são consideradas essenciais para um bom crescimento das células, visto que existem evidências que esses componentes fornecem grande parte do carbono para biossíntese celular (O'Regan *et al.*, 1994). Estudos envolvendo a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* geralmente utilizam extrato de levedura como fonte de nitrogênio orgânico por possuir os aminoácidos necessários ao organismo (Blank *et al* 2005; Ogrodowski *et al*, 2005; Cooney *et al.*, 1999; Johns *et al*, 1994).

Estudos do nosso grupo demonstraram que o efeito da fonte de nitrogênio (extrato de levedura) é muito mais significativo que o da glicose no meio, para a produção de AH (Ogrodowski *et al.*, 2004). O oxigênio é fator estimulante para a produção de AH, e determinante da sua massa molar e propriedades viscoelásticas (Ogrodowski *et al.*, 2005). Estudos metabólicos sobre a influência da concentração inicial de glicose ($0 \text{ a } 90 \text{ g.L}^{-1}$) e extrato de leveduras 60 g.L^{-1} , mostraram a melhor produção de AH a 25 g.L^{-1} de glicose (Pires e Santana, 2010).

Derivados agroindustriais tais como concentrado protéico de soja, concentrado de soro de queijo e suco de caju (componentes principais), água de maceração de milho e extrato de leveduras (suplementos) foram avaliados na produção de AH. Os melhores resultados foram obtidos com o suco de caju e extrato de leveduras, com resultados semelhantes ao meio controle (glicose e extrato de leveduras) (Pires *et al.*, 2010b).

Um estudo sistemático do efeito dos íons cálcio, magnésio, sódio, ferro, potássio, manganês, zinco e cobre, foi também realizado (Pires *et al.*, 2010a). Os resultados mostraram que para o meio de cultura contendo 25gL^{-1} de glicose e 60g L^{-1} de extrato de leveduras, a suplementação com íons é indiferente para a produção de AH. O íon sódio em excesso desfavorece a produção, porém aumenta a massa molar do AH.

Adicionalmente, o efeito de mudanças metabólicas decorrentes do controle do pH no meio, mostraram aumento da produção do AH a pH controlado em 7,0, e redução de 10^7 para 10^6 Da na sua massa molar, comparado ao cultivo em pH não controlado (Pires *et al.*, 2009). Estudos reológicos nas várias condições experimentais mostraram que para altas massas molares, da ordem de 10^6 e 10^7 Da, o módulo elástico aumentou com a concentração de AH, indicando propriedades de hiper-enovelamento das cadeias, confirmado por microscopia de força atômica (Pires *et al.*, 2009). Um estudo dos fluxos metabólicos em função da concentração inicial de glicose e controle de pH demonstraram que as mudanças nos caminhos de produção de AH foram mais relacionadas com a distribuição dos fluxos dos precursores da síntese, do que para a disponibilidade de energia ou estado redox das células (Pires e Santana, 2010).

2.6 Cultivo em Estado Sólido

A produção microbiana de AH pode ser conduzida em diferentes modos de operação, sendo os processos em batelada os mais percorridos pela literatura. (Chong *et al.*, 2005; Ellwood *et al.*, 1996, Lai *et al.*, 2012). Recentemente, os estudos conduzidos por Macedo (2011) mostraram a viabilidade na produção de AH por cultivo em estado sólido (CES), utilizando suporte natural de bagaço de caju. A justificativa para a utilização desses sistemas é a maior disponibilidade de oxigênio para as células, tendo em vista que o oxigênio é um fator

estimulante na síntese de AH, onde o polímero age como protetor à célula ao stress oxidativo (Hasegawa *et al.*, 1999, Huang *et al.*, 2006, Lai *et al.*, 2012). Além disso, o oxigênio dissolvido pode redirecionar o fluxo de carbono da produção de ácido láctico para a produção de ácido acético, o que favorece a obtenção de AH uma vez que mais ATP pode ser gerado, pois esta via bioquímica gera um mol de ATP a mais que àquela com produção de ácido (Pires e Santana, 2010; Liu *et al.*, 2011).

O CES é caracterizado pelo crescimento de micro-organismos na ausência ou próximo da ausência de água livre, sendo que o meio sólido deve apresentar umidade suficiente para manter o metabolismo microbiano. Estes processos vêm recebendo atenção especial devido às suas vantagens quando comparados aos cultivos submersos (Pandey, 1992; Rahardjo *et al.*, 2006).

Atualmente, a técnica de CES tem sido extensamente explorada devido às vantagens oferecidas principalmente no cultivo de fungos filamentosos (Hasan, 2002). Segundo afirma Pandey e colaboradores (2002), bem como Hasan (2002), houve nos últimos anos um crescente desenvolvimento dos CES com aplicação em diversas áreas, como bioremediação e biodegradação de compostos tóxicos, detoxificação biológica de resíduos agroindustriais tóxicos, biotransformação de resíduos de plantações para enriquecimento nutricional e para obtenção de produtos biologicamente ativos como metabólitos secundários, incluindo micotoxinas (aflatoxina e ocratoxina), biopesticidas (endotoxinas bacterianas), hormônios de crescimento de plantas (ácido giberélico), promotor de crescimento (zearalelona), antibióticos (penicilina, cefalosporina, cefamicina C, oxitetraciclina, iturin, surfactin e monodern), drogas imunossupressivas (ciclosporina A), ácidos orgânicos, compostos aromáticos alimentares e diversas enzimas.

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

A seleção de um substrato adequado é um ponto chave da CES. Nos CES, o material sólido não é solúvel, agindo, em muitos casos, como suporte e fonte de nutrientes. O material sólido pode ser de origem natural tal como resíduos agroindustriais ou um suporte inerte impregnado de solução nutriente (Pandey *et al.*, 2000; Ooijkaas *et al.*, 2000; Pandey, 2003).

Durand (2003) menciona que matrizes usadas como suporte nos processos em estado sólido podem variar na sua composição, tamanho, resistência mecânica, porosidade e capacidade de retenção de água.

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

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

Biorreatores de bandeja são caracterizados pela simplicidade de sua configuração, uma vez que o substrato é disposto em bandejas que normalmente são perfuradas para a facilitação da convecção do ar, não havendo aeração forçada.

Reatores agitados podem apresentar duas configurações: reatores de tambor rotatório e estáticos. A primeira configuração a agitação é promovida pela rotação do tambor em torno do eixo do motor, diferindo do segundo grupo por apresentarem agitadores mecânicos que promovem a mistura do meio sólido.

Já os reatores de leito fixo a aeração forçada é promovida através da camada de substrato. Esses biorreatores são tipicamente cilíndricos, feitos em vidro ou em plástico, com controle de temperatura feita em por meio de banho termostático ou através de camisas nas colunas (Durand,2003; Bastos 2006).

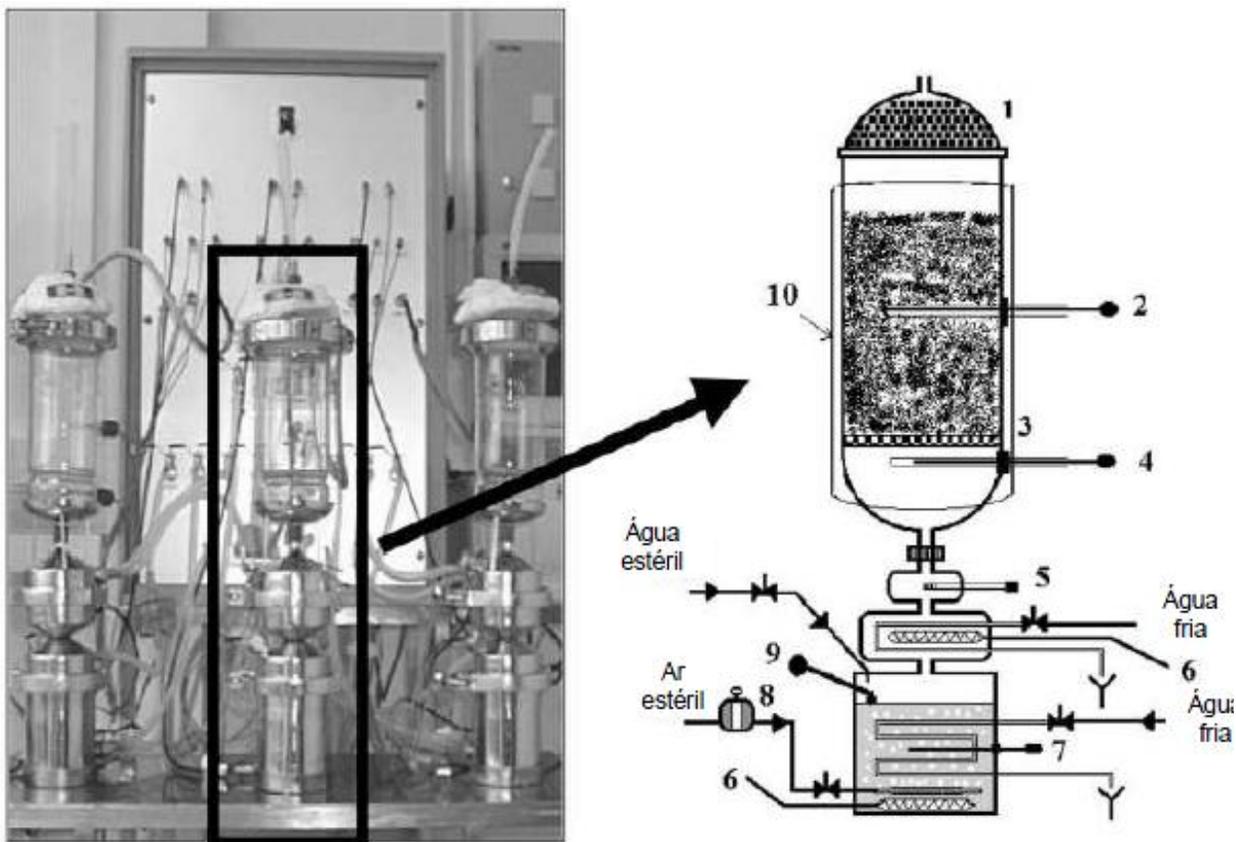


Figura 2.6: Esquema de uma coluna de leito fixo para cultivo em estado sólido. (Adaptado de Durand, 2003)

2.7 Espuma de Poliuretano como Suporte Inerte

O uso de materiais nutricionalmente inertes como suporte nos CES visa facilitar o projeto do meio nutriente, o monitoramento dos parâmetros de processo e o estudo das estratégias de escalonamento e aspectos de engenharia difíceis de serem avaliados quando são utilizados substratos sólidos orgânicos (Nagendra & Chandrasekaran, 1997). Os materiais inertes, quando impregnados com solução nutriente adequada, promovem condição de aerobiose homogênea nos reatores e minimizam as impurezas no produto de interesse.

