



UNICAMP

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

**Estudos Metabólicos para Otimização de Condições
Nutricionais e de Cultivo para Produção Microbiana de Ácido
Hialurônico**

Autora: Aline Mara Barbosa Pires

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana

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

Campinas – São Paulo

Setembro/2009

IP P665e
ABO SCI 84464
OC 16-148-09
D x
ECO 11.00
TA 22/02/09
D TIT 490328

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

P665e Pires, Aline Mara Barbosa ~~Pires~~
Estudos metabólicos para otimização de condições
nutricionais e de cultivo para produção microbiana de
ácido hialurônico / Aline Mara Barbosa Pires. --
Campinas, SP: [s.n.], 2009.

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

1. Fermentação. 2. Metabolismo microbiano. 3.
Biopolímeros. 4. Reologia. I. Santana, Maria Helena
Andrade. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Metabolic studies for the optimization of nutritional and culture
conditions in the microbial production of hyaluronic acid

Palavras-chave em Inglês: Fermentation, Microbial metabolism, Biopolymers,
Rheology

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

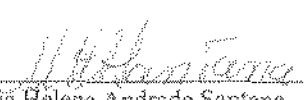
Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Silvia Yuko Eguchi, Frederico José Vieira Passos,
Christiane Saraiva Ogrodowski, Amaro Gomes Barreto
Júnior

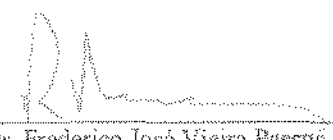
Data da defesa: 04/09/2009

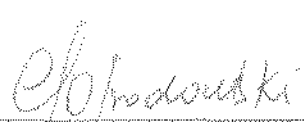
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Aline Mara Barbosa Pires e aprovada em 04 de setembro de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:


Drª. Maria Helena Andrade Santana


Drª. Silvia Yuko Eguchi


Dr. Frederico José Vieira Bastos


Drª. Christiane Saraiva Ogrodowski


Dr. Amaro Gomes Barreto Júnior

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Aline Mara Barbosa Pires e aprovada pela comissão julgadora em 04 de setembro de 2009.



Prof. Dr. Maria Helena Andrade Santana

*Aos meus pais,
por tudo que representam em minha vida.
Infelizmente esse momento não será como sonhado,
Mas tenham certeza de que só aconteceu por e para vocês.*

AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

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

À Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana, pela oportunidade de integrar o grupo de pesquisa de Processos Fermentativos do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (LDPB), por me apresentar esse complexo e interessante processo de produção microbiana de ácido hialurônico, e pela confiança, compreensão e orientação durante toda a execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Christiane Saraiva Ogrodowski, pelos conhecimentos transmitidos no início deste trabalho e pela participação na banca examinadora.

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

Ao Prof. Dr. Amaro Gomes Barreto Júnior, pela atenção e disponibilidade no essencial auxílio do desenvolvimento da análise de fluxos metabólicos, além da participação na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Frederico José Vieira Passos, por me apresentar ainda na graduação esse instigante mundo biotecnológico, pelos ensinamentos e participação na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. César Costapinto Santana, por disponibilizar a utilização do sistema cromatográfico e das dependências do Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas (LPCR).

Ao Prof. Dr. Edvaldo Sabadini, por disponibilizar a utilização do reômetro em seu laboratório no Instituto de Química da Unicamp.

À Profa. Dra. Mônica Alonso Costa, por disponibilizar a utilização do microscópio de força atômica em seu laboratório no Instituto de Física da Unicamp.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, pelas contribuições e sugestões ao longo do trabalho, e pelos divertidos momentos no LDPB.

Ao Dr. Ronaldo Gonçalves dos Santos, pelo essencial auxílio no desenvolvimento das análises reológicas.

À Ângela Klatil, cujo auxílio na revisão da língua inglesa foi essencial na redação deste trabalho.

À Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) e ao Grupo Investiga, pela manutenção da cultura microbiana empregada ao longo do estudo, em especial à Milena Ferreira (CBMAI) e Cíntia Forster (Grupo Investiga).

Às indústrias *Tangará Dairy Industries* e Caramuru Alimentos S.A., pela gentil doação dos subprodutos agroindustriais empregados neste estudo.

A todos os professores do Departamento de Processos Biotecnológicos da FEQ/Unicamp, pelos conhecimentos adquiridos.

À minha mãe, pelo carinho, pelo incentivo, pela presença constante e pela contribuição indispensável na concretização deste sonho. Espero poder retribuir essa entrega incondicional.

Ao meu pai que tenho certeza acompanhará a conclusão de mais essa etapa, mas infelizmente não da forma sonhada. Esteja certo de que você foi a razão da finalização dessa etapa, mesmo depois da imensa dor que deixou por sua perda.

Ao meu irmão Miguel que sempre me apoiou ao longo de toda minha trajetória. Seu apoio, junto ao da minha cunhada Salviana, nos momentos mais difíceis foram essenciais para a finalização de mais essa etapa.

Ao meu namorado Carlos César, pelo amor, dedicação, atenção, apoio e compreensão em todos os momentos.

Ao amigo Gilson Jr., técnico do LDPB, cuja ajuda foi essencial no desenvolvimento deste trabalho e cuja amizade foi essencial em todos os momentos.

À minha amiga Luciana Lima de Oliveira, que tornou menos dolorosa minha adaptação aqui em Campinas. Nosso intenso convívio foi um aprendizado para toda a vida.

Ao colega André Casimiro de Macedo, pelo compartilhamento das alegrias e tristezas no progresso deste estudo.

A todos os colegas que passaram pelo LDPB durante o período deste trabalho, em especial à Beatriz, Classius, Amós, Humberto, Amanda, Silas, Ana, Viviane, Pablo, Andréa, Thais, Giuliana, Lucimara, e Patrícia.

Aos colegas que passaram pelo LPCR durante o período deste trabalho, em especial à Luísa, Alessandra e Anayla.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos, em especial ao César (*in memoriam*), Regina, Thiago, Wagner, Marcelle, Mariana e Kiki, que sempre alegraram o cotidiano na FEQ.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química, em especial à Rosa, Alex, Cleverson, Sr. Waldemir, Alexandre e Dona Lúcia, pelo auxílio, incentivo e carinho.

Às minhas eternas amigas Paula Santiago, Kelly, Paula Nardelli, Elaine, Daniela Arquete, Celine, Deise, Vânia, Paula Souza, Janayna e Nathália por estarem sempre presente, mesmo à distância.

Às minhas amigas de infância Luciana e Érica, por me demonstrarem o valor desmedido da amizade.

Ao meu afilhado Yago, fonte inesgotável de alegria em minha vida.

À toda minha família, em especial ao meus tios, pelo auxílio, pelo amor e pelo incentivo em todas as etapas de minha vida.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

Por último, mas sempre em primeiro lugar, graças e louvor a Deus.

RESUMO

Neste trabalho, estudou-se a otimização da produção de ácido hialurônico (HA) por cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* em batelada, com base nas alterações metabólicas ao longo do cultivo. As condições ambientais estudadas foram a concentração inicial de glicose, controle do pH, íons minerais e fonte de nitrogênio orgânico. Nos cultivos em frascos, a concentração inicial de glicose não alterou nem o crescimento celular nem a produção de HA. Entretanto, no cultivo em biorreator sem o controle do pH, ambos foram fortemente dependentes da concentração inicial de glicose, com maior produção de HA ($1,21 \text{ g.L}^{-1}$) no cultivo realizado em meio com 25 g.L^{-1} glicose. Tal condição nutricional foi a única que apresentou maior conversão de glicose em HA ($Y_{\text{HA/S}}$) do que conversão de glicose em massa celular ($Y_{\text{X/S}}$). O controle do pH ao longo do cultivo com 25 g.L^{-1} glicose resultou em maior produtividade de células ($0,21 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e de HA ($0,10 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), apesar dos menores rendimentos em relação à glicose. A combinação desses resultados relaciona o maior direcionamento da fonte de carbono para HA do que para células a uma resposta do microrganismo ao stress ácido ocorrido no cultivo sem controle do pH. Uma análise da distribuição dos fluxos metabólicos nas condições ambientais estudadas demonstrou que as alterações na via de produção de HA foram mais relacionadas à distribuição dos fluxos para os açúcares precursores da síntese do polímero que à disponibilidade de energia (ATP) ou potencial redutor (NADH/NAD^+) das células. A total suplementação do meio de cultura com íons minerais (K^+ , Mg^{++} , Na^+ , Fe^{++} , Ca^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} e Cu^{++}) foi benéfica para o crescimento celular, porém não alterou a produção de HA de forma significativa. O estudo demonstrou ainda que a qualidade do polímero produzido pode ser modulada pela suplementação do meio com íons minerais. As propriedades reológicas do HA com baixo teor de proteína ($0,44 \text{ g.g}^{-1}$) e massa molar média de $4,0 \times 10^6$ Da demonstraram elevada densidade de emaranhamento das cadeias devido à alta dependência do módulo elástico com a concentração e desvios da viscosidade complexa com relação à regra de Cox-Merz. O estudo de meios alternativos contendo derivados agroindustriais demonstrou maiores concentrações de HA em meios contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Este conjunto de resultados contribui para a otimização da produção de HA, assim como para um melhor entendimento do metabolismo do *Streptococcus zooepidemicus*.

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

ABSTRACT

In this work, it was studied the optimization of HA production by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*, with focus on the metabolic changes along cultivation. The environmental conditions studied were the initial glucose concentration, pH control, mineral ions and organic nitrogen source. In flask cultivations, the initial glucose concentration had no influence on the amounts of either the biomass or the HA produced. However, in bioreactor cultivations, at non-controlled pH, both were strongly dependent on the initial glucose concentration. The highest HA concentration (1.21 g.L^{-1}) was obtained from 25 g.L^{-1} glucose, which was the only cultivation where the conversion of glucose to HA ($Y_{\text{HA/S}}$) was higher than the one of glucose to biomass ($Y_{\text{X/S}}$). Not only did the pH control along cultivation result in higher cell productivity ($0.21 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), but also in the HA productivity ($0.10 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). However, the HA and cell yields from glucose were lower. The combination of these results relates the higher direction of the carbon source to the HA synthesis at the expenses of the cell growth to a microbial response to the acid stress observed in non-controlled pH. An analysis of the metabolic flux distribution in the environmental conditions studied shows that the changes in the HA production pathway were more related to the distributions of fluxes to the precursors of HA synthesis than to the energy availability (ATP) or redox state (NADH/NAD^+) of the cells. The total supplementation of the culture medium with ions was beneficial to the cell growth. However, it did not have any influence on the HA production. Moreover, the results showed that the HA quality may be modulated through the mineral ion supplementation. The rheological properties of HA with low protein content (0.44 g.g^{-1}) and average molecular weight of 4.0×10^6 Da showed the high entanglements density of the HA chains due to the high storage modulus concentration dependence as well as to the complex viscosity deviations with respect to the Cox-Merz rule. Alternative media containing agricultural resources derivatives were studied. The higher HA concentrations were produced in media whose organic nitrogen source was yeast extract. This set of results contributes not only to the optimization of the HA production, but also to a better understanding of the *Streptococcus zooepidemicus* metabolism.