Nos cultivos que utilizam substratos naturais, a matriz sólida serve tanto como suporte para crescimento microbiano como fonte de carbono. Estes materiais são tipicamente polissacarídeos de origem agrícola, de fontes tais como cereais, mandioca, batata, feijão e

bagaço de cana. Já os suportes inertes podem ser naturais ou sintéticos, servindo apenas como matriz para o crescimento do microrganismo. Espuma de poliuretano, poliestireno, nylon, vermiculite, alumina e amberlite têm sido utilizados como suportes inertes nos cultivos em estado sólido (Rodríguez *et al.*, 1997; Ooijkaas *et al.*, 2000; Lareo *et al.*, 2005). Segundo Ooijkaas e colaboradores (2000), os suportes inertes com meios de cultura definidos devem ser explorados uma vez que apresentam maior estabilidade do sistema ao longo do processo quando comparados a suportes não inertes.

Espumas de polipropileno foram selecionadas como suportes inertes por apresentarem área superficial adequada para adesão das células, difusão eficiente de nutrientes e oxigênio, por não serem degradadas durante os cultivos e por serem facilmente disponíveis e de baixo custo (Rodríguez *et al.*, 2001). Bastos (2006) utilizou a espuma de poliuretano como matriz sólida impregnada de solução nutriente no cultivo de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* para produção de proteínas alergênicas em coluna de leito fixo. Os resultados indicaram que o suporte sólido utilizado permitiu acentuado crescimento microbiano no filme líquido e na fase aérea, devido à alta porosidade do leito. Os altos valores de coeficiente global de transferência de massa (K_{La}) obtidos sugerem que nos cultivos usando espuma de poliuretano não houve limitação pela transferência de oxigênio.

Estudos realizados por John e colaboradores (2007) visando à produção de ácido láctico pelo cultivo em estado sólido de *Lactobacillus casei*, utilizando EPU como suporte inerte, mostrou que um maior rendimento de ácido láctico por substrato foi alcançado quando comparado ao cultivo submerso. No mesmo estudo os autores compararam os resultados obtidos com os observados na literatura utilizando resíduos agro-industriais como suporte para o cultivo em estado sólido. Esta comparação mostrou que para um mesmo sistema, diferindo apenas pelo suporte utilizado, a EPU mostrou-se mais eficiente para a produção de ácido láctico. Esta melhor resposta foi atribuída pelos autores à melhor distribuição do meio líquido pela EPU e por sua maior capacidade de retenção de meio nutritivo, quando comparada ao suporte oriundo de resíduos agro-industriais.

Outro estudo, desenvolvido por Rangaswamy e Ramakrishna (2008) fizeram uso da EPU como suporte para cultivo de *Lactobacillus delbrueckii* em colunas de leito fixo para produção de ácido láctico. Os valores obtidos pelos autores foram comparáveis aos da

literatura, contudo esses observaram que quando comparada com os demais suportes, a EPU mostra-se vantajosa tendo em vista características como ser inerte e barata, sua alta porosidade e ser passível de reutilização e autoclavagem. Tais características são observadas pelos autores como grande vantagem para processos que utilizem células imobilizadas em biofilmes e cultivos em estado sólido.

Mirón e colaboradores (2010) estudaram o tratamento de efluentes através do cultivo em estado sólido de *Aspergillus Níger* em reator de leito fixo utilizando EPU como suporte. As conclusões obtidas pelos autores foi que o cultivo em estado sólido utilizando EPU mostrou-se melhor e mais simples quando comparado ao cultivo submerso. A produtividade alcançada foi superior em comparação ao processo submerso e a recuperação do meio cultivado ocorreu por compressão do leito, simplificando e acelerando o processo para um novo cultivo.

Cultivo em estado sólido envolvendo *Xanthomonas campestris*, utilizando EPU como suporte, conduzidos por Zhang e Chen (2010) mostraram que o uso deste suporte foi eficiente para contornar os problemas de aeração tipicamente envolvidos na produção de goma xantana.

Hu e colaboradores (2011) alcançaram um incremento de 70% em rendimento na atividade enzimática de celulase para o cultivo sequencial de *Trichoderma veride*, empregando a EPU como suporte inerte em CES. Esse aumento é atribuído pelos autores, às melhoras nas transferências de calor e oxigênio no leito, conferida pelo emprego da EPU. São citadas ainda como vantagens do uso de suportes inertes, como por exemplo, a EPU, a facilitada recuperação e purificação de produtos e uma melhor avaliação dos balanços de massa, uma vez que utilizam meios de cultura definidos.

Não existem relatos na literatura a respeito de cultivos em estado sólido em colunas de leito fixo sob aeração forçada utilizando EPU como suporte para cultivos envolvendo bactérias, sobretudo produção de AH utilizando suporte inerte. Estudos de Macedo (2011), utilizando substrato caju, mostraram comparativamente o desempenho da fermentação submersa e FES na produção de AH. A FES apresentou-se promissora, com altas taxas de transferência de oxigênio, comparada à fermentação submersa. O AH produzido apresentou massa molar $10^3 - 10^4$ Da., menor que a obtida em meio de glicose e extrato de leveduras.

2.8 Poliuretano: Histórico e Mercado

Manipulado quimicamente no final da década de 1840 por Wurtz e Hoffmann, o uretano ficou por muito tempo restrito a experimentos laboratoriais. Entretanto em 1937, Otto Bayer e sua equipe deram início na Alemanha a indústria do poliuretano, explorando comercialmente e iniciando o desenvolvimento de polímeros à base de poliésteres, uma alternativa ao nylon (Alimena, 2009).

Devido à escassez de materiais a base de borracha na II Guerra Mundial, países como Estados Unidos e Inglaterra empenharam-se no desenvolvimento de alternativas utilizando produtos a base de uretano, fazendo com que o poliuretano tivesse uma maior abertura ao mercado mundial (Alimena, 2009).

Um dos grandes motivos pelo qual a espuma de poliuretano (EPU) se tornou amplamente difundida foi devido à simplicidade pela qual a reação polimérica era realizada. Utilizando uma técnica, inicialmente implantada de forma industrial na Alemanha no final da década de 50, denominada de *One Shot*, as matérias-primas são misturadas em uma só etapa, dispensando etapas de pré-polimerização. Este processo viabilizou o desenvolvimento de espumas flexíveis em larga escala, sendo utilizado ainda hoje em dia (Alimena, 2009).

No Brasil a grande expansão industrial da EPU se deu nos anos 70. Esta expansão atingiu positivamente a indústria automotiva no uso de espumas semi-flexíveis, semi-rígidas revestidas ou não com termoplásticos. Nos anos 80 a moldagem por injeção e reação se tornou comercialmente expressiva, e concomitantemente nesta época, maiores atenções foram despendidas as propriedades físico-químicas e moleculares da EPU, atingindo mercados antes não observados, como a construção civil.

Em 2010 o mercado mundial de poliuretanos foi estimado em 16 milhões de toneladas, ocupando a sexta posição com 5% de todo o mercado de plásticos consumido mundialmente. Dentro deste mercado podemos destacar os segmentos de estofados, automotivo e construção civil, somando juntos 60% do mercado. Na América - Latina, o Brasil ocupa o topo do mercado com 370 mil toneladas produzidas em 2008.

2.9 Espuma de Poliuretano

A espuma de poliuretano (EPU) é uma estrutura polimérica porosa produzida pela geração interna de um gás em um meio fluido que, simultaneamente, polimeriza e se expande volumetricamente. O produto final pode apresentar estrutura de células (bolhas) abertas, fechadas ou mista. A espuma de células fechadas tem um melhor isolamento térmico e maior resistência mecânica a compressões. Já o material com células abertas tem um melhor isolamento acústico, permeabilidade do vapor de água e gases e maior flexibilidade (Romaškevič *et al.*, 2006).

As EPU's podem ser classificadas em flexíveis, semi-flexíveis e rígidas. Espumas flexíveis apresentam um comportamento mecânico similar a uma mola, ou seja, após comprimidas recuperam suas dimensões e estrutura originais. Já as espumas rígidas quando comprimidas acabam tendo um colapso de suas estruturas internas, células, acarretando deformações muitas vezes permanentes. Os materiais ditos semi-flexíveis apresentam comportamento intermediário aos descritos, sendo destinados ao mercado de mecânica pesada (Szycher, 1999).