Key-words: hyaluronic acid, fermentation, *Streptococcus zooepidemicus*, metabolites, molecular weight, rheology.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xxi
LISTA DE TABELAS.....	xxvii
NOMENCLATURAS.....	xxix
APRESENTAÇÃO.....	xxxiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1. ÁCIDO HIALURÔNICO.....	7
3.1.1. ESTRUTURA QUÍMICA.....	7
3.1.2. BREVE HISTÓRICO.....	8
3.1.3. PROPRIEDADES DO ÁCIDO HIALURÔNICO EM SOLUÇÃO.....	8
3.1.3.1. CONFORMAÇÃO.....	8
3.1.3.2. PROPRIEDADES DE POLIELETRÓLITO.....	10
3.1.3.3. PROPRIEDADES VISCOELÁSTICAS.....	10
3.1.3.4. DISTRIBUIÇÃO DE MASSA MOLAR.....	14
3.2. FUNÇÕES DO ÁCIDO HIALURÔNICO.....	14
3.3. APLICAÇÕES DO ÁCIDO HIALURÔNICO.....	15
3.3.1. OFTALMOLOGIA.....	16
3.3.2. CIRURGIA ORTOPÉDICA E REUMATOLOGIA.....	17
3.3.3. OTOLARINGOLOGIA.....	18
3.3.4. DERMATOLOGIA E CIRURGIA PLÁSTICA.....	18
3.3.5. CIRURGIA E CICATRIZAÇÃO DE FERIMENTOS.....	19

3.3.6. FARMACOLOGIA E LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	19
3.4. FONTES DE ÁCIDO HIALURÔNICO.....	19
3.5. MERCADO DE DO ÁCIDO HIALURÔNICO.....	22
3.6. PRODUÇÃO MICROBIANA DE ÁCIDO HIALURÔNICO.....	23
3.6.1. BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>STREPTOCOCCUS</i>	27
3.6.2. METABOLISMO DE <i>STREPTOCOCCUS</i>	29
3.6.3. MEIO DE CULTURA.....	30
3.6.3.1. MEIOS COMUMENTE EMPREGADOS.....	30
3.6.3.2. FONTE DE CARBONO.....	31
3.6.3.3. FONTE DE NITROGÊNIO.....	31
3.6.3.4. ÍONS MINERAIS.....	34
3.6.4. CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO.....	36
3.6.4.1. TEMPERATURA.....	36
3.6.4.2. POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH).....	37
3.6.4.3. AGITAÇÃO.....	38
3.6.4.4. AERAÇÃO.....	38
3.7. ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS.....	40
3.7.1. PRINCIPAIS FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	40
3.7.2. ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO..	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1. ALTERAÇÕES METABÓLICAS DECORRENTES DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE GLICOSE NO MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO.....	49
4.2. EFEITOS DO CONTROLE DO pH DO MEIO DE CULTURA NO METABOLISMO CELULAR E MASSA MOLAR DO ÁCIDO HIALURÔNICO PRODUZIDO.....	67

4.3. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS FLUXOS METABÓLICOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS ESTUDADAS.....	87
4.4. INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÍONS MINERAIS NO CRESCIMENTO CELULAR, RENDIMENTO E MASSA MOLAR DO ÁCIDO HIALURÔNICO PRODUZIDO.	109
4.5. DETERMINAÇÃO DAS PRINCIPAIS PROPRIEDADES REOLÓGICAS DO ÁCIDO HIALURÔNICO PRODUZIDO.....	131
4.6. AVALIAÇÃO DE DERIVADOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTE DE NITROGÊNIO ORGÂNICO PARA PRODUÇÃO MICROBIANA DE ÁCIDO HIALURÔNICO.....	153
5. CONCLUSÕES.....	171
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	173
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	175

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Estrutura do tetrassacarídeo de uma cadeia de ácido hialurônico. Adaptado de http://www.geocities.com/bioquimicaplicada/Hetero22.gif	7
Figura 3.2 – Modelo da fita de HA em um domínio tridimensional (a) e corte transversal da Figura 3a, ilustrando o tamanho médio de poro e exclusão parcial de moléculas grandes (Hascall e Laurent, 1997).....	9
Figura 3.3 – Modelo demonstrativo das propriedades viscosas e elásticas das soluções de HA (Hascall e Laurent, 1997).....	11
Figura 3.4 – Micrografia eletrônica de células de <i>Streptococcus. equi</i> subespécie <i>zooepidemicus</i> obtidas no final da fase exponencial de crescimento de uma cultura em biorreator aerado. As seções foram coradas com uranil acetato e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (Chong <i>et al.</i> , 2005).....	24
Figura 3.5 – Via biossintética para produção de ácido hialurônico por <i>Streptococcus</i> . Adaptado de Chong <i>et al.</i> (2005).....	25
Figura 3.6 – Vias metabólicas centrais em <i>Streptococcus zooepidemicus</i> envolvidas na conversão de glicose a HA e outros metabólitos. HAS: hialuronato sintase; NOX, NADH oxidase; LDH, lactato desidrogenase; PFL, piruvato formato liase; PDH, piruvato desidrogenase; ADH, álcool desidrogenase; AK, acetato quinase. Adaptado de Chong <i>et al.</i> (2005).....	29
Figura 3.7 – Fluxo de carbono baseado em 100 C-mol de glicose consumido. Fluxos foram estimados a partir das alterações nas concentrações de metabólitos durante a fase exponencial de crescimento, utilizando modelo de fluxo metabólico. O balanço de carbono foi próximo de 98,5% e contribuições do metabolismo de aminoácidos foram desconsideradas. G6P: glicose-6-fosfato, F6P: frutose-6-fosfato, TP: triose fosfatos, PYR: piruvato, UDPG: UDP-ácido glicurônico, UDPNAG: UDP-N-acetil glicosamina, AcCoA: acetil-CoA. Adaptado de Chong e Nielsen, (2003).....	30

Figura 3.8 – Representação geral de reações consideradas em uma rede metabólica. N substratos entram na célula e são convertidos a M produtos metabólicos via um total de K metabólitos. As conversões ocorrem via J reações intracelulares pelas quais as taxas são dadas por $v_1, \dots, v_J$. Taxas de formação de substrato ($r_{S,1}, \dots, r_{S,N}$) e formação de produtos ($r_{P,1}, \dots, r_{P,M}$) também são mostradas (Modificado de Nielsen <i>et al.</i> , 2003).....	42
Figura 3.9 – Redes metabólicas para produção de HA por <i>Streptococcus zooepidemicus</i> construídas por (a) Chong e Nielsen (2003) e (b) Gao <i>et al.</i> (2006). As abreviações dos metabólitos são apresentadas no Apêndice B do capítulo 3 da seção de Resultados e Discussão.....	46
Figure 4.1.1 – Central metabolic pathways in <i>Streptococcus zooepidemicus</i> involved in the conversion of glucose to hyaluronic acid and fermentation products through the (a) homolactic and (b) mixed acid metabolisms. HAS, hyaluronate synthase; NOX, NADH oxidase; LDH, lactate dehydrogenase; PFL, pyruvate formate lyase; PDH, pyruvate dehydrogenase; ADH, alcohol dehydrogenase; AK, acetate kinase (Adapted from Chong and Nielsen, 2003b).....	53
Figure 4.1.2 – Effects of the initial glucose concentration on the cultivation of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> in shake flasks: (a) (●) glucose consumption; (■) lactate; (◆) hyaluronic acid; (▲) cell growth; (b) (○) acetate; (□) ethanol; (c) (◆)hyaluronic acid; (◇) hyaluronic acid average molecular weight.....	58
Figure 4.1.3 – Effects of the initial glucose concentration on (a) the hyaluronic acid volumetric (●) and specific (■) productivities and on (b) the hyaluronic acid average molecular weight (□) produced at the end of the cultivation of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> under forced aeration.....	61
Figure 4.1.4 – Production of (a) lactate, (b) acetate, (c) formate and (d) ethanol, in the cultivation of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> under forced aeration at the initial glucose concentrations: (●) 0 g.L ⁻¹ ; (■) 5 g.L ⁻¹ ; (◆) 25 g.L ⁻¹ ; (▲) 45 g.L ⁻¹	63
Figure 4.2.1 – Kinetic profiles of (a) cell growth, (b) glucose concentration, (c) HA concentration and (d) pH along cultivations using <i>Streptococcus zooepidemicus</i> under (●) non-controlled pH and (■) controlled pH.....	74

Figure 4.2.2 – Kinetic profiles of (a) lactate, (b) acetate, (c) formate and (d) ethanol along batch culture of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> under (●) non-controlled pH and (■) controlled pH.....	77
Figure 4.2.3 – Effect of pH control on the average molecular weight of HA produced under (●) non-controlled pH cultivation and (■) controlled pH 7.0 cultivation.....	79
Figure 4.3.1 – The metabolic model of <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	94
Figure 4.3.2 – Flux distribution for the exponential-phase growth of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> at different initial glucose concentrations (IGC), without the control of the culture pH: (a) 5g.L ⁻¹ IGC; (b) 25g.L ⁻¹ IGC; (c) 45g.L ⁻¹ IGC. All fluxes are expressed as a percentage of the specific glucose uptake rate in Cmol _{GLC} .Cmol _{BIOM} .h ⁻¹ that was (a) 2.31, (b) 4.93, and (c) 1.58.....	97
Figure 4.3.3 – Flux distribution for the exponential-phase growth of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> at 25g.L ⁻¹ initial glucose and constant culture pH. All fluxes are expressed as a percentage of the specific glucose uptake rate that was 7.67 Cmol _{GLC} .Cmol _{BIOM} .h ⁻¹	98
Figure 4.3.4 – Profiles of the (a) glucose concentration and (b) pH for batch culture of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> at 25g.L ⁻¹ initial concentration glucose in cultivations performed (●) under acidifying conditions and (■) at constant pH (7.0).....	99
Figure 4.4.1 – Effects of the individual (a) absence or (b) presence of the mineral ions on the growth of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> . a - the reference value of the average cell growth (0.91 g.L ⁻¹) in the control medium supplemented with all of the evaluated ions (C+ control). b - the reference value of the average cell growth (0.62 g.L ⁻¹) in the non-supplemented control medium (C- control). The letters above the bars mean the statistical comparisons performed by the Turkey test at 5% probability (p < 0.05). Bars with the same letters are not significantly different.....	120

Figure 4.4.2 – Effects of the individual (a) absence or (b) presence of the mineral ions on the production of HA. a - the reference value of the HA production (1.03 g.L^{-1}) in the control medium supplemented with all of the evaluated ions (C+ control). b - the reference value of the HA production (1.03 g.L^{-1}) in the non-supplemented control medium (C– control). The letters above the bars mean the statistical comparisons performed by the Turkey test at 5% probability ($p < 0.05$). Bars with the same letters are not significantly different..... 122

Figure 4.4.3 – Effects of the individual (a) absence or (b) presence of the mineral ions on the global yield coefficient of HA from glucose. a - the reference value of the yield (0.17 g.g^{-1}) in the control medium supplemented with all of the evaluated ions (C+ control). b - the reference yield value (0.16 g.g^{-1}) in the non-supplemented control medium (C– control). The letters above the bars mean the statistical comparisons performed by the Turkey test at 5% probability ($p < 0.05$). Bars with the same letters are not significantly different..... 124

Figure 4.4.4 – Effects of the individual (a) absence or (b) presence of the mineral ions on the molecular weight (MW) of HA. a - the reference value of the MW of HA ($2.0 \times 10^7 \text{ Da}$) in the control medium supplemented with all of the evaluated ions (C+ control). b - the reference value of the MW ($3.3 \times 10^7 \text{ Da}$) in the non-supplemented control medium (C– control). The letters above the bars mean the statistical comparisons performed by the Turkey test at 5% probability ($p < 0.05$). Bars with the same letters are not significantly different..... 126

Figure 4.5.1 – The pH effects on (a) the protein content and (b, c) the color of the obtained precipitates from the *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 (—, b) cultivation in acidifying conditions precipitated at pH 4.96; (— —, c) cultivation and precipitation at pH 7.0. The intensity measurements were obtained from a UV-VIS detector at 280nm..... 139

Figure 4.5.2 – The pH effects on the molecular weight distribution of HA produced from the *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 (a) cultivation at acidifying conditions and precipitated at pH 4.96; (b) cultivation and precipitation at pH 7.0..... 140

Figure 4.5.3 – The influence of shear rate ($\dot{\gamma}$) on the specific viscosity (η_{sp}) of microbial HA at different concentrations in 0.15 mol.L ⁻¹ NaCl solution at 25°C: (■) 50; (♦) 60; (▲) 70; (○) 80; (□) 90; (△) 100 mg.mL ⁻¹ . All concentrations are expressed as mg.mL ⁻¹	141
Figure 4.5.4 – Specific viscosity (η_{sp}) dependence on the concentration for the microbial HA in 0.15 mol.L ⁻¹ NaCl solution at 25°C.....	142
Figure 4.5.5 – Storage (a) and loss (b) shear moduli of microbial HA solutions in 0.15 mol.L ⁻¹ NaCl at 25°C as a function of angular frequency: (○) 10; (□) 30; (◇) 40; (△) 50; (●) 60; (■) 70; (♦) 80; (▲) 90; (+) 100 mg.mL ⁻¹ . All concentrations are expressed as mg.mL ⁻¹	144
Figure 4.5.6 – Storage modulus (G') concentration dependence for microbial HA in 0.15 mol.L ⁻¹ NaCl solution at 25°C, measured at frequency of 0.63 rad.s ⁻¹	145
Figure 4.5.7 – Cox-Merz plot of the microbial HA in 0.15 mol.L ⁻¹ NaCl solution at 25°C, with various concentrations: (○) 40; (□) 50, (◇) 60; (△) 70; (○) 80; (□) 90; (●) 100 mg.mL ⁻¹ . All concentrations are expressed as mg.mL ⁻¹ . Open symbol: η ; Closed symbol: η''	176
Figure 4.5.8 – Networks formed by microbial HA in 0.01 mol.L ⁻¹ MgCl ₂ solution deposited on mica: (a) e (b) 0.01 mg.mL ⁻¹ ; (c) e (d) 1.0 mg.mL ⁻¹ . Height image 1 μ m $\times$ 1 μ m.....	147
Figure 4.5.9 – Clusters of microbial HA chains observed when 0.01 mg.mL ⁻¹ HA solution were deposited on mica. Height image 1.5 μ m $\times$ 1.5 μ m.....	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Ocorrência de HA em diferentes tecidos animais e sua concentração.....	20
Tabela 3.2 - Comparação entre massas molares de HA extraído de diversas fontes.....	22
Tabela 3.3 - Perfil dos aminoácidos essenciais para o crescimento de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> em diferentes fontes complexas de nitrogênio orgânico.....	33
Tabela 3.4 – Funções fisiológicas dos principais elementos requeridos pela célula.....	35
Table 4.1.1 – Effects of the initial glucose concentration (IGC) on the specific growth rate and the yield coefficients related to glucose obtained in the cultivation of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> under forced aeration.....	59
Table 4.1.2 – HA average molecular weight at various initial glucose concentrations (IGC), obtained at the end of the cultivation of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> under natural and forced aeration.....	62
Table 4.2.1 – Effects of the pH control on the specific velocity of growth, yield coefficients and productivities obtained during the batch culture of <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	75
Table 4.2.2 – Effects of the pH control on yield coefficients of the main metabolites produced during the batch culture of <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	78
Table 4.2.3 – Effect of pH on the HA molecular weight distribution.....	80
Table 4.3.1 – Energy and reducing equivalent balance for the exponential-phase growth of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> at different environmental conditions.....	100
Table 4.4.1 – Composition of the salt-supplemented complex medium (C ⁺ control) based on Swann <i>et al.</i> [13].....	114
Table 4.4.2 – Composition of salts in the non-supplemented complex medium (C ⁻ control).....	115
Table 4.4.3 – Growth and cell viability from incubations for inoculum propagations in non-supplemented medium for applications in the evaluation of the ions influence on the cultivations.....	118

Table 4.5.1 – G' and G'' slopes and intercepts determining the cross-over frequency (ω_0) from microbial HA solutions in 0.15 mol.L ⁻¹ NaCl at 25°C.....	144
Table 4.6.1 – Composition of the synthetic medium used as a control.....	158
Table 4.6.2 – Qualitative composition of the synthetic (1,2) and ARDs (3-8) media.....	160
Table 4.6.3 – Total nitrogen and glucose concentrations in the agricultural resources derivates and in the yeast extract used in the culture media.....	162
Table 4.6.4 – Cell growth, HA production, HA:glucose yield coefficient and HA average molecular weight using non-supplemented ARDs media.....	162
Table 4.6.5 - Cell growth, HA production, HA:glucose yield coefficient and HA average molecular weight using the CSL supplemented ARDs media.....	163

NOMENCLATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica
AcCoA	Acetil coenzima A
ADP	Adenosina difsfato
ADH	Álcool desidrogenase
AFM	Microscopia de força atômica
AK	Acetato quinase
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Associação de analistas químicos oficiais
ARD	Derivados agroindustriais
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
c^*	Concentração crítica
Ca	Cálcio
CAJ	Suco de caju
CLS	Água de maceração de milho
c_{met}	Concentração de metabólito
C/N	Razão carbono nitrogênio
Co	Cobalto
CO ₂	Dióxido de carbono
CoASH	Coenzima A
Cu	Cobre
Da	Daltons
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EC	Número de comissão da enzima
EMP	Via Embden-Meyerhof-Parnas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe	Ferro
F6P	Frutose-6-fosfato
G	Matriz estequiométrica
G^*	Módulo complexo
G'	Módulo de rigidez
G''	Módulo de dissipação

G6P	Glicose-6-fosfato
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa
G^T	Matriz estequiométrica transposta
$(G^T)^{\#}$	Pseudo-inversa da matriz estequiométrica
HA	Ácido hialurônico
HAS	Hialuronato sintase
HPLC	High performance liquid chromatography
HSPC	Hidrolisado de concentrado protéico de soja
ICP-OES	Espectrometria de emissão por plasma
IGC	Concentração inicial de glicose
K	Potássio
LAB	Bactérias lácticas
LDH	Lactato desidrogenase
MFA	Análise de fluxos metabólicos
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
MQD	Meio quimicamente definido
MW	Massa molar
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleotídio oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida
NADPH	NAD Fosfato (forma reduzida)
NMR	Ressonância magnética nuclear
NOX	NADH oxidase
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fosfato
PDH	Piruvato desidrogenase
PFL	Piruvato formato liase
P_r	Produtividade de ácido hialurônico
PPI	Pirofosfato
P_x	Produtividade de células
PYR	Piruvato
r_{met}	Velocidade de formação do metabólito
RNA	Ácido ribonucléico
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
TP	Triose fosfatos

UDP	Uridina difosfato
UDPG	UDP-ácido glicurônico
UDPNAG	UDP-N- acetilglicosamina
UTP	Uridina trifosfato
UV	Ultravioleta
v	Vetor de fluxos metabólicos
WPC	Concentrado protéico de soro de leite
$Y_{Ac/S}$	Coefficiente de rendimento de acetato em relação à glicose
$Y_{EtOH/S}$	Coefficiente de rendimento de etanol em relação à glicose
$Y_{For/S}$	Coefficiente de rendimento de formato em relação à glicose
$Y_{HA/S}$	Coefficiente de rendimento de ácido hialurônico em relação à glicose
$Y_{Lac/S}$	Coefficiente de rendimento de lactato em relação à glicose
$Y_{X/S}$	Coefficiente de rendimento de células em relação à glicose
Zn	Zinco
δ	Ângulo de defasagem
γ	Taxa de cisalhamento
γ_0	Amplitude máxima de deformação
η	Viscosidade
η^*	Viscosidade complexa
η_{sp}	Viscosidade específica
μ_X	Velocidade específica de crescimento
σ_0	Amplitude máxima de tensão
τ	Tensão de cisalhamento
τ_0	Tensão mínima de escoamento
ω	Frequência de oscilação

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi redigido na forma de capítulos, para uma melhor organização e discussão dos resultados obtidos. Assim, este exemplar é apresentado no seguinte formato:

- Introdução, apresentando a importância e justificativa do trabalho;
- Objetivo e aspectos abordados;
- Revisão bibliográfica, abordando os principais fundamentos considerados no desenvolvimento do trabalho;
- Resultados e discussões, apresentados na forma de artigos submetidos a periódicos científicos que se referem aos aspectos abordados no desenvolvimento do trabalho. Os materiais e métodos empregados serão descritos em cada capítulo;
- Conclusões gerais;
- Sugestões para trabalhos futuros;
- Referências bibliográficas.

1. INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (HA) 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. HA existe naturalmente como um gel hidratado encontrado em tecidos humanos e de animais. Esse biopolímero influencia o comportamento celular e apresenta significantes funções estruturais, reológicas, fisiológicas e biológicas no corpo.

Soluções aquosas de HA são descritas como polieletrólitos enovelados de estrutura semi-rígida. A molécula ocupa um grande volume hidrodinâmico e, mesmo em baixas concentrações (1 mg.L^{-1}), as cadeias são capazes de interagir formando redes. Essas características estruturais, que são altamente dependentes de sua massa molar, resultam em seu comportamento viscoelástico e capacidade de retenção de grandes volumes de água, sendo determinante em suas funções e aplicações. A ausência de efeitos toxigênicos de HA permite sua ampla aplicação nas indústrias cosmética, médica e farmacêutica, incluindo hidratantes para a pele, preenchedores faciais, tratamento de osteoartrite, cirurgia oftalmológica, cicatrização de ferimentos e liberação controlada de fármacos. Com a incessante busca pela beleza e o envelhecimento da população mundial, é crescente a demanda por esses produtos com propósitos cosméticos e terapêuticos.

O HA produzido comercialmente pode ser de origem animal, normalmente extraído de crista de galo, ou produzido por fermentação de *Streptococcus* do grupo C de Lancefield, em particular *Streptococcus equi* sub. *equi* e *Streptococcus equi* sub. *zooepidemicus*. Os polímeros resultantes de ambas as fontes apresentam a mesma estrutura química daqueles encontrados em humanos, podendo diferir apenas com relação à massa molar. Contudo, a produção de HA por processos fermentativos tem se tornado uma alternativa cada vez mais atrativa e confiável, considerando-se a atual preocupação e restrições quanto ao uso de materiais de origem animal para aplicações biomédicas devido ao perigo de contaminação por agentes virais.

HA é sintetizado como uma cápsula extracelular por *Streptococcus*, produzida como um fator de virulência por esses microrganismos. As porções de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina que constituem a molécula de HA são derivadas de glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, respectivamente, e são polimerizados pela enzima HA sintase. Por serem β -

hemolíticos, *Streptococcus* dos grupos A e C de Lancefield liberam estreptolisina no meio de cultivo e preparações de HA para aplicações médicas ou cosméticas não podem estar contaminado com essa proteína. Assim, microrganismos empregados na produção industrial de HA normalmente são mutantes não β -hemolíticos e que não sintetizam hialuronidase, enzima que degrada a cadeia polimérica do HA.

A produção microbiana de HA representa ainda uma oportunidade de otimizar o rendimento e qualidade do produto por meio de engenharia genética e controle das condições de cultivo, visto que a maioria dos produtos formados pelos microrganismos é resultado de sua resposta a condições ambientais como nutrientes, vitaminas, íons, temperatura, pH e teor de oxigênio dissolvido. Além disso, o HA de origem microbiana é excretado no meio de cultivo, possibilitando o controle das características do polímero e do rendimento do produto.

Desde a década de 80, estudos avaliando o efeito de diferentes condições de cultivo (pH, temperatura, aeração e agitação) e fontes nutricionais (glicose, maltose, sacarose) sobre a produção de HA foram descritos. Entretanto, para otimização do processo, esses estudos concentraram-se principalmente nas condições de crescimento e não no metabolismo celular. Estudos dos mecanismos de regulação para adaptação aos estímulos ambientais ainda são escassos. Assim, o presente trabalho abrange o estudo da produção de HA por *Streptococcus zooepidemicus*, enfocando a otimização de diferentes condições ambientais por meio de estudos metabólicos.

Os poucos estudos que descrevem o efeito da concentração inicial de glicose na produção de HA por processo fermentativo foram desenvolvidos em cultivos com controle do pH do meio. Os estudos em questão não consideraram as alterações metabólicas decorrentes das perturbações ambientais, o que dificulta o entendimento do metabolismo, fisiologia e mecanismos de regulação da célula. Este trabalho estudou o efeito da concentração inicial de glicose em cultivos realizados em frascos agitados e em biorreator, sem o controle do pH, levando em consideração as alterações nos principais metabólitos celulares ao longo do cultivo.

O controle do pH do meio é uma condição de cultivo importante considerando-se o metabolismo de bactérias lácticas, cujo cultivo gera um ambiente desfavorável para seu crescimento e viabilidade. Entretanto, apesar dos numerosos benefícios do controle do pH descritos para bactérias lácticas, efeitos específicos na produção e massa molar de

exopolissacarídeos depende da estirpe empregada. Apesar dos diversos estudos empregando o *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, microrganismo empregado neste trabalho, estudos específicos relacionando os efeitos do pH em seu cultivo assim como as alterações metabólicas resultantes ainda não foram descritos. Este trabalho avaliou o efeito do controle do pH do meio ao longo do cultivo nas alterações metabólicas, produção e massa molar de HA.

Para um melhor entendimento do metabolismo e fisiologia das células nas condições ambientais estudadas, uma análise da distribuição dos fluxos metabólicos foi desenvolvida. Essa importante ferramenta utiliza técnicas de balanço de massa e a hipótese de estado estacionário metabólico para formulação de restrições lineares, que possibilitam a determinação da distribuição dos fluxos metabólicos dentro de uma rede estequiométrica definida. Poucos estudos empregaram essa análise na produção de HA, os quais investigaram condições nutricionais como fonte de carbono (comparação do metabolismo de glicose e maltose) e condições de cultivo como o teor de oxigênio dissolvido.

Os meios de cultura descritos para produção microbiana de HA normalmente são complexos e apresentam ampla variação do número, tipo e concentração de íons minerais empregados na suplementação. Conhecendo-se a importância dos íons minerais como cofatores de diversas reações intracelulares, neste trabalho foi estudada a real necessidade da suplementação com íons minerais do meio complexo a base de extrato de levedura e glicose no crescimento, produção e massa molar média de HA.

As propriedades reológicas dos biopolímeros em geral, e especialmente do HA, são de fundamental importância em suas aplicações e funções biológicas. Visto que o comportamento reológico do polímero depende principalmente de sua concentração, distribuição da massa molar, força iônica da solução, temperatura e presença de contaminantes, o HA produzido neste trabalho, com baixo teor de proteína e alta massa molar foi caracterizado em solução fisiológica, em regime permanente de fluxo e em regime oscilatório.

Considerando-se a busca atual por uma sociedade sustentável, estudou-se a utilização de derivados agroindustriais como fontes alternativas de carbono e nitrogênio orgânico. As fontes foram selecionadas com base nos requerimentos nutricionais do microrganismo em questão e suas respectivas composições, mantendo-se a mesma razão glicose:nitrogênio do meio complexo a base de glicose e extrato de levedura.

Os diferentes aspectos abordados no presente trabalho visam contribuir para a otimização da produção de HA por processo fermentativo, bem como para um melhor entendimento do metabolismo e fisiologia do microrganismo em questão.

2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo a otimização de condições nutricionais e de cultivo por meio de estudos metabólicos da produção de ácido hialurônico (HA) por *Streptococcus zooepidemicus*, além da caracterização do polímero produzido.