Espumas flexíveis apresentam um maior volume de células abertas o que permite uma melhor circulação do ar em todo o material, permanecendo flexíveis até -18°C . Em geral, as espumas flexíveis são baseados em poliéter (em especial os derivados do polioxipropileno) e polióis poliéster. Este material tem boa resistência à temperatura, entretanto apresenta instabilidade à radiação UV (Romaškevič *et al.*, 2006).

Uma das características da EPU flexível é sua alta capacidade de retenção d'água, superior a 90% (umidade em base úmida), que fica retida mecanicamente nos poros do material (Figura 2.6).

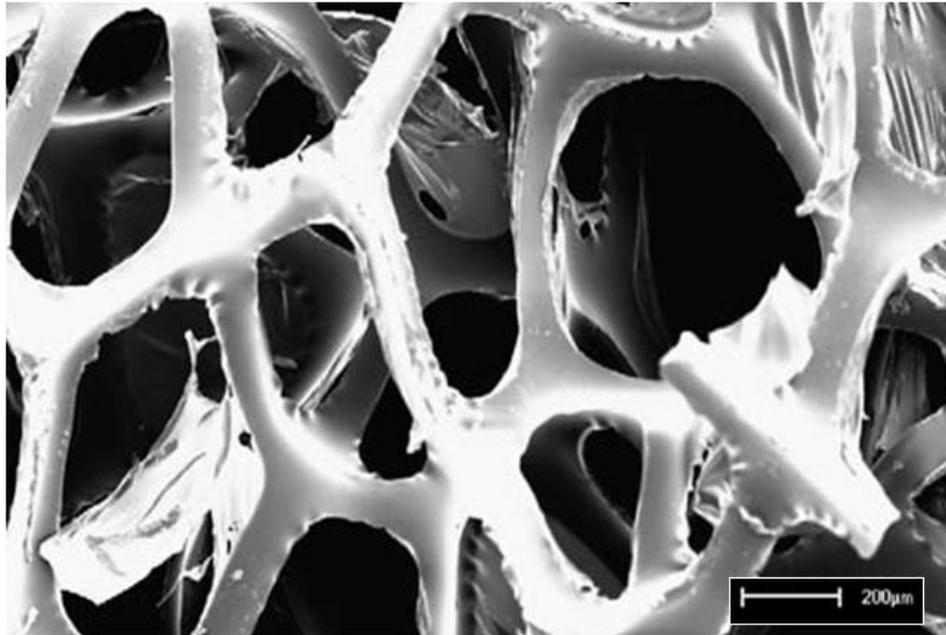


Figura 2.7: Microscopia eletrônica de varredura de uma espuma de poliuretano flexível. (Adaptada de Lemos *et al.*,2007).

O uso da EPU como suporte para processos envolvendo micro-organismos em nosso grupo teve início com o cultivo em estado sólido de *Dreschlera monoceras* onde observou-se que a porosidade e estabilidade mecânica do material foram favoráveis ao desenvolvimento celular microbiano. Outra característica observada diz respeito a sua estabilidade química quando submetido aos cultivos microbianos, o que facilita o desenvolvimento de meios quimicamente definidos, fato este de suma importância quando o processo envolve organismos nutricionalmente fastidiosos, como o *S. zooepidemicus*.

A facilidade na recuperação do meio pós-cultivo, baixo custo do material e disponibilidade foram outros pontos observados positivamente na escolha da EPU como suporte inerte no cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* para a produção do AH.

2.10 Referências Bibliográficas

- ADAM, N., GHOSH, P. Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial. **Inflammation Research**, v. 50, p.294-299, 2001.
- AKASAKA, H., KOMASAKI, H., ARAI, T. **Fermentation method for producing hyaluronic acid**. United States Patent n. 4,801,539, 1989.
- ALIMENA, L. A. M. **Estudo Comparativo do Coeficiente de Condutividade Térmica de Espuma de Poliuretano Obtida por Reciclagem Mecânica e Química**. Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2009. 56 p. Dissertação (Mestrado)
- ARMSTRONG, D.C., COONEY, M.J., JOHNS, M.R. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 47, p. 309–312, 1997.
- ARMSTRONG, D.C.; JOHNS, M.R. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 7, p. 2759–2764, 1997.
- BALAZS, E. A. Sodium hyaluronate and viscosurgery. In: MILLER, D., STEGMANN, R. Healon (sodium hyaluronate). **A guide to its use in Ophthalmic Surgery**. New York: Wiley, 1983, p. 5-28.
- BALAZS, E.A. Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use. In: GARG, H.G.; HALES, C.A. *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2004. p.415-455.
- BALAZS, E. A., DENLINGER, J. L. Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 3, n. 9, p. 20, 1993.
- BALAZS, E.A., LAURENT, T.C. Viscosity function of hyaluronic acid as a polyelectrolyte. **Journal of Polymer Science**, v.6, p.665-667, 1951.
- BASTOS, REINALDO GASPAR. **Transferência de oxigênio no cultivo em estado sólido de *Dreschlera (Helminthosporium) monoceras***. Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas (UNICAMP), 2006. 185p. Tese (Doutorado)
- BEATY, N.B., TEW, W.P.; MELLO, R.J. Relative molecular weight and concentration determination of sodium hyaluronate solutions by gel-exclusion high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.147, p.387-395, 1985.

- BITTER, T., MUIR, H.M. A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 4, p. 330 – 334, 1962.
- BLANK, L.M., MCLAUGHLIN, R.L., NIELSEN, L.K. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 6, p. 685-693, 2005.
- BLANK, L.M., MCLAUGHLIN, R.L., NIELSEN, L.K. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 6, p. 685-693, 2005.
- BROWN, M. B., JONES, S. A. Hyaluronic acid: unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. **European Academy of Dermatology and Venereology JEADV**, v.19, p. 308-318, 2005.
- CHEN, Y.H., WANG, Q. Establishment of CTAB Turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 178 – 181, 2009.
- CHONG, B.F., BLANK, L. Metabolic Engineering of Hyaluronic Acid Production. The Department of Chemical Engineering, University of Queensland, St. Lucia, Australia, 1998.
- CHONG, B.F., BLANK, L.M.; MCLAUGHLIN, R., NIELSEN, L.K. Microbial hyaluronic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n.4, p. 341-351, 2005.
- CHONG, B.F., NIELSEN, L.K. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 33-41, 2003.
- CLELAND, R.L. Iic polysaccharides. II. Comparison of polyelectrolyte behavior of hyaluronate with that of carboxymethyl cellulose. **Biopolymers**, v. 6, n.11, p.1519-1529, 1968.
- COONEY, M.J., GOH, L.-T.; LEE, P. L., JOHNS, M. R. Structured model-based analysis and control of the hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: physiological implications of glucose and complex-nitrogenlimited growth. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 898-910, 1999.
- COWMAN, M. K., MATSUOKA, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 791–809, 2005.
- DISCHE, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. **Journal of Biological Chemistry**, v.167, p.189-198, 1946.

- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, V. 13. p.113-125. 2003.
- DURAND, A., RENAUD, R., MARATRAY, J.,ALMANZA, S. The INRA-Dijon reactors: Designs and applications. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B.K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALES, G. **Advances in Solid State Fermentation. Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation.** Montpellier, França. p.75-92. 1997.
- ELLWOOD, D. C., EVANS, C. G. T., DUNN. G. M., MCINNES, N., YEO, R. G. **Production of hyaluronic acid.** United States Patent n.5,563,051. October 8,1996.
- HAHN, S. K., OH, E. J., MIYAMOTO, H., SHIMOBOUJI, T. Sustained release formulation of erythropoietin using hyaluronic acid hydrogels crosslinked by Michael addition. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 322, p. 44-51, 2006.
- HARUO, S., YOSHIRIRO, T. **Skin cosmetic.** European Patent Office n. JP 186014, 2000.
- HASAN, SALAH DIN MAHMUD. **Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* obtida por fermentação em estado sólido.** Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2002. Tese (Doutorado)
- 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>>.
- HASEGAWA, S., NAGATSURU, M., SHIBUTANI, M., YAMAMOTO, S., HASEBE, S. Productivity of concentrated hyaluronic acid using maxblend fermentor. **J Biosci Bioen**, 88, 68–71, 1999.
- HOLMSTRÖM, B., RICICA, J. Production of hyaluronic acid by a *Streptococcal* strain in batch culture. **Applied Microbiology**, v.15, p.1409-1413, 1967.
- HUANG, W.C., CHEN, S.J., CHEN, T.L. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v.32, p.239-243, 2006.
- JOHN, R.P., NAMPOOTHIRI, K.M., PANDEY, A. Polyurethane foam as an inert carrier for the production of L(+)-lactic acid by *Lactobacillus casei* under solid-state fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 44, p. 582–587, 2007.
- JOHNS, M.R.; GOH, L.T.; OEGGERLI, A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 5, p. 507-512, 1994.