As etapas e aspectos abordados em seu desenvolvimento foram:

1. Alterações metabólicas decorrentes da concentração inicial de glicose no meio de cultura para produção de HA.
2. Efeitos do controle do pH do meio de cultura no metabolismo celular e massa molar do HA produzido.
3. Análise da distribuição dos fluxos metabólicos nas diferentes condições ambientais estudadas.
4. Influência da suplementação com íons minerais no crescimento celular, rendimento e massa molar do HA produzido.
5. Determinação das principais propriedades reológicas do polímero produzido.
6. Avaliação de derivados agroindustriais como componentes do meio de cultura para produção microbiana de HA.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ÁCIDO HIALURÔNICO

3.1.1. ESTRUTURA QUÍMICA

O ácido hialurônico (HA) é um polissacarídeo linear de alta massa molar constituído de unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina unidos por uma ligação glicosídica β -1-3. As unidades dissacarídicas são linearmente polimerizadas por ligações glicosídicas β -1-4 (Lapcik Jr. *et al.*, 1998), conforme demonstrado na Figura 3.1.

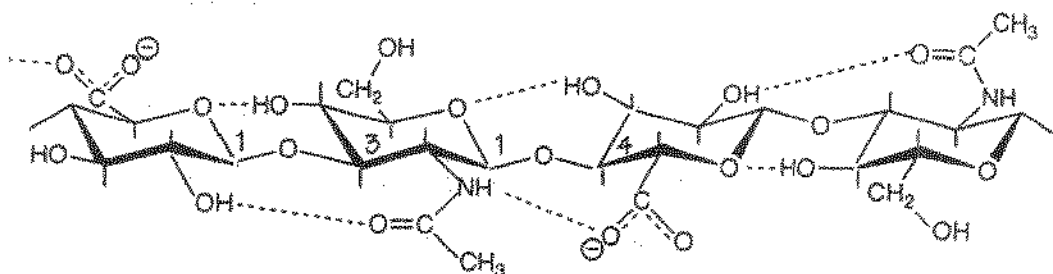


Figura 3.1 – Estrutura do tetrassacarídeo de uma cadeia de ácido hialurônico. Modificado de Gómez-Alejandre *et al.* (2000).

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

O HA pertence a um grupo de polissacarídeos similares denominados “polissacarídeos do tecido conjuntivo”, “mucopolissacarídeos” ou “glicosaminoglicanos”. Dentre esses polissacarídeos estão incluídos condroitina sulfato, dermatana sulfato e heparina (Lapcik Jr. *et al.*, 1998). O HA é estruturalmente o mais simples do grupo, sendo o único não covalentemente associado a um núcleo protéico e o único não sulfatado. O número de unidades dissacarídicas repetitivas na molécula de ácido hialurônico pode exceder 30.000.000, ou seja, a massa molar de HA pode alcançar valores superiores a 1×10^7 Da (Kogan *et al.*, 2007).

3.1.2. BREVE HISTÓRICO

Em 1934, Karl Meyer e John Palmer descreveram um novo polissacarídeo contendo ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina, isolado do humor vítreo de boi. O nome “ácido hialurônico” resultou da junção entre o termo grego *hialóide*, que significa vítreo, e ácido urônico (Laurent, 2002). Somente 20 anos depois, Meyer completou a determinação da estrutura do HA demonstrando consistir de dissacarídeos repetidos unidos por ligações β -1-3 e β -1-4 (Hardingham, 2004).

Na década seguinte, Meyer e outros colaboradores dedicaram-se ao isolamento de HA de tecidos animais incluindo fluido sinovial, pele, cordão umbilical e crista de galo. As preparações de HA extraídas de tecidos sempre retinham alguma proteína, o que gerou controvérsias debatidas nas décadas de 60 e 70 sobre a ligação de HA a uma proteína.

As propriedades do HA e seu comportamento em solução, mesmo em baixas concentrações, diferem do comportamento newtoniano ou “ideal”, representando um desafio nas décadas de 50 e 60. Muitos trabalhos enfocaram medidas biofísicas de espalhamento de luz (“light scattering”), osmometria, viscosidade e sedimentação para modelos de comportamento (Hardingham, 2004).

O HA apresenta propriedades biofísicas complexas de uma estrutura química inerentemente simples. Diferentes hipóteses e mecanismos são gerados na tentativa de entender essa complexidade. Progressos em técnicas experimentais têm elucidado muitas questões anteriormente difíceis de serem estudadas.

3.1.3. PROPRIEDADES DO ÁCIDO HIALURÔNICO EM SOLUÇÃO

3.1.3.1. CONFORMAÇÃO

Em soluções diluídas, sob condições fisiológicas, HA assume uma estrutura enovelada randômica semiflexível, ocupando grande domínio hidrodinâmico com uma baixa densidade de segmentos de cadeia, conforme demonstrado na Figura 3.2a. Esse comportamento resulta da alta massa molar da molécula, da rigidez local decorrente do tamanho das unidades monoméricas (anéis de açúcares), do impedimento de rotação das ligações glicosídicas e das pontes de hidrogênio dinamicamente formadas e quebradas entre os resíduos (Day e Sheehan, 2001).

Os átomos de hidrogênio axiais (observados na Figura 3.1) formam uma face relativamente hidrofóbica apolar enquanto as cadeias laterais equatoriais formam uma face hidrofílica de maior polaridade, criando uma estrutura de fita torcida (Hardingham, 2004).

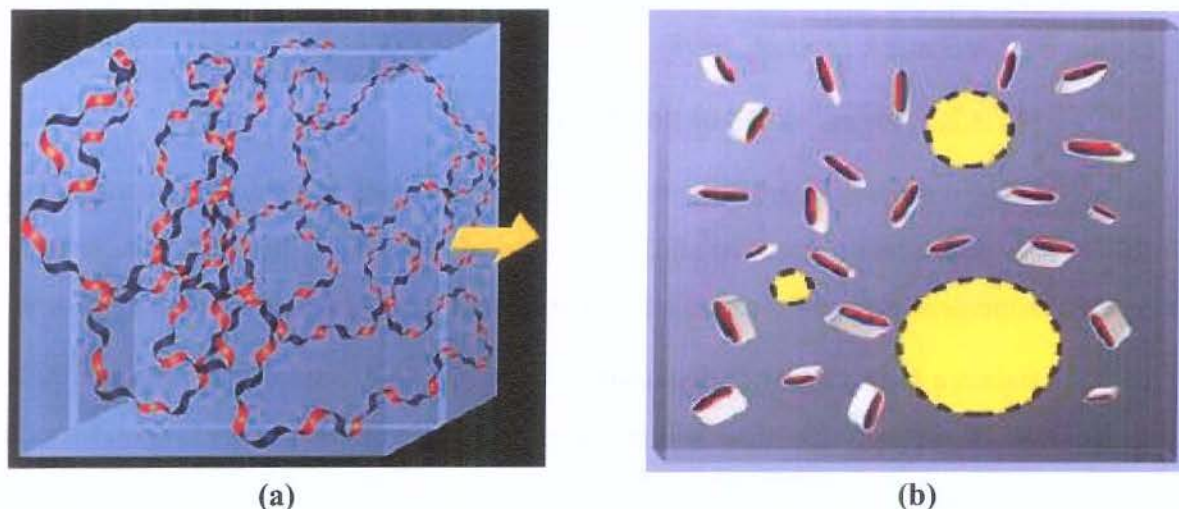


Figura 3.2 – Modelo da fita de HA em um domínio tridimensional (a) e (b) corte transversal da Figura 3a, ilustrando o tamanho médio de poro e exclusão parcial de moléculas grandes (Hascall e Laurent, 1997).

O cubo azul claro demonstrado na Figura 3.2a representa o domínio da molécula de HA em solução. As cores azul e vermelha alternadas representam a estrutura da fita com faces hidrofílicas (azuis) e hidrofóbicas (vermelha). A estrutura do domínio de HA tem interessantes e importantes consequências: moléculas menores como a água, eletrólitos e nutrientes podem difundir livremente através do solvente dentro do domínio. Entretanto, moléculas maiores como proteínas podem ser parcialmente excluídas do domínio devido a seu tamanho hidrodinâmico em solução. No corte transversal apresentado na Figura 3.2b, observa-se porções da molécula de HA (regiões azuis e vermelhas) e as áreas de diferentes tamanhos disponíveis para difusão de moléculas dentro do domínio, representadas pelos círculos amarelos tracejados. As cadeias de HA estão em constante movimento em solução gerando, portanto, contínua alteração no tamanho dos “poros” na rede (Hascall e Laurent, 1997).

Além das pontes de hidrogênio entre os açúcares adjacentes e as interações eletrostáticas entre os grupos carboxílicos, Scott *et al.* (1991) observaram regiões hidrofóbicas de aproximadamente 8 grupos CH em lados alternados da hélice de HA. Simulações computacionais

e cálculos de energia confirmaram que hélices de HA em solução podem ser energeticamente e estericamente capazes de formação dupla entre duas cadeias de HA por meio de interações entre as regiões hidrofóbicas da cadeia. As regiões hidrofóbicas são responsáveis não somente pela estabilização da formação dupla, mas também base da formação da rede e agregação lateral de cadeias de HA (Lapcik Jr. *et al.*, 1998).

3.1.3.2. PROPRIEDADES DE POLIELETRÓLITO

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 HA um poliânion (Hascall e Laurent, 1997).

Balazs e Laurent (1951) demonstraram um padrão de viscosidade típico de polieletrólito para o HA, verificando uma distância aproximada de 1 nm entre as 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 HA se contraem com o aumento da força iônica e diminuição do pH, o que confirma seu comportamento de polietrólito. Laurent (1957) comparou resultados de viscosidade e espalhamento de luz de hialuronato de sódio em água e hialuronato de cetilpiridina em metanol, encontrando um raio de giro de 200 nm para a primeira solução e 120 nm para a segunda. Observou-se, portanto, que o raio de giro depende do solvente empregado sendo a diminuição observada para o hialuronato de cetilpiridina relacionada a um colapso da cadeia quando as cargas tornam-se neutralizadas.

O pK do polímero, obtido por extrapolação do grau de ionização para zero, foi estimado ser 2,9 (Reed *et al.*, 1989).

3.1.3.3. PROPRIEDADES VISCOELÁSTICAS

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

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

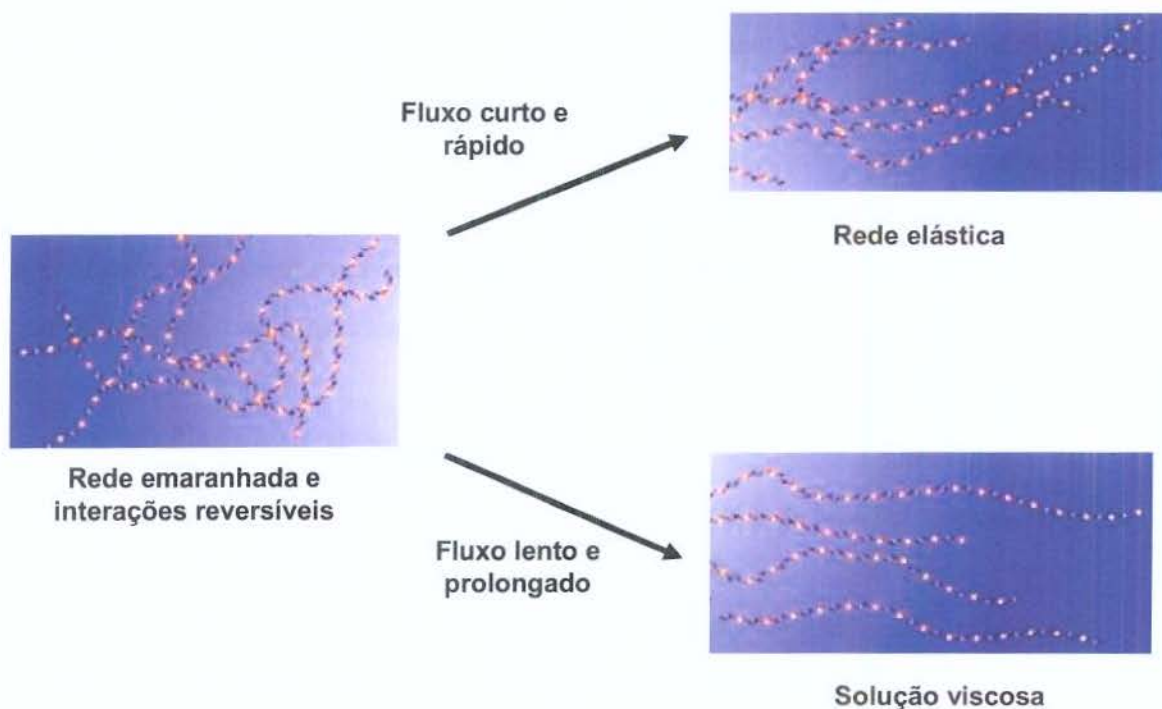


Figura 3.3 – Modelo demonstrativo das propriedades viscosas e elásticas das soluções de HA (Hascall e Laurent, 1997).

Para o estudo das propriedades reológicas de HA, as condições normalmente empregadas incluem o uso de força iônica suficiente para mascarar as repulsões eletrostáticas (acima de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), utilizando NaCl como eletrólito, a pH neutro e a temperatura de aproximadamente $20\text{-}37^{\circ}\text{C}$.

VISCOSIDADE

A viscosidade é a propriedade mais importante que afeta o comportamento de escoamento de fluidos e relaciona-se com a resistência do fluido ao movimento. A Equação 3.1 válida para fluidos ideais designados como fluidos newtonianos, relaciona a tensão (τ) e taxa de cisalhamento (γ) no caso de escoamentos simples.

$$\tau = \eta \cdot \gamma \quad (3.1)$$

Para fluidos Newtonianos, a razão de todos os pares de τ e γ é uma constante (η), denominada viscosidade de cisalhamento ou, simplesmente, viscosidade. Os líquidos que possuem algum desvio dessas condições ditas “ideais” são classificados como líquidos não-newtonianos, podendo apresentar comportamento pseudoplástico, caracterizado pela diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, ou comportamento dilatante, quando a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento. Alguns fluidos pseudoplásticos apresentam uma resistência maior ao escoamento, com uma tensão mínima inicial designada como tensão mínima de escoamento (τ_0), a partir da qual têm o comportamento normal de um fluido pseudoplástico (Schramm, 1994).

Em soluções muito diluídas, a viscosidade de biopolímeros é essencialmente independente da taxa de cisalhamento (comportamento Newtoniano). Entretanto, com o aumento da concentração, a viscosidade começa a apresentar considerável dependência da taxa de cisalhamento. A concentração crítica (c^*) corresponde à concentração de polímero onde ocorre a mudança da dependência da concentração e é associada ao início do comportamento de emaranhamento das cadeias (Chronakis e Kasapis, 1995).

ELASTICIDADE

A elasticidade é uma propriedade importante no estudo dos sólidos. Para sólidos ideais (Hookeanos), a Equação 3.2 relaciona tensão de cisalhamento e deformação para sólidos “ideais”.

$$\tau = G \cdot \gamma \quad (3.2)$$

A constante de proporcionalidade G , também chamada módulo elástico constitui uma propriedade do material.

VISCOELASTICIDADE LINEAR

Sistemas poliméricos apresentam propriedades intermediárias, com respostas à deformação viscosas e elásticas. Portanto, são considerados materiais viscoelásticos (Chronakis e Kasapis, 1995).

As respostas viscosas e elásticas são avaliadas por ensaios oscilatórios dinâmicos. Quando o sistema está sob condições dinâmicas, define-se ângulo de defasagem (δ), como sendo o ângulo entre as respostas obtidas da deformação e da tensão. Para um sólido ideal, o ângulo de defasagem é zero enquanto para líquidos Newtonianos, o ângulo de defasagem é de 90° . No caso dos sistemas viscoelásticos, os ângulos de defasagem estão compreendidos entre os dois casos anteriormente citados; ou seja, entre a ausência de defasagem e a defasagem de 90° .

A relação entre a amplitude máxima de tensão e a amplitude máxima de deformação define o módulo complexo $|G^*|$, que fornece informações sobre as propriedades viscoelásticas de qualquer substância através de suas duas componentes. A componente elástica (G'), chamada módulo de rigidez, é a medida da energia armazenada e devolvida pelo material. A componente viscosa (G''), chamada módulo de dissipação, é a medida da energia dissipada pelo material, normalmente na forma de calor.

A viscosidade complexa (η^*), outra propriedade viscoelástica, é definida como

$$\eta^* = \frac{G''}{\omega} \quad (3.3)$$

onde ω é a frequência de oscilação.

A viscoelasticidade linear depende da estrutura molecular da cadeia polimérica e suas respectivas conformações. Diferentes fatores podem influenciar as propriedades viscoelásticas, dentre eles o comprimento, o número e o volume ocupado pelas cadeias poliméricas, as interações existentes entre as cadeias do mesmo biopolímero, ou entre outras cadeias poliméricas, e finalmente, interações das cadeias poliméricas com o solvente presente no sistema.

3.1.3.4. DISTRIBUIÇÃO DE MASSA MOLAR

HA 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 HA são caracterizadas por sua massa molar estando o desempenho do produto, em muitas de suas aplicações, diretamente relacionada a esse parâmetro de destacada importância na produção do biopolímero (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.

Os mecanismos que controlam a massa molar do HA ainda não são bem definidos. Quando identificados, manipulação das condições de cultivo e modificação da cepa podem ser aplicadas mais racionalmente para regular características de tamanho de biopolímeros quimicamente importantes. Os fatores determinantes parecem ser divididos em duas categorias. Primeiro, as células bacterianas podem proceder o alongamento da cadeia sem interrupção até o substrato ou fontes de energia se esgotarem. Segundo, o término pode ser sinalizado por alterações transientes em certos metabólitos (Armstrong e Johns, 1997). Mausolf (1988) sugere que uma alta concentração de ATP e, ou, uma baixa concentração de UDP-N-acetilglicosamina conduzem a fosforilação do receptor e subsequente liberação de HA para o meio.

3.2. FUNÇÕES DO ÁCIDO HIALURÔNICO

HA ocorre primeiramente na matriz extracelular e pericelular, embora recentemente tenha sido mostrada sua presença intracelularmente (Evanco e Wight, 2001).

No corpo humano, as maiores concentrações de HA são encontradas no fluido sinovial, cordões umbilicais e no humor vítreo. Aproximadamente metade do HA presente no corpo humano ocorre na pele, sendo grande parte localizada no espaço intracelular onde pode alcançar concentração de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$. Além de servir como matriz em que as células estão embebidas, HA exerce uma série de outras funções na pele: imobilização de água nos tecidos, alterando o volume dérmico e compressibilidade; influência na proliferação celular, diferenciação e reparação de tecidos (Kogan *et al.*, 2007). Alterações em HA observadas com o envelhecimento, cicatrização de ferimentos e doenças degenerativas têm enfatizado sua importância na pele (Juhlin, 1997).

Na pele, o maior órgão do corpo humano, que constitui a principal barreira entre tecidos subjacentes e a ação hostil do ambiente, HA exerce uma função de escoamento dos radicais livres gerados pelos raios ultravioleta da luz solar que causa stress oxidativo nas células, podendo danificar seu material genético causando degeneração e morte.

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

No fluido sinovial, altas concentrações de HA de alta massa molar fornece lubrificação necessária para as articulações, atuando como amortecedor de choques, reduzindo fricção no movimento dos ossos e diminuindo o desgaste das articulações. Sob condições inflamatórias de doenças como osteoartrite ou artrite reumatóide, HA de alta massa molar é degradado por espécies reativas de oxigênio, reduzindo sua viscosidade e impedindo suas propriedades lubrificantes e absorvedoras de choques, conduzindo ao movimento deteriorado das articulações e dor (Šoltés *et al.*, 2006).

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

3.3. APLICAÇÕES DO ÁCIDO HIALURÔNICO

As áreas básicas de aplicação clínica de HA são classificadas por Balazs (2004) como:

- 1) Viscocirurgia: para proteger tecidos delicados e fornecer espaço durante manipulações cirúrgicas como em cirurgias oftalmológicas;
- 2) Viscoaumento: para preencher e aumentar espaços em tecidos como a pele, músculos esfínter e tecidos vocais;

3) Viscosseparação: para separar superfícies do tecido conjuntivo traumatizadas por procedimentos cirúrgicos ou injúria, no intuito de prevenir adesões e formação excessiva de cicatrizes;

4) Viscosuplementação: para substituir ou suplementar fluidos de tecidos, como substituição do fluido sinovial em artrite aguda, e para aliviar dores.

5) Viscoproteção: para proteger superfícies saudáveis, feridas ou injuriadas de desidratação ou agentes ambientais prejudiciais, e para promover a cura de tais superfícies.

A elevada capacidade de retenção de água e o comportamento viscoelástico de HA lhe confere, portanto, um perfil peculiar tornando-o apropriado para diversas aplicações médicas e farmacêuticas.

3.3.1. OFTALMOLOGIA

HA é o maior componente do humor vítreo e é uma macromolécula chave em oftalmologia. Devido a suas propriedades viscoelásticas, HA é empregado em diversas cirurgias oftalmológicas. Preparações de HA protegem tecidos oculares delicados e fornecem espaço durante manipulações cirúrgicas. Entretanto, sua maior utilização encontra-se na substituição ou reposição de fluidos vítreos perdidos durante procedimentos como cirurgia de catarata ou implante de córneas (Kogan *et al.* 2007).

Devido a suas propriedades viscosas, HA tem sido incluído também na composição de colírios, aumentando seu tempo de residência no local e, conseqüentemente, melhorando a disponibilidade do fármaco em questão. Gurny *et al.* (1987) concluíram que soluções de HA apresentam uma capacidade única de prolongar o tempo de residência na córnea de pilocarpina.

O primeiro produto a base de HA no mercado foi Healon[®], derivado de crista de galo fabricado em 1979 pela Biotrics, Inc. (Arlington, MA) e posteriormente pela Pharmacia, Suécia, agora Pfizer (Nova Iorque, EUA). Atualmente, diversas preparações de variadas massas molares são disponíveis, incluindo uma combinação de HA e condroitina sulfato. Mais recentemente, baseado em estudo de propriedades reológicas de materiais puros e suas misturas, Maltese *et al.* (2006) concluíram que uma mistura binária de hialuronato de sódio e hidroxipropilmetil celulose atinge com mais sucesso os requerimentos para utilização em cirurgias oftalmológicas.

3.3.2. CIRURGIA ORTOPÉDICA E REUMATOLOGIA

A segunda maior aplicação de HA ocorre na viscosuplementação em articulações afetadas por artrite. Uma articulação saudável permite movimento com menos fricção e livre de dores. Contudo, quando danificada ou afetada por artrite, as articulações tornam-se enrijecidas e doloridas. Dentre as centenas de doenças de artrite, osteoartrite e artrite reumatóide são as condições crônicas mais comuns que afetam a população idosa. Enquanto a osteoartrite é uma doença degenerativa da cartilagem e osso que resulta em dores e enrijecimento da articulação afetada, artrite reumatóide é classificada como uma doença inflamatória sistêmica, em que as dores nas articulações são frequentemente acompanhadas por alterações degenerativas em órgãos adicionais como o pulmão, coração e vasos sanguíneos. Embora a etiologia e patogênese da artrite reumatóide sejam ainda desconhecidas, progressiva degradação de carboidratos poliméricos, principalmente HA, no fluido sinovial é observada durante o desenvolvimento da doença (Kogan *et al.*, 2007).

Desde o final da década de 80, aplicações intra-articulares de HA (viscosuplementação) têm obtido sucesso no tratamento de pacientes com osteoartrite. A massa molar do HA no fluido sinovial de um adulto saudável encontra-se na faixa entre $2 \text{ e } 6 \times 10^6 \text{ Da}$. Assim, tratamentos com preparações de maior massa molar normalmente requerem 3 injeções durante 3 semanas, enquanto medicamentos de menor massa molar devem ser aplicados no mínimo 5 vezes ao longo de 5 semanas (Chong *et al.*, 2005). Administração de preparações de HA têm melhorado os sintomas e diminuído a utilização de medicamentos anti-inflamatórios em pacientes com osteoartrite. Greenberg *et al.* (2006) sugerem que a terapia empregando HA tenha efeito biológico na progressão da osteoartrite e propõem 4 mecanismos para o efeito terapêutico:

- 1) Restauração de propriedades elásticas e viscosas do fluido sinovial;
- 2) Efeito estimulatório biossintético de HA exógeno nas células: HA injetado pode induzir a síntese endógena de HA pelas células sinoviais, estimulando a proliferação de condrócitos e inibindo a degradação de cartilagens;
- 3) Ação anti-inflamatória de HA, visto que a terapia está associada com diminuição da contagem de células inflamatórias no fluido sinovial, modulação da expressão de citocina e redução da concentração de espécies reativas de oxigênio;
- 4) Efeito analgésico observado da administração de HA.

3.3.3. OTOLARINGOLOGIA

Embora HA esteja presente em quase todo o corpo, encontra-se mais concentrado em tecidos em desenvolvimento e especializados como cordas vocais, fluido sinovial, cordão umbilical e cartilagem. Nesses tecidos influenciam diferentes funções incluindo viscosidade, fluxo e osmose do tecido, absorção de impactos, cicatrização de ferimentos e preenchimento de espaços. Essas funções são especialmente importantes nas cordas vocais devido ao constante trauma causado pelas ações vibratórias da fonação (Kogan *et al.*, 2007). As propriedades osmóticas, viscoelásticas e de preenchimento de HA são importantes para a voz, uma vez que afetam diretamente a espessura e viscosidade das cordas vocais (Chan *et al.*, 2001). Viscoaumento da corda vocal, reparo de cordas vocais injuriadas ou cicatrizadas e tratamento de insuficiência da glote são utilizações adicionais de derivados de HA. A maior desvantagem do emprego de HA como implante para tratamento de doenças das cordas vocais é seu curto tempo de residência dentro das cordas vocais.

Em terapia de doenças auditivas, filmes de ésteres de HA são utilizados em cirurgias nos ouvidos e cavidades. Essas preparações promovem a cicatrização de membranas do tímpano, facilita a reepitelização e também previne a adesão entre camadas dos tecidos (Kogan *et al.*, 2007).