- JUHLIN, L. Hyaluronan in skin. **J. Int. Med. Res.**, v.242, p.61-66, 1997.
- KIM, S. J., HAHN, S. K., KIM, M. J., KIM, D. H., LEE, Y. P. Development of a novel sustained release formulation of recombinant human growth hormone using sodium hyaluronate microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 104, p. 323-335, 2005.
- KIM, J., YOO, S., OH, D., KWEON, Y., PARK, D., LEE, C., GIL, G. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.440-445, 1996.
- KOGAN, G., SOLTES, L., STERN, R., GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. **Biotechnology Letters**, v.29, p.17-25, 2007.
- LAPCIK JR., L., LAPCIK, L., DE SMEDT, S., DEMEESTE, J., CHABRECEK, P. Hyaluronan: preparation, structure, properties and applications. **Chemical Reviews**, v. 98, n.8, p.2663-2684, 1998.
- LAREO, C., SPOSITO, A.F., BOSSIO, A.L., VOLPE, D.C. Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 38, p. 391-400, 2005.
- LEMOS, V.A., SANTOS, M.S., SANTOS, E.S., SANTOS, M.J.S., SANTOS, W.N.L., SOUZA, A.S., JESUS, D.S., VIRGENS, C.F., CARVALHO, M.S., OLESZCZUK, N., VALE, M.G.R., WELZ, B., FERREIRA, S.L.C. Application of polyurethane foam as a sorbent for trace metal pre-concentration — A review. **Spectrochimica Acta**, vol. B, no. 62, p.4–12, 2007.
- LIU, L., LIU, Y., LI, J., DU, G., CHEN, J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. **Microbial Cell Factories**, 10:99, 2011.
- MACEDO, ANDRÉ CASIMIRO. **Estudo da Produção de Ácido Hialurônico por Fermentação de *Streptococcus zooepidemicus* em Substrato de Caju (*Anacardium occidentale L.*)**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2007. 193p. Dissertação (Mestrado)
- MACEDO, ANDRÉ CASIMIRO. **Produção de Ácido Hialurônico pro Cultivo em Estado Sólido de *Streptococcus zooepidemicus* em Bagaço de Caju**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2011. 190 p. Tese (Doutorado)
- MIRÓN, J., VÁZQUEZ, J. A., GONZÁLEZ, P., MURADO, M. A. Enhancement glucose oxidase production by solid-state fermentation of *Aspergillus niger* on polyurethane

- foams using mussel processing wastewaters. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 46, p.21–27, 2010.
- MITCHELL, D.A., KRIEGER, N., STUART, D.M., PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, V. 35, p. 1211-1255. 2000.
- NAGENDRA PRABHU, G., CHANDRASEKARAN, M. Impact of process parameters on L-glutaminase production by marine *Vibrio costicola* in solid state fermentation using polystyrene as an inert support. **Process Biochemistry**, V.32, p.285-289, 1997.
- NIMROD, A., GREENMAM, B., KANNER, D.; MOSHE, B. AND LANDSBERG, Y. **Method of producing high molecular weight sodium hyalluronate by fermentation of streptococcus**. United State Patent: 4,780,414, 1988.
- 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: Anais do CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2004, Curitiba.
- OGRODOWSKI, C.S., HOKKA, C.O., SANTANA, M.H.A. Production of hyaluronic acid by *Streptococcus*: the effects of the addition of lysozyme and aeration on the formation and the rheological properties of the product. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p.121-124, 2005.
- OHRI, R., HAHN, S. K., STAYTON, P. S., HOFFMAN, A. S., GIACHELLI, M. Hyaluronic acid grafting mitigates calcification of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 70 A, p. 159–165, 2004.
- OOIJKAAS, L.P., WEBER, F.J., BUITELAAR, R.M., TRAMPER, J., RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **Trends in Biotechnology**, V.18. p.355-360. 2000.
- O'REGAN, M., MARTINI, I., CRESCENZI, F., DE LUCA, C, LANSING, M. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. **Int J Biol Macromol**;16: 283-286, 1994
- PANDEY, A., RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. **Enzyme Microbiology Technology**, V.14, p.486-488. 1992.
- PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. V.13.p.81-84. 2003.

- PANDEY, A., SOCCOL, C.R., MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-Bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, V.35, p.1153-1169. 2000.
- PIRES, ALINE MARA BARBOSA. **Estudos Metabólicos para Otimização de Condições Nutricionais e de Cultivo para Produção Microbiana de Ácido Hilurônico**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas (UNICAMP), 2009. Tese (Doutorado)
- PIRES, A. M. B. e SANTANA, M. H. A. Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. **Appl Biochem Biotechnol**, 162:1751–1761. 2010
- PIRES, A. M. B.; SANTANA, M. H. A. e EGUCHI, S. Y. The Influence of Mineral Ions on the Microbial Production and Molecular Weight of Hyaluronic Acid. **Appl Biochem Biotechnol**, 162:2125–2135, 2010
- PREHM, P. Hyaluronan. In: VANDAMME, E.J.; DE BAETS, S., STEINBUHEL, A. **Biopolymers: biology, chemistry, biotechnology, applications**. v.5. Polysaccharides I. Polysaccharides from prokaryotes. Weinheim: Wiley, VCH, 2000. p. 379-404.
- Química e Tecnologia dos Poliuretanos. Mercado. Disponível em: <<http://www.poliuretanos.com.br/>>. Acesso em: 15 de novembro de 2011.
- RAHARDJO, Y.S.P., TRAMPER, J., RINZEMA, A. Modelling conversion and transport phenomena in solid state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, V. 24, p.161-179. 2006.
- RANGASWAMY, V. E RAMAKRISHNA, S.V. Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a dual reactor system using packed bed biofilm reactor. **Letters in Applied Microbiology**, n 46, p.661–666, 2008.
- RIJN, I., KESSLER, R. E. Growth characteristics of group A *Streptococci* in a new chemically defined medium. **Infect. Immun.**, v.27, p.445-448, 1980.
- RODRIGUEZ, M. I. e LEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas: Carita, 2009, 358 p.
- RODRIGUEZ C .S., DOMINGUEZ A., SANROMÁN A. Utilization of lignocellulosic wastes for lignin peroxidase production by semisolid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium* **Biodegradation**, V. 12, p.283–289. 2001.
- RODRIGUEZ, C.S.; SANTORO, R.; CAMESELLE, C.; SANROMAN, A.. Laccase production in semi-solid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n.10, p 995-998, 1997.

- ROMAGNOLI, M.; BELMONTESI, M. Hyaluronic acid-based fillers: theory and practice. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 123-159, 2008.
- ROMAŠKEVIČ, T., BUDRIENĖ, S., PIELICHOWSKI, K., PIELICHOWSKI, J. Application of Polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. **CHEMIJA**, vol. 17, no. 4. p. 74–89, 2006.
- SCOTT, J.E.; CUMMINGS, C.; BRASS, A.; CHEN, Y. Secondary and tertiary structures in aqueous solution: a C-13 NMR study. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, v.96, p.4850-4855, 1999.
- ŠOLTÉS, L., MENDICHI, R., KOGAN, G., SCHILLER, J., STANKOVSKÁ, M., ARNHOLD, J. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. **Biomacromolecules**, v.7, p. 659-668, 2006.
- SONG, J.M., IM, J.H., KANG, J.H., KANG, D.J. A simple method for hyaluronic acid quantification in culture broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 633 – 634, 2009.
- SWANN, D. A.; SULLIVAN, B. P.; JAMIESON, G.; RICHARDSON, K. R.; SINGH, T. **Biosynthesis of hyaluronic acid**. United States Patent: 4,897,349, 1990.
- SZYCHER, M. **Szycher's Handbook of Polyurethane**. Florida: CRC Press LLC, 1999, 696 p.
- VERCRUYSSSE, K. P., PRESTWICH, G. D. Hyaluronate derivatives in drug delivery. **Critical Reviews™ . Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 15, p. 513-555, 1998.
- WESSELS, M.R., MOSES, A.E., GOLDBERG, J.B, DICESARE, T.J., Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A *streptococci*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Oct 1;88(19):8317–8321, 1991
- WEST, D. C., HAMPSON, I. N., ARNOLD, F., KUMAR, S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. **Science**, v. 228, p.1324–1326, 1985.
- YAMADA, T., KAWASAKI, T. Microbial Synthesis of Hyaluronan and Chitin: New Approaches. **J. Biosci. Bioeng.**, Vol. 99, 521-528 , 2005 .

3. Resultados e Discussão

3.1 Apresentação dos Resultados

Neste capítulo serão apresentados os resultados na forma de artigo científico, que será submetido junto ao periódico *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.

Cultivo em estado sólido de *Streptococcus zooepidemicus* em espuma de poliuretano como estratégia para a produção de ácido hialurônico

Resumo - O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero com importantes aplicações nos campos farmacêutico, médico e cosmético. Este trabalho explora o potencial da espuma de poliuretano como suporte inerte, em um sistema de aeração central como estratégia para a produção de AH. Os objetivos foram favorecer a transferência de oxigênio para a fase líquida formada pelo meio de cultivo retido no interior dos poros do suporte, conferindo uma elevada área superficial, sob uma nova estratégia de aeração, e maior facilidade na recuperação do meio pós-cultivo. Os rendimentos resultantes para AH/células foram maiores que 1, havendo completa recuperação do polímero através da prensagem da espuma. As condições empregadas para o desvio do metabolismo energético visando à produção de HA foram aeração e a concentração inicial de glicose. A produção de AH foi reprodutível em 12 ciclos sucessivos de fermentação. Estes resultados contribuem para o desenvolvimento de estratégias eficazes para a produção controlada e a recuperação do AH.

The solid state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in polyurethane foam as a strategy for the production of hyaluronic acid

F.A. Ferrari¹, R.G. Bastos² and M.H.A. Santana¹

¹ University of Campinas, School of Chemical Engineering

13083-852, Campinas-SP, Brazil

² Federal University of São Carlos, Center for Agricultural Sciences

13600-970, Araras-SP, Brazil

* Corresponding author: Phone: +55 19 3521 3921; Fax: +55 19 3521 3890
E-mail address: mariahelena.santana@gmail.com

Abstract – Hyaluronic acid (HA) is a biopolymer with important applications in the pharmaceutical, medical and cosmetic fields. This work explores the potentialities of a cylindrical polyurethane foam dowel with central aeration as a novel packed bed bioreactor for the production of HA. The goals were to provide a large surface area for oxygen transfer through the patches of liquid film that form in the pores of the foam in which cell proliferation and HA production occur and to easily recover the HA produced. The resulting yields of HA/cell were higher than 1, and the produced HA was completely recovered by pressing the foam. The external conditions that inhibit catabolism, the deviation of energetic metabolism toward the production of HA, were modulated by aeration and the initial glucose concentration. The production of HA was reproducible in 12 successive fermentation cycles. These findings contribute to the development of efficient strategies for the controlled production and recovery of HA.