3.3.4. DERMATOLOGIA E CIRURGIA PLÁSTICA

Preparações de HA com ligações cruzadas são comumente empregadas para preenchimento de rugas faciais e diminuição de cicatrizes. Tais géis são mais efetivos na manutenção de correções cosméticas que produtos a base de colágeno (Narins *et al.*, 2003). Ao contrário de preparações baseadas em colágeno, HA é extremamente elástico, fornecendo a elasticidade requerida pelos espaços em que é injetado como rugas faciais e cicatrizes profundas. Preparações de HA também são ativas por tempos mais prolongados.

Shu *et al.* (2004) desenvolveram hidrogéis baseados em HA que não necessitam implantação, mas foram injetados e melhoraram a citocompatibilidade com fibroblastos, demonstrando o potencial uso desses hidrogéis na regeneração de tecidos.

3.3.5. CIRURGIA E CICATRIZAÇÃO DE FERIMENTOS

Preparações de HA de alta massa molar aplicadas topicamente promovem cicatrização de ferimentos recentes na pele, reduzindo adesões de tecidos após cirurgias abdominais e ortopédicas. Além disso, promovem a cicatrização de ferimentos venosos nas pernas e são úteis na administração de ferimentos crônicos (Edmonds e Foster, 2006).

Um novo produto, uma combinação de HA com dexpanthenol vem sendo utilizado como hidratante e preparação tópica protetora e regeneradora da pele. Devido a suas propriedades antioxidantes, HA atua como um componente anti-inflamatório em materiais para recobrimento de ferimentos (Moseley, 2003).

3.3.6. FARMACOLOGIA E LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Os grupos carboxilados de HA têm sido utilizados para criar ligações cruzadas na preparação de hidrogel para aprisionamento de DNA e também para liberação de fármacos. HA pode ser conjugado diretamente com o fármaco ou utilizado na preparação de microcápsulas para liberação controlada do fármaco (Esposito *et al.*, 2005). HA também é empregado para melhorar biocompatibilidade de microesferas de quitosana empregadas como cápsulas para liberação de fármacos. Microesferas de HA são também utilizadas para liberação de plasmídeos e anticorpos monoclonais na transferência de genes (Yun *et al.*, 2004).

Na liberação de peptídeos, sabe-se que a administração oral é frequentemente limitada pela instabilidade e baixa absorção de peptídeos no trato gastrointestinal. Pesquisas biofarmacêuticas estão sendo conduzidas para liberação de peptídeos no sistema circulatório via nasal. Morimoto *et al.* (1993) demonstraram que HA de alta massa molar melhorou moderadamente a absorção nasal de vasopressina em ratos, porém o mecanismo da melhoria ainda não foi esclarecido. O interesse industrial pela utilização de HA por via nasal é aparente, visto o grande número de patentes em formulações nasais baseadas em HA para liberação de vacinas, inibidores de alergias e peptídeos (Lapcik Jr. *et al.*, 1998).

3.4. FONTES DE ÁCIDO HIALURÔNICO

HA é um componente funcional essencial em quase todos os tecidos de organismos vertebrados. Assim, diversos tecidos animais são utilizados como fonte para isolamento e produção de HA de alta massa molar (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Ocorrência de HA em diferentes tecidos animais e sua concentração.

Tecido ou Fluido	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Observações
Crista de galo	7500	Tecido animal com maior concentração de HA
Cordão umbilical humano	4100	Apresenta HA com alta massa molar
Fluido sinovial humano	1400-3600	O volume de fluido sinovial aumenta sob condições inflamatórias, conduzindo a uma diminuição da concentração de HA
Cartilagem nasal bovina	1200	Frequentemente empregada como modelo de cartilagem em estudos experimentais
Humor vítreo humano	140-340	Concentração de HA aumenta próximo à maturação deste tecido
Derme humana	200-500	Sugerido como agente rejuvenescedor em dermatologia cosmética
Epiderme humana	100	Concentração de HA é muito maior em volta das células que sintetizam HA
Cérebro de coelho	65	Supõe-se que HA atue na redução da probabilidade de ocorrência de tumores cerebrais
Coração de coelho	27	HA é o maior constituinte na matriz patológica que obstrui artérias coronárias
Língua torácica humana	0,2-50	A baixa massa molar desse HA é explicada pela captação preferencial de moléculas maiores pelas células endoteliais do fígado
Urina humana	0,1-0,3	A urina é também uma importante fonte de hialuronidase
Soro humano	0,01-0,1	Concentrações de HA aumentam no soro de pessoas idosas assim como em pacientes com artrite reumatóide e cirrose no fígado

Fonte: Kogan *et al.*, 2007.

O HA disponível comercialmente é suprido prioritariamente pela extração a partir de crista de galo e do cordão umbilical. Visto que em materiais biológicos HA normalmente encontra-se complexado com outros biopolímeros, diferentes procedimentos de separação têm sido aplicados no intuito de obter um composto puro, dentre eles digestão com proteases, precipitação de HA com solventes orgânicos como etanol, clorofórmio ou cloreto de cetilpiridina, ultrafiltração por membranas e, ou, liofilização (Adam e Ghosh, 2001). No entanto, a obtenção do HA puro a partir dessas fontes apresenta duas grandes desvantagens: necessidade de purificação laboriosa, uma vez que esse produto encontra-se usualmente misturado com outros mucopolissacarídeos e proteínas; redução de sua massa molar, devido à degradação das cadeias nos procedimentos complexos requeridos para a purificação.

Além de estar presente em tecidos animais, HA também é encontrado em procariotos, principalmente em *Streptococcus* dos grupos A e C de Lancefield, que sintetizam esse composto naturalmente como parte de sua cápsula externa (Armstrong e Johns, 1997). Embora inicialmente tecidos animais foram empregados para produção de materiais utilizados clinicamente sob aprovação do Food and Drug Administration (FDA), ultimamente HA de alta massa molar secretado por microrganismos vem sendo oferecido por diversas indústrias.

Chong e Blank (1998) citam que o processo de extração do HA de tecidos animais apresenta algumas desvantagens com relação à obtenção por via microbiana: 1) redução da massa molar após processos de extração e purificação do HA; 2) dificuldades de isolamento de moléculas de alta massa molar devido à complexação com proteoglicanos; 3) dificuldade no controle da massa molar do biopolímero quando este é sintetizado nos tecidos animais; 4) resistência à utilização de materiais de origem animal em produtos biomédicos devido ao risco de infecções virais.

A Tabela 3.2 apresenta a variação da massa molar de HA de acordo com a fonte de sua extração.

Tabela 3.2 - Comparação entre massas molares de HA extraído de diversas fontes.

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

Fonte: Ogrodowski, 2006; Adam e Ghosh, 2001; Iqbal *et al.*, 1997.

3.5. MERCADO DE ÁCIDO HIALURÔNICO

Como demonstrado no item 3.3, devido a sua variedade de funções, HA tem sido empregado em diversas aplicações na medicina e cosmética. Comercializado como *Hyalgan* pela *Fidia* (Pádua, Itália), HA é utilizado topicamente desde a década de 60 para tratamento de queimaduras e ferimentos. Para aplicações médicas, o primeiro produto comercializado foi *Healon* da *Pharmacia*, agora *Pfizer* (Nova Iorque, EUA), um auxiliar cirúrgico utilizado na extração de catarata, transplante de córnea e cirurgia de adesão de retina. Em base de custos hospitalares, no ano de 2005, esse mercado competitivo foi estimado em US \$140 milhões em todo o mundo e está crescendo lentamente com o aumento da população idosa (<http://www.lifecore.com>).

A próxima grande aplicação de HA foi a viscosuplementação em articulações com artrite, primeiramente comercializada pela *Seikagaku* (Tóquio, Japão) em 1987. Nos Estados Unidos, a primeira aprovação de HA para viscosuplementação foi em 1997 mas, desde então, o mercado tem crescido cerca de 15% ao ano (Chong *et al.*, 2005). Em contraste, ainda não foi estabelecido um forte mercado de HA na Europa, apesar do mercado ter se iniciado antes que nos Estados Unidos. O valor atual do mercado mundial é estimado em cerca de US \$300 milhões no Japão, aproximadamente o mesmo valor nos Estados Unidos e inferior a US \$100 milhões na Europa (<http://www.q-med.com>). O campo da viscosuplementação ilustra a crescente importância da engenharia de materiais no desenvolvimento de aplicações de HA.

Em 1996, a Genzyme lançou uma barreira a adesão de carboximetilcelulose coberta com HA que, desde então, foi empregada em 800000 casos. Produtos baseados em HA destinados à administração para adesão têm sido desenvolvidos e, nos Estados Unidos, seu mercado potencial corresponde a US \$300 milhões por ano (<http://www.genzymebio-surgery.com>).

O mercado mundial para HA de grau médico corresponde a aproximadamente 1 tonelada por ano, sendo comercializado a US \$40,000-60,000/kg. O volume do mercado de HA empregado na área cosmética é cerca de 10 a 20 vezes superior, enquanto o preço se encontra na faixa de US \$1,000-2,000/kg, dependendo da qualidade do produto (Chong *et al.*, 2005).

3.6. PRODUÇÃO MICROBIANA DE ÁCIDO HIALURÔNICO

HA produzido por extração de tecidos animais ou por fermentação microbiana apresenta a mesma estrutura química do polímero encontrado nos humanos, podendo diferir apenas com relação à massa molar (Cooney *et al.*, 1999). Porém, devido às dificuldades e elevado custo envolvido no processo de extração e isolamento de HA de alta massa molar e alto grau de pureza a partir de tecidos animais, o processo fermentativo tem se tornado uma alternativa cada vez mais atrativa e confiável para produção de HA em grande escala, considerando-se a crescente resistência à utilização de materiais de origem animal em aplicações biomédicas devido ao perigo de contaminação por agentes virais (Chong *et al.*, 2005). Além disso, o HA de origem microbiana é excretado no meio de cultivo, possibilitando o controle das características do polímero e do rendimento do produto (Chong e Blank, 1998).

HA é sintetizado como uma cápsula extracelular por *Streptococcus* dos grupos A e C de Lancefield, em particular *Streptococcus equi* subespécie *equi* e *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus*. Para simplificação, na literatura científica esses microrganismos são citados como *Streptococcus equi* e *Streptococcus zooepidemicus*, respectivamente. Análises microscópicas dessas bactérias demonstram células esféricas ou ovóides tipicamente arranjadas em pares ou cadeias rodeadas por uma cápsula celular conforme apresentado na Figura 3.4.

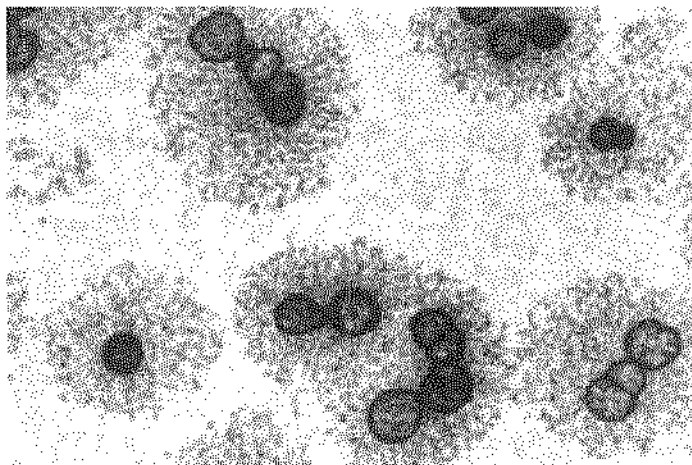


Figura 3.4 – Micrografia eletrônica de células de *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* obtidas no final da fase exponencial de crescimento de uma cultura em biorreator aerado. As seções foram coradas com uranil acetato e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (Chong *et al.*, 2005).

A cápsula de HA é produzida como um fator de virulência por esses microrganismos que são bactérias Gram-positivas, catalase negativa, anaeróbias facultativas com algumas estirpes aerotolerantes, que não esporulam e produz ácido láctico 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.

As porções de ácido D-glicurônico e N-acetilglicosamina que constituem a molécula de HA são derivadas de glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, respectivamente, e são polimerizados pela enzima HA sintase. A via biossintética para produção de HA é apresentada na Figura 3.5.

A primeira reação na via a partir de glicose-6-fosfato é um passo comum na produção de polissacarídeos de estocagem em muitos organismos. A enzima α -fosfoglicomutase (EC 5.4.2.2) converte glicose-6-fosfato a glicose-1-fosfato em uma reação reversível. UDP-glicose pirofosforilase (EC 2.7.7.9) catalisa a reação de UTP e glicose-1-fosfato para produzir o açúcar nucleotídeo UDP-glicose. Ácido UDP-glicurônico é obtido por oxidação específica do grupo álcool primário de UDP-glicose pela ação de UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22).

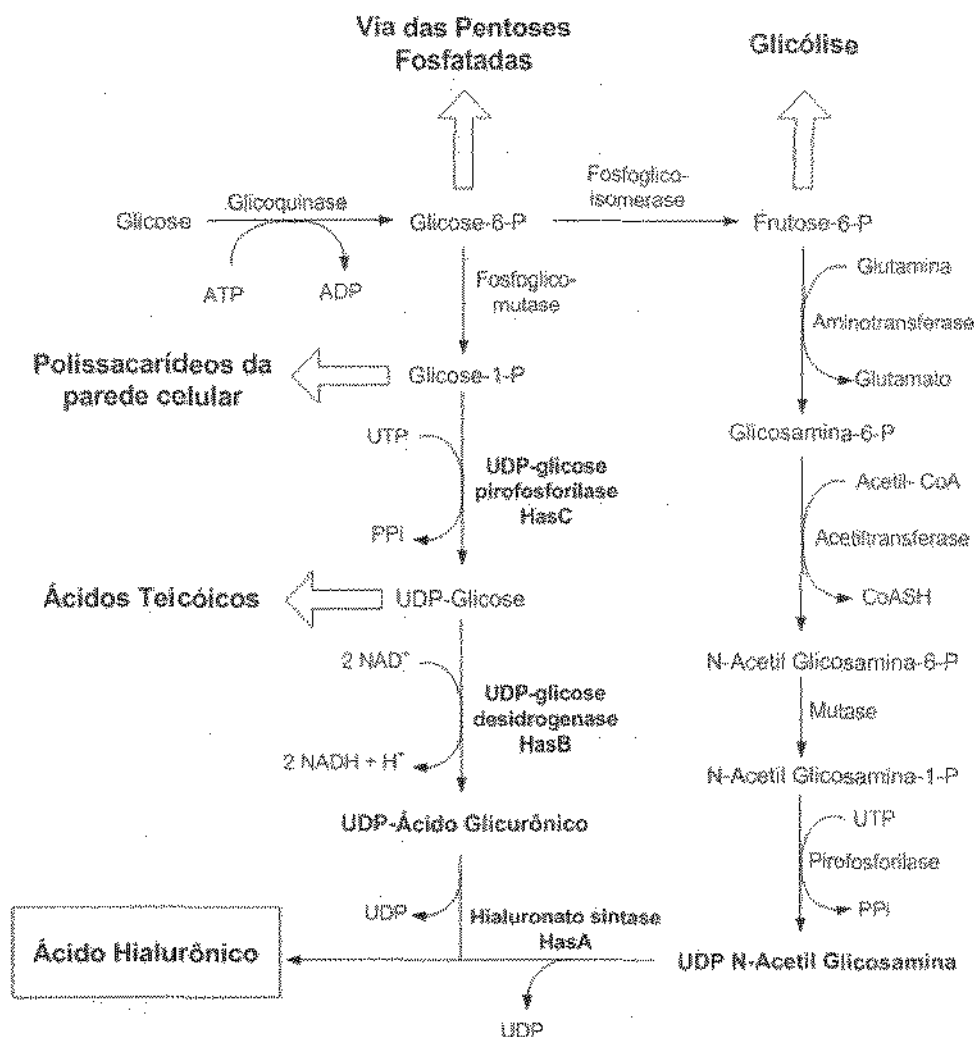


Figura 3.5 – Via biossintética para produção de ácido hialurônico por *Streptococcus*. Adaptado de Chong *et al.* (2005).

A via originada da frutose-6- fosfato está envolvida na produção de aminoaçúcares. A transferência do grupo amino da glutamina para a frutose-6-fosfato por uma aminotransferase (EC 2.6.1.16) produz glicosamina-6-fosfato. A transferência do grupo acetil por uma acetiltransferase (EC 2.3.1.4) forma N-acetil glicosamina-6-fosfato. Essa é uma etapa que consome energia, uma vez que a hidrólise da ligação tioéster na molécula de acetil-coA libera energia equivalente à hidrólise de ATP. Rearranjo do grupo fosfato por uma mutase (EC 5.4.2.3) gera N-acetil glicosamina-1-fosfato a partir de N-acetil glicosamina-6-fosfato. Por fim, a pirofosforilase (EC 2.7.7.23) adiciona UDP para obtenção de UDP-N-acetilglicosamina. A participação de UTP nessas reações gera doadores glicosil ativados que podem ser polimerizados em HA por HA sintase (Chong *et al.*, 2005).

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

Além de fornecer os precursores para a síntese de HA, essas duas vias fornecem também constituintes estruturais da parede celular bacteriana como peptideoglicano e ácidos teicóicos. Assim, para produção de grandes quantidades de HA pelas células, é necessário que esses metabólitos sejam mantidos em níveis adequados para sustentar o crescimento celular (Widner *et al.*, 2005). Armstrong (1997) observou uma relação negativa entre a velocidade específica de crescimento e a produtividade específica de HA e sua massa molar. Porém, essa relação negativa ocorre somente quando a inibição do crescimento não está associada com assimilação reduzida de glicose. Quando as condições tornam-se severas suficientes para inibir o consumo de glicose, primeiro a produtividade e, em seguida, a massa molar diminuem. Esse comportamento indica que a produção de HA compete por fontes limitadas com a síntese de massa celular. Quando for possível reduzir a demanda de massa celular sem reduzir o fornecimento de substrato, maior concentração de HA e de maior massa molar será produzida.

Algumas estratégias podem ser empregadas com o intuito de aumentar a massa molar do HA obtido, dentre elas aumento do tempo de vida da sintase, diminuição da taxa de síntese de biomassa para reduzir a competição pelas fontes e aumento do fluxo. Esta discussão conduz a um levantamento de várias estratégias para aumentar a competição pelas fontes, aumento do fluxo de fontes para síntese de HA e aumento da energia eficiente da célula (Chong e Blank, 1998).

HA vem sendo produzido comercialmente desde a década de 80. Devido à sua alta viscosidade, observam-se restrições práticas quanto à fermentação de HA acima de 5-10 g.L⁻¹, concentrações alcançadas por estirpes selvagens em modo batelada (Chong *et al.*, 2005). Apesar dos custos de produção associados a fermentações curtas e a necessidade de remoção de proteínas contaminantes liberadas no início da fase estacionária, HA normalmente é produzido em

batelada, uma vez que sua síntese apresenta-se instável em cultura contínua, exceto a taxas de diluição muito baixas (Blank *et al.*, 2005).

Preparações de HA obtidas por processo fermentativo apresentam alta massa molar. Contudo, o risco de mutação das cepas bacterianas e possível co-produção de toxinas, pirogênicos e imunogênicos impedem a ampla aplicação de HA de origem microbiana em práticas clínicas. Essa é a razão pela qual amostras de HA extraídas de crista de galo ainda são preferidas em casos de tratamento humano, quando HA é destinado para injeções nos olhos e articulações, por exemplo. Os produtos de HA extraídos de crista de galo geram preocupações com relação a pacientes alérgicos a produtos derivados de aves. Assim, fontes alternativas para produção de HA estão sendo estudadas (Kogan *et al.*, 2007).

3.6.1. BACTÉRIAS DO GÊNERO *STREPTOCOCCUS*

Nos últimos 15 anos ocorreram mudanças na taxonomia e nomenclatura do gênero *Streptococcus*. Essas mudanças resultam da aplicação de técnicas moleculares que ajudam a delinear diferenças em gêneros e espécies bacterianas (Facklam, 2002). O manual de bacteriologia sistemática de *Bergey* (Schleifer, 1986) listou somente 7 gêneros de cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos: *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Stomatococcus*. Atualmente, existem 17 gêneros diferentes de cocos gram-positivos, sendo discutido aqui somente o gênero *Streptococcus*. Os ensaios mais antigos para diferenciar *Streptococcus* provavelmente foram realizados em 1903 por Shottmuller, que utilizou ágar sangue para diferenciar cepas que foram β -hemolíticas daquelas que não foram. Antes de 1933, somente testes de fermentação e tolerância foram realizados para diferenciar muitos dos streptocócoci. Em 1933, Lancefield descreveu a técnica de demonstrar “grupos” de antígenos associado com as cepas β -hemolíticas. Em 1937, Sherman propôs um esquema para dividir *Streptococcus* em 4 categorias. Essas categorias foram organizadas pela reação hemolítica, grupo de antígenos e testes fenotípicos (principalmente testes de fermentação e tolerância). As quatro divisões de Sherman foram: divisão piogênica, divisão viridans, divisão lática e enterococos. A divisão piogênica incluiu as cepas β -hemolíticas com grupo de antígenos definidos (A, B, C, E, F e G). Essa divisão não é consideravelmente diferente dos sistemas de identificação atuais baseados no sorogrupo. A divisão viridans de Sherman inclui espécies *Streptococcus* que não são β -hemolíticas, não toleram condições de crescimento a pH elevado,

não são halotolerantes e não crescem a 10°C. Esse grupo ainda hoje é conhecido como *Streptococcus viridans*. A divisão lática de Sherman inclui cepas que foram primeiramente associadas com a fabricação de produtos lácteos e não foram associadas com infecções humanas. Esse grupo difere do piogênico por não ser β -hemolítico, apresentando capacidade de crescer a 10°C mas não a 45°C, e por parar de crescer em caldo contendo 6,5% NaCl. A divisão lática de Sherman foi reclassificada como gênero *Lactococcus* na metade dos anos 80. A quarta divisão de Sherman foi denominada enterococos e incluem 4 espécies conhecidas até aquela data (Facklam, 2002). Embora alguns dos enterococos foram β -hemolíticos, outras características como capacidade de crescer em caldos a pH elevado, alta concentração de sais e ampla faixa de temperatura, os diferenciaram das outras 3 divisões.

A produção de HA 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 (Kendall *et al.*, 1937) e o grupo C, patógeno de animais. Tais microrganismos são β -hemolíticos por exibirem β -hemólise pela estreptolisina quando cultivados em placas de ágar sangue. Embora a correlação entre a capacidade de produção da estreptolisina e a patogenicidade do microrganismo não seja claramente entendida, HA para aplicações médicas ou cosméticas não pode estar contaminado com essa proteína. Dificilmente consegue-se produzir HA efetivamente não contaminado com estreptolisina (Thonard *et al.*, 1963, Holmstron e Ricici, 1967; Woolcock, 1974).

A seleção de cepas microbianas para produção de HA normalmente é um processo randômico. Expressão de hialuronidase, enzima que despolimeriza HA, e outras proteínas extracelulares é uma desvantagem da utilização de cepas selvagens de *Streptococcus*. 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 HA de alta massa molar (Stangohl, 2000; Stangohl, 2003).

Assim, foram selecionados mutantes de *S. zooepidemicus*, HA-116, ATCC 39920 de patogenicidade desprezível (mínimo de hemolisina) (Nimrod *et al.*, 1988), NH-131, também não hemolítico, depositado no *Fermentation Research Institute* como FERM P-7580 e FERM BP-784 (Akasaka *et al.*, 1989), *S. equi* NCIMB 40327 (Ellwood, *et al.*, 1985), *S. zooepidemicus* NCTC

7023 (Swann *et al.*, 1990). *S. equi* KFCC 10830, mutante derivado do *S. equi* ATCC 6580 (Kim *et al.*, 1996), o qual teve características não hemolíticas e foi hialuronidase negativa, ou seja, não produtor de hialuronidase. Outra linhagem mutante de *S. equi*, ATCC 39506, também foi hialuronidase negativa (Brown *et al.*, 1988). Cepas de *Streptococcus* supercapsuladas obtidas por mutagênese de *S. equi* foram utilizadas por Stangohl (2000).

3.6.2. METABOLISMO DE *STREPTOCOCCUS*

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. A Figura 3.6 apresenta as vias metabólicas centrais envolvidas na conversão de glicose a HA e outros metabólitos por *Streptococcus zooepidemicus*.

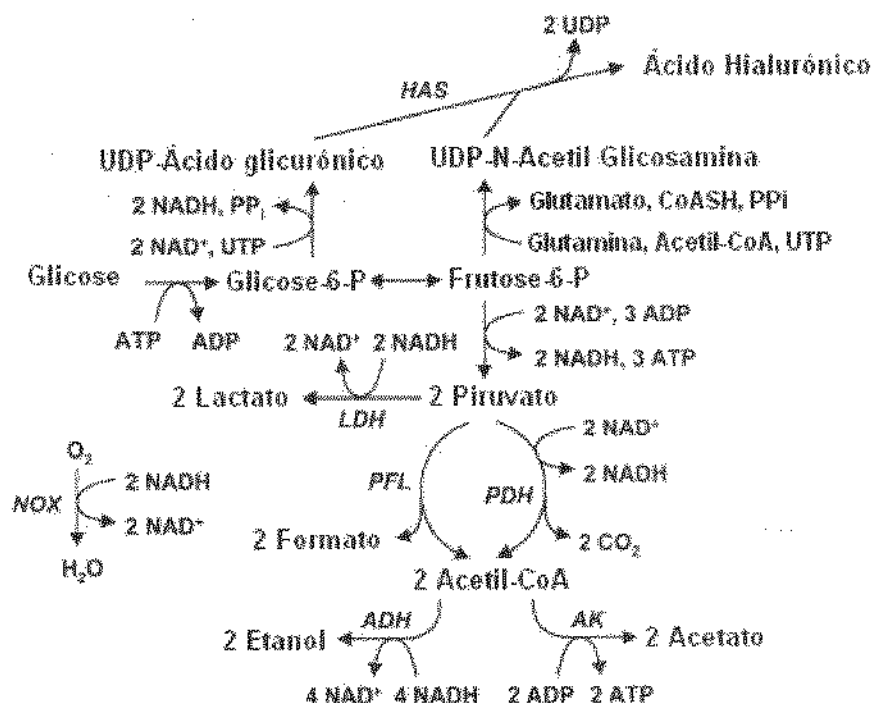


Figura 3.6 – Vias metabólicas centrais em *Streptococcus zooepidemicus* envolvidas na conversão de glicose a HA e outros metabólitos. HAS: hialuronato sintase; NOX, NADH oxidase; LDH, lactato desidrogenase; PFL, piruvato formato liase; PDH, piruvato desidrogenase; ADH, álcool desidrogenase; AK, acetato quinase. Adaptado de Chong *et al.* (2005).