Keywords hyaluronic acid, polyurethane foam, *Streptococcus zooepidemicus*.

1. Introduction

Hyaluronic acid (HA) is an unbranched glycosaminoglycan copolymer of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine (Weissman and Meyer, 1954). HA is usually a high value-added product that can cost 2,000 to 60,000 USD / Kg depending on the degree of purity and the final physico-chemical characteristics, such as molecular weight (Kogan et al., 2007). In the last 20 years, the microbial production of HA has advanced with respect to process control and the reduction of toxic effects as compared with cockscomb as an animal source (O'Regan et al., 1994; Chong et al., 2005; Liu et al., 2011). HA is synthesized within the plasma membrane of prokaryotes, especially Streptococcus group A and C Lancefield, as a linear capsular polymer (Wessels et al., 1991; Armstrong and Johns, 1997; Liu et al. 2011). The microbial synthesis of HA is a process with an intense energy demand that requires nutrition (Ruffing and Chen, 2006). The metabolic pathways that provide the precursors for the synthesis of HA also provide the structural constituents of bacterial cell wall peptidoglycan and teichoic acids (Chong and Nielsen, 2003, Chong et al. 2005). Thus, the synthesis of HA competes with cell growth for the available carbon source because they have the same precursors, UDP-N-acetyl-glucosamine and UDP-glucuronic acid (Liu et al. 2008; Liu et al. 2011). Furthermore, lactic and acetic acids are the main intermediate metabolites for cell growth and the synthesis of HA.

However, bacteria can alter cellular metabolism and hence the direction of the carbon flux in response to changes in environmental parameters and cultivation conditions. Aeration is an important parameter because it redirects the flow of carbon from lactic acid to acetic acid to favor HA synthesis once more ATP can be generated (3 mol ATP/ mol of glucose toward acetic acid to 2 mol ATP/ mol of glucose toward lactate production). Additionally, oxygen

also stimulates the production of HA by protecting cells from oxidative stress (Hasegawa et al., 1999, Huang et al. 2006). Various studies mention the production of HA as a cellular defense mechanism against the toxic effects of oxygen, especially those from the univalent reduction of molecular oxygen and hydroxyl free radicals (Cleary and Larkin 1979; Kogan et al. 2007; Liu et al. 2009). Studies by Hasegawa et al. (1999) and Ogradowski (2006) showed the increased production of HA as a result of higher rates of aeration in submerged fermentation (SF) with different *Streptococcus zooepidemicus* strains. Huang et al. (2006) explored the effects of dissolved oxygen (DO) on the production of HA by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. The SFs were carried out at 1 vvm, with 20 g/L glucose and controlled DO. The authors observed that the cells grew equally as well under both aerobic and anaerobic conditions. The authors noted a critical DO level of 5% air saturation for HA synthesis. The maximum yield of HA/cell ($Y_{HA/X}$) was 0.76. The results were unchanged when the glucose concentration was reduced by half. Pires and Santana (2010) carried out SFs at 2 vvm (non-controlled DO) with initial glucose concentrations (IGCs) in the range of 5 to 90 g/L. They observed that only at 25 g/L was there a higher glucose conversion into HA than into cells, which corresponded to the yield coefficient value ($Y_{HA/X}$ 1.6). This last result, which had no precedent in the literature, indicated an inversion of the carbon source direction to HA synthesis at the expense of cell growth in acidifying cultivation (non-controlled pH).

In addition to the SF of cashew apple juice (Macedo, 2011), we also studied the production of low molecular weight HA by solid state fermentation (SSF) using the juice (45 g/l glucose and the same concentration of fructose) of moisturized cashew apple fruit bagasse. The SSFs were conducted in Raimbault columns with air (1 L/min) continuously fed and distributed at the bottom of the columns. The production of HA through SSF was significant. Each 1 kg of

total cashew fruit yielded 761.25 mg HA from SSF compared to 1.790 mg HA from SF. The production of HA increased from 0.18 to 0.28 mg g⁻¹ h⁻¹ when the ascorbate concentration ranged from 1.7 to 10 mg.mL⁻¹. The maximum yield Y_{HA/X} was 0.743.

Thus, the use of SSF for the production of HA can be justified by the greater oxygen availability when compared to SF. However, the use of fibrous substrates, including most agroindustrial wastes, exhibits undesirable characteristics because they are susceptible to compaction, tend to lose their mechanical properties and exhibit changes in geometry that change the properties of the bed of solid particles, as verified by Bastos (2006) in studies with wheat bran. Furthermore, the increase of the bed of solids in process scale-up hampers homogeneous aeration and inevitably leads to the occurrence of preferential paths and areas limited by oxygen availability. The product recovery was difficult and susceptible to contamination of the product by substances originating from the support (Zhu et al. 1994; Chen and Zhang, 2010, Sabu et al., 2001).

In addition to polystyrene, nylon, vermiculite, alumina and amberlite, polyurethane foam (PUF) cut into small pieces is one of the most commonly used inert supports due to its ability to maintain its physical structure and its ability to be reused (Lareo et al. 2005). To avoid changing the porosity of the bioreactor when the bed is packed, Bastos (2006) also used PUF as a cylindrical dowel filling a glass column for the cultivation of *Drechslera monoceras*.

Considering the above aspects, we extended the previous findings by studying the production of HA in a bioreactor filled with a cylindrical dowel of PUF as a nutritionally inert support. Our hypothesis was that the biofilm formed in the large pores of the PUF structure could benefit oxygen transfer, cell growth and the production of HA.

Initially, the dowel of PUF was characterized in terms of density, pore size and morphology, surface area and tensile strength. Next, the bioreactor assembly was standardized for efficient distribution of air and reproducibility of the experimental data. The influence of aeration was prospected together with the glucose concentration. Finally, the re-use of the PUF in successive fermentation cycles was determined by the ability to maintain its structural properties and the production of HA.

2. MATERIALS AND METHODS

Characterization of PUF

We used a popular PUF that is usually sold for fillings. The PUF was acquired as a block, from which the small dowels were cut.

Apparent density - Small PUF dowels were cut into cylinders 30 mm in diameter and height. The material was dried in an oven at 95 °C for 12 hours and weighed. The apparent density was then determined by the ratio of dry weight / volume.

Maximum capability for water retention – The PUF dowels were submerged in water at 20°C, to saturation. The retained water was determined by subtracting the weight of the dry PUF from the weight of the saturated PUF. The maximum capability of water retention was the ratio between the retained water and the total weight of the saturated PUF expressed as a percentage.

Surface area and pore size - The surface area of the PUF was determined by Braunauer, Emmet and Teller method (BET) isotherms obtained by nitrogen physisorption

(BET Surface Area ASAP 2010 equipment). The samples were previously dried at 95 °C for 12 hours.

Morphology – The micrographs were obtained with a scanning electron microscope with an energy dispersive detector X-ray (EDS Leo 440i: 6070 LEO Electron Microscopy). The samples were previously coated with gold.

Resistance to tensile stress - The cylindrical PUF dowels were subjected to tensile stress assays in servo-hydraulic equipment (model 810-FlexTest 40, manufacturer MTS) to evaluate the mechanical resistance with a load cell of 1.5 kN and an initial 30 mm distance between the grips. These conditions were chosen to overestimate the stress imparted by pressing the dowels to extract cells and HA, aeration and autoclaving.

Culture maintenance and inoculum preparation - The stock culture was maintained frozen, at -80°C, in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 10% glycerol. The pre-inoculum was prepared by streaking the culture onto BHI agar plates supplemented with 5% sheep blood and incubated at 37°C for 24 h. The colonies were then transferred into the culture medium in shake flasks incubated at 37°C in a reciprocal shaker at 150 rpm for 12 h.

Culture medium- The synthetic medium contained 60 gL⁻¹ yeast extract as first reported by Swann et al. (1990) and adapted by Pires and Santana (2010). The pH was adjusted to 7.0 prior to sterilization. The glucose solution was autoclaved separately and added to the medium to obtain initial glucose concentrations in the range of 15 to 45 gL⁻¹.

Experimental setup- The cylindrical dowels (100 mm in height and 30 mm in diameter) filled glass columns with the same diameter to form a packed bed bioreactor.

Sterilization was performed by autoclaving for 20 min at 120 °C. The system was aerated with saturated air supplied by a dental compressor and humidified by bubbling into water before it entered the column. The air flow was measured by a rotameter placed at the outlet of the system. To control the temperature, the columns were placed in a bacteriological incubator at 37 °C. An internal fan was used to better homogenize the temperature, as shown in Figure 1. The cultivations were conducted for 24 h.

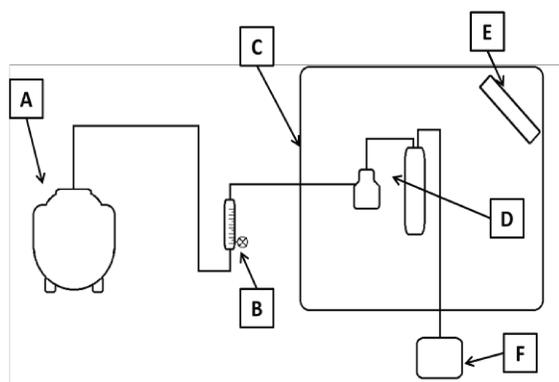


Fig. 1–Schematic of the experimental setup- **A:** dental compressor. **B:** rotameter. **C:** bacteriological incubator. **D:** packed bed columns and air humidifier. **E:** fan. **F:** air outlet.

Solid state fermentations

The SSFs were carried out in two packed bed bioreactor types: first in in with conventional aeration (Raimbault Columns) in which the moisturized air was fed at the bottom of the columns (Raimbault e Viniegra-Gonzales, 1997). Second, air was distributed along the bed through a central pipe with small side holes composing a central aeration system (CAS) that was developed in this work. The initial moisture was maintained at 80% (moisturized basis)

by impregnation of the previously sterilized PUF with the culture medium plus the inoculum (10% in volume).

Recovery of HA - The extract containing HA and cells was obtained by manual pressing of the PUF, followed by washing with Milli-Q water. The PUF was then centrifuged at 3,200 rpm for 30 minutes to separate the cells, and the HA was precipitated from the cell-free supernatant with ethanol in a proportion of 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down and remained at 4°C during the 1-hour precipitation of HA. The HA precipitated was re-dissolved in a 0,15 mol.L⁻¹ sodium chloride solution. Three steps of precipitation and re-dissolution were performed to increase the yield of HA precipitated.

Evaluation of PUF bed reuse- The reuse of the bed of PUF was evaluated through its structural characterization after the assays. The main stress of the PUF bed was due to various pressing steps to extract the culture medium and recover the HA. The structure of the PUF bed was characterized by measuring pore sizes, morphology and mechanical strain after 12 repeated fermentations in which the production of HA and its metabolites was also characterized.

Analytical Methodology

Concentrations of glucose, 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 HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a 7.8 mm x 300 mm HPX-87H fast acid Aminex column (Bio-Rad, Hercules, CA., USA). The mobile phase was composed of 0.004 mol.L⁻¹ H₂SO₄ pumped at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹ as described by Chong and Nielsen (2003). The column was

maintained at 65°C. The peak elution profile was monitored with a Shimadzu RID-6A refractive index detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

HA concentration - The HA concentration was determined with the CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) reagent (Chen and Wang, 2009). Sodium hyaluronate (Hylumed™) from Genzyme Corporation (Cambridge, Massachusetts, USA) was used as a standard.

Biomass Concentration – The concentration of cells in the culture medium was determined by a pre-determined standard curve between the dry weight of the cells and the absorbance measured at 600 nm.

Exploration of the influence of aeration and initial concentration of glucose- Aeration and initial glucose concentration were jointly explored through an experimental planning Central Composite Rotational Design (CCRD) and statistical analysis. The response variables were the yields of HA related to glucose ($Y_{AH/S}$), to biomass ($Y_{AH/X}$) and the productivity of HA from 24^h cultivation. All responses were expressed per gram of PUF.

The levels of the independent variables, aeration and initial glucose concentration, are shown in Table 1. The results were analyzed by the CCRD Statistica 8 (StatSoft ®) considering the reproducibility of the system, by three repetitions under the conditions of the central point (Rodrigues and Lemma, 2009).

Table 1- Levels of the independent variables, aeration (Aer) and initial glucose concentration (CIG), in the experimental planning type Central Composite Rotational Design (CCRD)

Variables	Levels CCRD				
	-1.41	-1	0	+1	+1.41
CIG (g.L ⁻¹)	15	19.4	30	40.7	45
Aer (L.min ⁻¹)	0.05	0.20	0.53	0.86	1.00

Additional assays were carried out at the best initial glucose concentration given by the CCRD but with low aeration (0.02 to 0.1 L/min).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the PUF

The polyurethane foam used in the experiments had an average bulk density of 23 kg.m⁻³ and a maximum water retention of 98%. The medium pore size was 43.5 Å, and the surface area was 1.4 m²/g. Figure 2 shows the morphology, organization of the pores and the biofilm formed in the PUF.

Figures 2A, B, C and D illustrate the structure of the interconnected pores of the PUF in which the culture medium is distributed by dividing the liquid phase into portions of smaller volume. Consequently, large patches of biofilm are formed in the pore structure superimposed and interconnected in the bed of PUF.

Despite the large area for cell growth and for oxygen transfer in the patches of liquid, this porous structure is limited by the stability of biofilm for which the air flow and the viscosity mainly imparted by the production of HA play an important role. High flow rates can disrupt the biofilms with displacement of the liquid phase among pores, causing damage to the growth of cells and to the synthesis of HA.

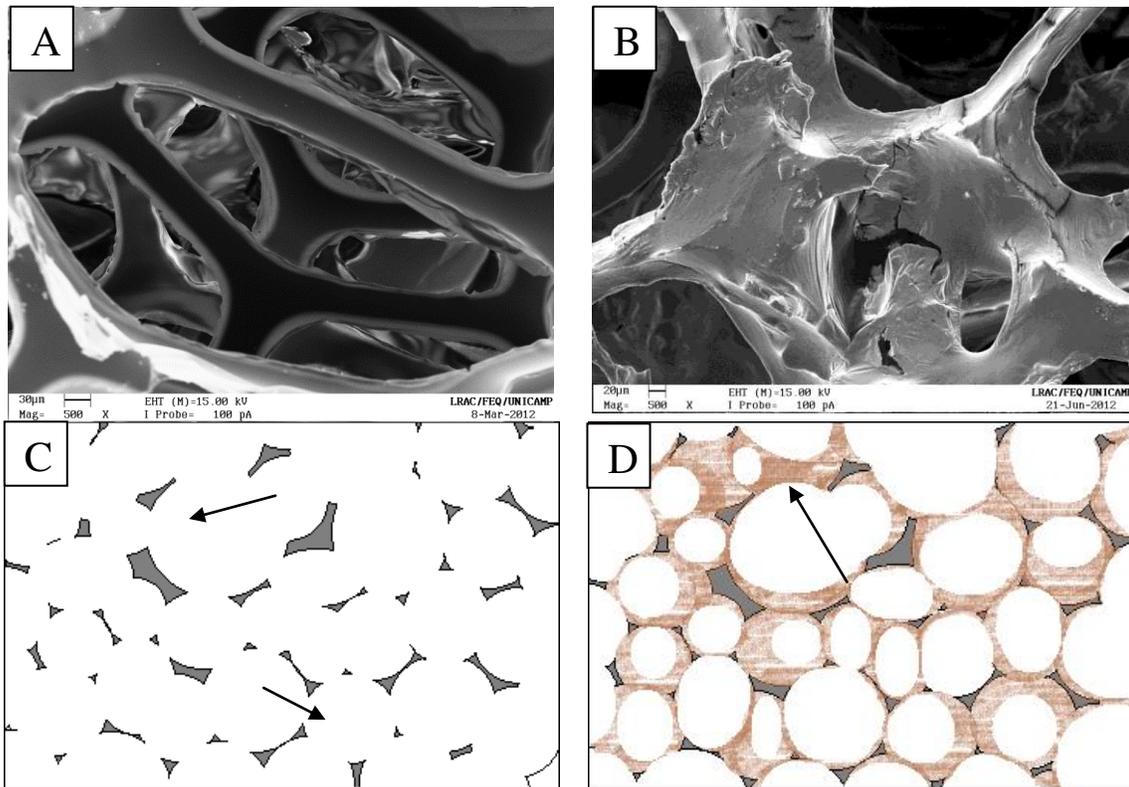


Fig 2- Scanning electronic micrographs of the porous structure of the PUF and schematic representations of a longitudinal section of the PUF. A: Pore structure superimposed and interconnected in the bed (magnified 500 times). B: The dry liquid fraction, as identified by white arrows, containing culture medium rich in HA within the pores of the PUF after fermentation. Schematics of a longitudinal section of the PUF. C: Arrows indicate the location of polyurethane relative to the pores (white region) in the foam. D: Arrow indicates the biofilm formed by the culture medium in the pores of the foam.

Therefore, the interplay between the air flow rate and initial glucose concentration are the key points that control the success of this PUF strategy for the production of HA.

Performance of the central aeration system

Table 2 shows the reproducibility of the data and the improved performance of HA production, due to the better air distribution imparted by CAS, compared to HA production with distribution of air at the bottom of the column, as performed in the conventional

Raimbault column. The production of HA was carried out in triplicate in two independent fermentations.

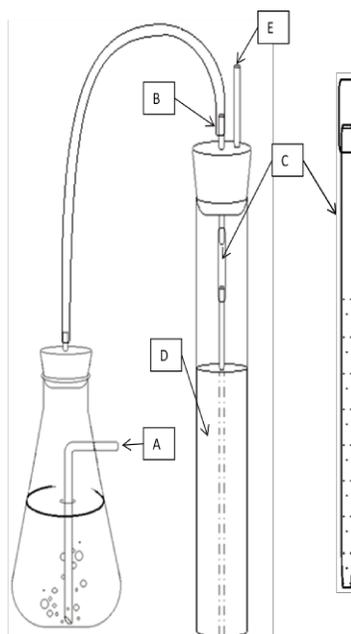


Fig 3 – PUF-packed bed with central aeration (CAS). A: Inlet air in moisturizer. B: Inlet air in columns and central aeration tube. C: An aeration tube that is 10 cm long and is drilled from 8 cm toward the bottom. D: PUF-packed bed impregnated with culture medium and inoculum. E: Outlet of air from the columns.

Therefore, the bioreactor aerated by CAS and the maintenance of the packing bed by the cylindrical dowel of PUF make it robust for mounting and operating and ensure reproducibility of the results.

Table 2- Influence of air distribution in the dowel of PUF on the production of HA after 24 h.

Assays	AH Production (mg/ g of support)
Conventional Aeration (Raimbault Columns)	0.05 ± 0.01
CAS-SSF	0.10 ± 0.01

The reuse of the bed of PUF

The structural changes of the PUF bed after a sequence of 12 independent fermentations are shown in Table 3. The surface area changed little over the 12 trials, thereby ensuring the maintenance of the biofilm thickness, the capability for aeration, moisturizing and distribution of the liquid phase in the porous structure. Zhang and Chen (2010) reported that the surface area of the PUF was the main factor responsible for the efficiency of the aeration system for the production of xanthan gum by SSF.

Table 3 - Surface area (A_S) and average pore diameter (T_P) after reuse of the PUF bed in 12 consecutive cycles of SSF.

Assays	A_S ($m^2 \cdot g^{-1}$)	T_P (\AA)
1	1.31	41.9
4	1.33	43.4
6	1.77	45.7
9	1.23	42.6
12	1.45	43.8

Figure 4 shows stress vs. strain data, as an evaluation of the mechanical resistance of the PUF bed imparted by the successive compressions for separating the cells in the various cycles of fermentation, as well as by thermal treatment in an autoclave. The data show a decrease in the deformation capacity of the PUF bed under constant stress of 0.10 MPa. A variation of approximately 3% was observed in four cycles, increased to 11% after six cycles, and remained at approximately 30% at the end of the ninth and twelfth cycles. Studies of Dai and colleagues (2002) showed no degradation of PUF under sterilization in an autoclave up to a temperature of 150 °C. Thus, we can consider the sterilization result a minimal contribution

to the mechanical changes. Therefore, the successive compressions are mainly responsible for the changes in the stress tests.

The reuse of the support was also evaluated in SSF. Table 4 shows the production parameters of HA (P_{AH}), yield substrate AH ($Y_{AH/S}$), the yield of cells on HA ($Y_{AH/X}$) and secondary metabolites within 24 h of cultivation.

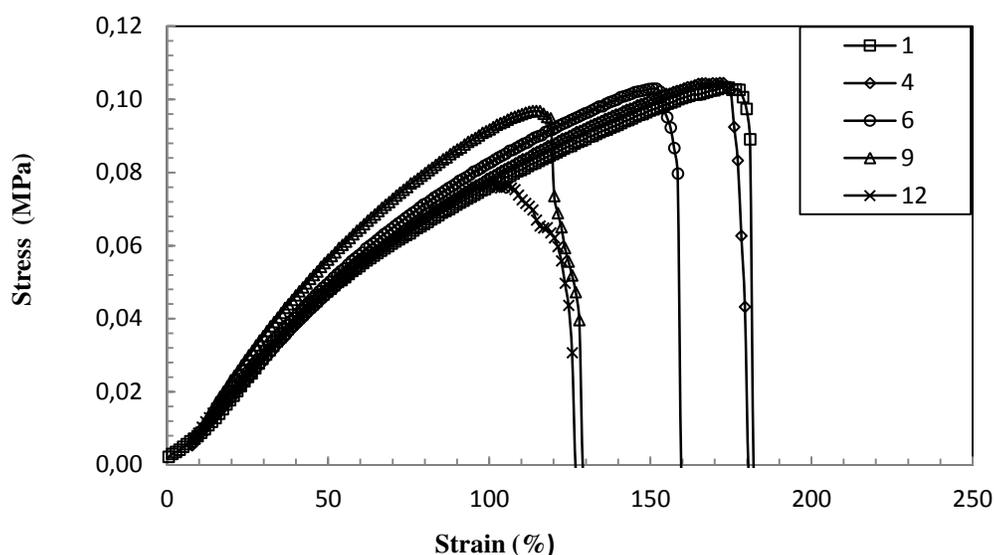


Figure 4 – Capability of strain under constant stress of a dowel of PUF after reuse in 12 fermentation cycles: 1(open square), 4 (open diamond), 6 (open circle), 9 (open triangle) and 12 (x).

The results showed no significant difference at the 5% level, according to the Tukey test. Therefore, the performance of the PUF bed for the production of HA and its main metabolites remained unchanged in 12 cycles of fermentation. The absence of formic acid reveals the absence of anaerobic regions in the system, as reported by Pires and Santana (2010), and shows the efficiency of air distribution through the CAS.

Thus, the overall assessment of the results shows that the use of a PUF cylindrical dowel as an inert bed and the CAS is an efficient, feasible and inexpensive method for the production of HA by *Streptococcus zooepidemicus*. Moreover, the scale-up of the process can

be accomplished by increasing the size of the columns and/or through the use of various columns in parallel.

Table 4 - Parameters of the production of HA (P_{AH}), yield substrate AH ($Y_{AH/S}$), the yield of cells on HA ($Y_{AH/X}$) and secondary metabolites within 24 h of cultivation.

Assays	P_{AH} (mg/g)	$Y_{AH/S}$ (g/g)	$Y_{AH/X}$ (g/g)	Lactic Acid (mg/g)	Acetic Acid (mg/g)	Formic Acid (mg/g)
1	1.22 ± 0.29	0.18 ± 0.04	3.54 ± 0.39	11.10 ± 0.14	0.98 ± 0.09	*
4	1.10 ± 0.12	0.15 ± 0.03	3.27 ± 0.70	11.08 ± 0.37	0.94 ± 0.04	*
6	1.41 ± 0.10	0.17 ± 0.01	4.14 ± 0.38	10.46 ± 0.57	0.93 ± 0.05	*
9	1.28 ± 0.10	0.13 ± 0.01	3.40 ± 0.32	10.64 ± 0.48	1.01 ± 0.05	*
12	1.19 ± 0.07	0.14 ± 0.01	4.24 ± 0.35	11.59 ± 0.43	1.04 ± 0.05	*

*: under detection limit. Values per gram of dry support.

Exploration of the influence of aeration and the initial glucose concentration

Table 5 presents the performance of the cultivations from results obtained according to the CCRD experimental design.

The results showed reliable reproducibility according to the repeats in the central point (assays 9, 10 and 11). Additionally, Table 6 shows the analysis of the main metabolites, lactic acid and acetic acid, in the lowest and highest HA production conditions. The significant amounts of the metabolites prove the occurrence of cellular growth and the production of HA in the PUF bed. The absence of formic acid indicated the absence of anaerobic zones in the system as reported by (Abbe et al., 1982). Consequently, the aeration provided by CAS in the PUF bed was efficient.

Table 5 – Influence of aeration and glucose concentration according to a CCRD experimental design.

Assays	Variables						
	Aer	CIG	Aer (L.min ⁻¹)	IGC (g.L ⁻¹)	Y _{AH/X} (g/g)	Y _{AH/S} (g/g)	P _{AH} (mg/g)
1	-1	-1	0.20	19.4	3.05	0.10	0.62
2	1	-1	0.86	19.4	4.13	0.16	0.81
3	-1	1	0.20	40.7	3.07	0.09	0.61
4	1	1	0.86	40.7	1.67	0.04	0.50
5	-1,41	0	0.05	30	5.66	0.08	0.95
6	1,41	0	1.00	30	5.17	0.11	1.03
7	0	-1,41	0.53	15	6.05	0.24	1.21
8	0	1,41	0.53	45	1.81	0.03	0.63
9	0	0	0.53	30	5.55	0.09	0.89
10	0	0	0.53	30	4.83	0.07	0.87
11	0	0	0.53	30	4.56	0.07	0.82

Yields factors: Y_{HA/X} (AH/células), Y_{HA/S} (AH/glucose) and P_{AH} (HA productivity in 24 h cultivation). The results are expressed per gram of PUF.

Table 6 – Lactic acid (Lac), acetic acid (Ace) and formic acid (For) in mg per g of PUF produced as intermediate metabolites in the AH synthesis (4 and 7 assays in (Table 5).

Assays	Metabolites		
	Lac (mg/g)	Ace (mg/g)	For (mg/g)
4	7.5 ± 0.5	0.5 ± 0.1	*
7	8.2 ± 0.6	0.6 ± 0.1	*

*: under detection limit. Values per gram of dry support.

The results also show that in all of the assays indicated in Table 5, the HA yields Y_{HA/X} were greater than 1 and reached 6 in the best conditions for producing HA. Therefore, cultivation in PUF changed the metabolism toward the production of HA in relation to the biomass. In general this result is not achieved in conventional submerged fermentations. Pires et al, (2010) obtained Y_{HA/X} near 1, while Vazquez *et al* (2010) achieved 0.65. Macedo (2011)

had values close to 2 in the cultivation of *S. zooepidemicus* in cashew apple fruit bagasse. This behavior confirms the improvement of HA production due to the increased capability of oxygen transfer in SSF, with the improvement imparted by CAS as well. Moreover, it also confirms our hypothesis on the efficiency of microbial growth in the patches of liquid films formed in the structure of PUF.

Despite the known importance of oxygen in the energy metabolism of the *S. zooepidemicus* for the production of HA in the ranges studied, aeration was not statistically significant at a 10% confidence level. Moreover, from ANOVA analysis, no statistical model has been fitted because the correlation among variables was less than 0.9, and consequently, it was not possible to delineate a response surface.

However, these experimental results show interesting trends for these operational variables toward the production of HA, as discussed below.

Assays 5, 6 and repeats with the center point (assays 9,10 and 11) at the same concentration of glucose (30 g / L) show similar results for P_{AH} , $Y_{HA/X}$ and $Y_{HA/S}$, irrespective of aeration. Furthermore, the $Y_{HA/S}$ yields were very low, indicating catabolic inhibition as reported by Pires et al. (2010) for this range of initial glucose concentration in submerged fermentation. A similar behavior can be observed in assays 3,4 and 8 with 40 and 45 g/L glucose concentrations. In particular, these assays show the lowest $Y_{HA/X}$, which may indicate the collapse of the initial liquid patch, due to lower viscosity provided by the low production of HA. When the glucose concentration was lowered to 19 g / L the effects of aeration were better observed. The P changed from 0.6 to 0.8 when aeration increased from 0.2 to 0.8 (assays 1 and 2). However, in this condition, the reduction of catabolic inhibition ($Y_{HA/S}$) and the energetic metabolism favored cell growth ($Y_{HA/X}$) compared to assays 5,6, 8-11. Finally,

with 15 g / L and aeration of 0.53 (assay 7), the highest yield $Y_{HA/X}$ (6.05 g/g), the greatest glucose consumption $Y_{HA/S}$ (0.24) and the best production of HA (1.21 g / L) were obtained. Additional assays, shown in table 7, with 15 g / L glucose and low aeration (0.02 to 0.1 L / min) showed P_{AH} of approximately 1 g / g and $Y_{HA/S}$ close to 0.12, but $Y_{HA/X}$ was approximately 3.5, indicating that increasing aeration promotes the production of HA as observed in assay with aeration 0.53 L / min.

Table 7- Assays at low aeration range with initial glucose concentration 15 g.L⁻¹.

Aeration (L.min⁻¹)	P_{AH} (mg/g)	Y_{AH/X} (g/g)	Y_{AH/S} (g/g)
0.10	1.11	3.4	0.13
0.05	1.06	3.8	0.11
0.02	1.14	3.2	0.12
0.53	1.21	6.05	0.24

Values per gram of dry support.

Therefore, the initial glucose concentration and aeration rate of 15 g / L and 0.53 L / min, respectively, are the best conditions for the production of HA by SSF in PUF with CAS. Further studies may optimize HA production near these operational conditions. The molecular weight of HA produced must also be determined to characterize its quality.

4. CONCLUSIONS

The cultivation of *S. zooepidemicus* in SSF with PUF as an inert dowel support packed in a glass column and aerated by CAS constitutes a promising strategy for the production of HA. The main benefits are the ability to mount the bed, the operation and the ease and complete recovery of HA. Furthermore, the system is suitable for scale-up.

Abbreviations

Ace	Acetic Acid
Aer	Aeration
A _s	Surface Area
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CAS	Central Aeration System
CCRD	Central Composite Rotational Design
CIG	Initial Glucose Concentration
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
DO	Dissolved Oxygen
For	Formic Acid
HPLC	High-pressure (performance) liquid chromatography
HA	Hyaluronic acid
Lac	Lactic Acid
PHA	Production of Hyaluronic Acid
PUF	Poliurethane Foam
SSF	Solid-state fermentation
SF	Submerged fermentation
Y _{HA/S}	Yield factor for Hyaluronic acid
Y _{HA/X}	Yield factor for Hyaluronic acid/Cell competition
T _P	Average Pore Diameter

Acknowledgements

The authors acknowledge FAPESP for the financial support.

5. REFERENCES

- ABBE, K., TAKAHASHI, S., & YAMADA, T. Purification and properties of pyruvate kinase from *Streptococcus sanguis* and activator specificity of pyruvate kinase from oral streptococci. **Journal of Bacteriology**, 152(1), 175–182, 1982.
- ARMSTRONG, D.C.; JOHNS, M.R. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2759–2764, 1997.
- BASTOS, R. G. **Transferência de oxigênio no cultivo em estado sólido de *Dreschlera (Helminthosporium) monoceras***. State University of Campinas (UNICAMP), 2006. 185p. Thesis (PhD)
- CLEARY, P. P., & LARKIN, A. Hyaluronic acid capsule: strategy for oxygen resistance in group A *streptococci*. **Journal of Bacteriology**, 140(3), 1090–1097, 1979.
- CHEN, Y.H.; WANG, Q. Establishment of CTAB Turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 178 – 181, 2009.
- CHONG, B.F., BLANK, L.M., MCLAUGHLIN, R. e NIELSEN, L.K. Microbial hyaluronic acid production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.66, n.4, p.341-351, 2005.
- CHONG, B.F.; NIELSEN, L.K. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 33-41, 2003.
- DAI, Z.; HATANO, B.; KADOKAWA, J.; TAGAYA, H. Effect of diaminitoluene on the decomposition of polyurethane foam waste in superheated water. **Polymer Degradation and Stability**, n. 76, p. 179–184, 2002.
- HASEGAWA, S., NAGATSURU, M., SHIBUTANI, M., YAMAMOTO, S. e HASEBE, S. Productivity of concentrated hyaluronic acid using maxblend fermentor. **J Biosci Bioen**, 88, 68–71, 1999.
- HUANG, W.C., CHEN, S.J. e CHEN, T.L. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v.32, p.239-243, 2006.
- KOGAN, G.; SOLTES, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. **Biotechnology Letters**, v.29, p.17-25, 2007.
- LAI, Z.W.; RAHIM, R.A.; ARIFF, A.B.; MOHAMAD, R. Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using oxygen vector and optimum impeller tip speed. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Article in Press, p. 1-6, 2012.

LAREO, C.; SPOSITO, A.F.; BOSSIO, A.L. & VOLPE, D.C. Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 38, p. 391-400, 2005.

LIU L, DU G, CHEN J, ZHU Y, WANG M, SUN J. Microbial production of low molecular weight hyaluronic acid by adding hydrogen peroxide and ascorbate in batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. **Bioresource Technol** 100: 362–367, 2009.

LIU, L.; LIU, Y.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. **Microbial Cell Factories**, 10:99, 2011.

LIU, L.; WANG, M.; DU, G.; CHEN, J. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. **Lett Appl Microbiol**. 46, p. 383-8, 2008.

MACEDO, A. C. **Produção de Ácido Hialurônico por Cultivo em Estado Sólido de *Streptococcus zooepidemicus* em Bagaço de Cajú.**, State University of Campinas (UNICAMP), 2011. 190 p. Thesis (PhD)

OGRODOWSKI, C.S. **Produção de ácido hialurônico por *Streptococcus*: estudo da fermentação de caracterização do produto.** State University of Campinas (UNICAMP), 2006. 103p. Thesis (PhD)

O'REGAN, M; MARTINI, I; CRESCENZI, F; DE LUCA, C, LANSING, M. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. **Int J Biol Macromol**, n.16: 283-286, 1994.

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

RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALES, G. Advances in Solid State Fermentation. **Proceedings** of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation. Montpellier, França. p.75-92, 1997.

RODRIGUEZ, M. I. E LEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos.** Campinas: Carita, 2009, 358 p.

RUFFING, A. E., CHEN, R.R. Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis. **Microbial Cell Factories**, 5:25., 2006.

SABU, A., KEERTHI, T.R., RAJEEV KUMAR, S. & CHANDRASEKARAN, M. L-Glutaminase production by marine *Beauveria* sp. under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, V.35, p.705-710, 2001.

SWANN, D. A., SULLIVAN, B. P., JAMIESON, G., RICHARDSON, K. R. E SINGH, T. **Biosynthesis of hyaluronic acid.** United States Patent: 4,897,349, 1990.

ROSU, D.; ROSU, L.; CASCAVAL, C.N.. IR-change and yellowing of polyurethane as a result of UV irradiation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 591–596, 2009.

WEISSMANN, B., MEYER, K. The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord^{1,2}. **J. Am. Chem. Soc.**, n° 76 , p. 1753–1757, 1954.

WESSELS, M.R., MOSES, A.E., GOLDBERG, J.B, DICESARE, T.J., Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A *Streptococci*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Oct 1;88(19):8317–8321, 1991.

ZHANG, Z. G.; CHEN, H. Z. Xanthan Production on Polyurethane Foam and Its Enhancement by Air Pressure Pulsation. **Appl Biochem Biotechnol** 162:2244–2258, 2010.

ZHU, Y., SMITS, J.P., KNOL, W., BOL, J. A Novel Solid.State Fermentation System Using Polyurethane Foam as Inert Carrier. **Biotechnology Letters**, v. 16, n.6, p. 643-648, 1994.

4. Conclusões

Dos resultados experimentais obtidos conclui-se que as modificações introduzidas no sistema alcançaram as metas desejadas, com a obtenção de resultados reprodutíveis e aeração eficiente no sistema.

O cultivo em estado sólido de *S. zooepidemicus* em espuma de poliuretano, no sistema CAS, mostrou-se uma estratégia promissora para produção de AH. As principais vantagens observadas foram a facilidade no preparo do suporte e operação do sistema, e simplicidade na recuperação do AH.

A reutilização do suporte (EPU) mostrou-se factível, já que não foram observadas diferenças significativas, ao nível de 5%, ao longo dos ensaios sequenciais.

O aumento da concentração inicial de glicose teve um efeito negativo para a síntese de AH, nas condições estudadas.

O aumento da aeração teve um efeito positivo para a menor concentração inicial de glicose estudada.

5. Sugestões para Trabalhos Futuros

- Emprego da estratégia CAS para outros processos envolvendo CES.
- Estudo do escalonamento do sistema.
- Avaliação da produção de AH em CES empregando fontes alternativas de nitrogênio.
- Estudos envolvendo pH no cultivo em estado sólido para produção de AH em suporte inerte.
- Emprego de EPU's com diferentes porosidades no CES para produção de AH.