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 (Figura 3.7).

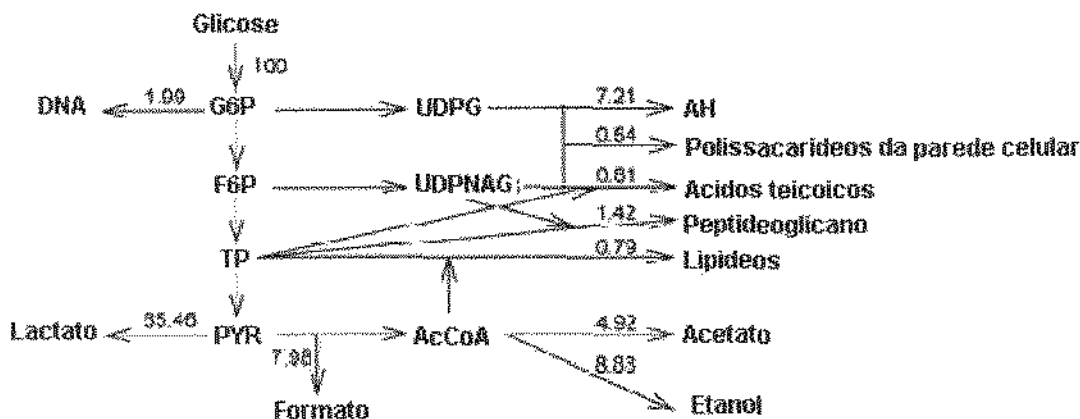


Figura 3.7 – Fluxo de carbono baseado em 100 C-mol de glicose consumido. Fluxos foram estimados a partir das alterações nas concentrações de metabólitos durante a fase exponencial de crescimento, utilizando modelo de fluxo metabólico. O balanço de carbono foi próximo de 98,5% e contribuições do metabolismo de aminoácidos foram desconsideradas. G6P: glicose-6-fosfato, F6P: frutose-6-fosfato, TP: triose fosfatos, PYR: piruvato, UDPG: UDP-ácido glicurônico, UDPNAG: UDP-N-acetil glicosamina, AcCoA: acetil-CoA. Adaptado de Chong e Nielsen, (2003).

3.6.3. MEIO DE CULTURA

3.6.3.1. MEIOS COMUMENTE EMPREGADOS

Streptococcus são bactérias lácticas nutricionalmente fastidiosas que requerem meio de cultivo rico para crescimento. Geralmente esses microrganismos são cultivados em meios complexos contendo extrato de levedura ou extrato animal, peptona e soro. 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 g.L⁻¹), aminoácidos, nucleotídeos, sais e vitaminas.

Kim *et al.* (1996) cultivaram a cepa de *Streptococcus equi* ATCC 6580 em meio quimicamente definido, descrito por Stoolmiller e Dorfman (1969) para estudar mutantes negativos em hialuronidase. As várias condições de cultura foram otimizadas em fermentador de 5 litros para produção de ácido hialurônico de alta massa molar.

3.6.3.2. FONTE DE CARBONO

A fonte de carbono mais comum nos diversos trabalhos envolvendo produção de HA 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; Akasaka *et al.*, 1989; Holmstrom e Rílica, 1967; Thonard *et al.*, 1964).

Armstrong e Johns (1997) avaliaram o efeito de diferentes condições de cultivo na massa molar de HA produzido por *Streptococcus zooepidemicus* e a concentração inicial de glicose foi a que apresentou efeito mais pronunciado. Os autores sugeriram duas explicações para este efeito. Primeiro, quando os monômeros UDP-G e UDP-NAG estão presentes em altas concentrações, o alongamento da cadeia persiste. A concentração externa de glicose pode estar ligada à concentração interna desses monômeros, uma vez que esses são derivados da glicose e sua síntese requer considerável consumo de energia. Segundo, crescimento diáuxico foi observado em altas concentrações de glicose. Embora a massa molar foi maior em concentrações de glicose mais elevadas, o rendimento em HA foi inferior provavelmente devido às limitações de transferência de massa decorrente do aumento da viscosidade do meio de fermentação, que impede a manutenção de boas condições de mistura no reator mesmo a velocidade de agitação de 1000 rpm.

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

3.6.3.3. FONTE DE NITROGÊNIO

Streptococcus dos grupos A e C de Lancefield são nutricionalmente fastidiosos, principalmente com relação ao nitrogênio orgânico. De modo geral, os meios incluem extrato de levedura, peptonas ou hidrolisado de caseína como fonte de nitrogênio e fatores de crescimento assim 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).

Armstrong *et al.* (1997) avaliaram os requerimentos nutricionais para crescimento e síntese de HA por *Streptococcus zooepidemicus*, definindo 11 aminoácidos essenciais (além da glutamina): arginina, lisina, cisteína, isoleucina, tirosina, metionina, histidina, valina, fenilalanina, leucina e triptofano. Os autores observaram menor velocidade de crescimento em meio quimicamente definido contendo os 11 aminoácidos essenciais que em meio complexo com extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Segundo os autores, certos aminoácidos competem pelo mesmo sistema de transporte e a presença de peptídeos no extrato de levedura permite rotas alternativas para assimilação de aminoácidos. Além disso, o transporte de peptídeos pode ser mais eficiente que o transporte de aminoácidos individuais.

Estudos envolvendo a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* geralmente utilizam extrato de levedura como fonte de nitrogênio orgânico (Blank *et al* 2005; Ogrodowski *et al*, 2005; Cooney *et al.*, 1999; Johns *et al*, 1994). Segundo Ogrodowski *et al.* (2004), para produção de ácido hialurônico o efeito da fonte de nitrogênio (extrato de levedura) é muito mais significativo que o da glicose no meio.

Para definição das fontes de nitrogênio orgânico a serem avaliadas neste estudo, utilizou-se como parâmetro os requerimentos nutricionais descritos por Armstrong *et al.* (1997). A Tabela 3.3 apresenta o perfil dos aminoácidos classificados como essenciais em diferentes fontes de nitrogênio orgânico provenientes de subprodutos agroindustriais.

Apesar de ser considerada uma boa fonte de nitrogênio orgânico devido à sua elevada concentração de proteína, o extrato de levedura apresenta um elevado teor de ácidos nucleicos, particularmente RNA, o que pode oferecer certas restrições à sua utilização como suplemento do meio de cultura, considerando-se a exigência de maior número de etapas no processo de recuperação e purificação do bioproduto. Caballero-Córdoba e Sgarbieri (2000) apresentam um procedimento para obtenção de um autolisado de levedura contendo baixo teor de RNA, que resulta em uma atrativa fonte de nitrogênio orgânico devido à concentração das proteínas presentes na suspensão de células e à redução do teor de ácidos nucleicos.

Tabela 3.3 - Perfil dos aminoácidos essenciais para o crescimento de *Streptococcus zooepidemicus* em diferentes fontes complexas de nitrogênio orgânico.

Aminoácidos (g/100g proteína)	Extrato de levedura	Autolisado de levedura	Concentrado protéico de soja	Concentrado protéico de soro de leite (80%)	Hidrolisado de água de maceração de milho
Arginina	1,01	2,40	7,90	3,18	8,23
Lisina	8,58	9,54	6,90	9,83	3,97
Cisteína	1,30	0,90	1,40	2,28	1,22
Isoleucina	5,69	4,87	5,20	6,41	3,40
Tirosina	2,17	3,57	4,00	3,26	0,74
Metionina	1,26	1,21	1,50	2,35	1,07
Histidina	3,01	3,15	2,80	2,41	6,78
Valina	6,76	5,87	5,40	6,09	3,88
Fenilalanina	4,74	4,96	5,40	3,56	2,05
Leucina	8,07	7,80	8,50	11,60	5,86
Triptofano	1,31	1,55	0,12	1,80	-
Total	43,90	45,82	49,12	52,77	37,20

Fonte: Sgarbieri *et al.*, 1999; Kreider, 2004; Cardinal e Hedrick, 1948.

O concentrado protéico de soro encontra-se entre as fontes mais complexas de nitrogênio orgânico normalmente empregadas para o crescimento de bactérias lácticas (Shuler e Kargi, 2002). Bury *et al.* (1998) utilizaram concentrado protéico de soro como suplemento e observaram um aumento significativo no crescimento de bactérias lácticas e no tamanho da cápsula produzida por *Streptococcus thermophilus*. Segundo Zisu e Shah (2003), que também observaram aumento na produção de exopolissacarídeo produzido por *Streptococcus thermophilus* quando o meio foi suplementado com concentrado protéico de soro, esse comportamento está relacionado não só à fonte de nitrogênio como também à capacidade tamponante da proteína e de fosfatos presentes no concentrado protéico de soro. A capacidade tamponante do meio torna-se um fator extremamente importante para o crescimento celular, considerando-se a natureza homofermentativa dos streptococci (Terzhagi e Sandine, 1975).

A água de maceração de milho apresenta-se como uma solução rica em aminoácidos e polipeptídeos que são excelentes fontes de nitrogênio para a maioria dos microrganismos (Liggett e Koffler, 1948). As proteínas, peptídeos e aminoácidos presentes podem ainda fortalecer a capacidade tamponante do meio, conforme demonstrado por Noro *et al.* (2004). A água de maceração de milho apresenta ainda em sua composição quantidades consideráveis de vitaminas do complexo B e nutrientes minerais, especialmente cálcio, magnésio, fósforo, potássio e ferro. Normalmente, pode ser empregada como suplemento ou como principal fonte de nitrogênio e carbono para diferentes tipos de microrganismos (Liggett e Koffler, 1948).

Com base nos aminoácidos classificados como essenciais para o crescimento de *Streptococcus zooepidemicus*, o concentrado protéico de soja apresenta-se como potencial fonte de nitrogênio para o meio de cultivo. Gonçalves *et al.* (2002) empregaram hidrolisado enzimático de soja como fonte de nitrogênio para produção de polissacarídeo capsular por *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 23F obtendo bons resultados, principalmente com relação ao crescimento celular.

3.6.3.4. ÍONS MINERAIS

Os minerais fornecem elementos necessários ao cultivo da célula, sendo alguns como magnésio (Mg^{++}) e potássio (K^{+}) considerados macronutrientes, ou seja, necessários em concentrações acima de 10^{-4} M, e outros necessários em menor quantidade denominados elementos traço como ferro (Fe^{++} e Fe^{+++}), zinco (Zn^{++}), manganês (Mn^{++}), molibdênio (Mo^{++}), cobalto (Co^{++}), cobre (Cu^{++}) e cálcio (Ca^{++}).

Esses elementos apresentam variadas funções biológicas (Tabela 3.4) atuando como cofatores enzimáticos de inúmeras reações, síntese de vitamina e transporte através da parede e membrana celular (Vogel e Todaro, 1997).

Tabela 3.4 – Funções fisiológicas dos principais elementos requeridos pela célula.

Elemento	Símbolo	Função fisiológica
Sódio	Na	Principal cátion extracelular, cofator enzimático.
Potássio	K	Principal cátion intracelular, cofator de enzimas, requerido no metabolismo de carboidratos.
Magnésio	Mg	Importante cátion divalente celular, cofator inorgânico de muitas reações enzimáticas.
Cálcio	Ca	Importante cátion celular, cofator de enzimas como proteases e amilases.
Manganês	Mg	Cofator de enzimas como proteases, atua na regulação do metabolismo secundário e excreção de metabólitos primários.
Ferro	Fe	Constituinte do citocromos e outras proteínas heme ou não heme, cofator de várias enzimas.
Cobalto	Co	Constituinte da vitamina B ₁₂ e suas coenzimas derivadas.
Cobre	Cu	
Zinco	Zn	Constituintes inorgânicos de enzimas especiais.
Molibdênio	Mo	

Fonte: Vogel e Todaro (1997); Shuler e Kargi (2002).

Dentre os íons relacionados à síntese de HA destacam-se o magnésio e manganês, que atuam como cofatores de glicosiltransferases responsáveis pela síntese da cadeia repetida de dissacarídeos (Deangelis, 2002). A atividade da maioria das glicosiltransferases depende de um cátion divalente que, segundo Petrova *et al.* (2001), contribui para ligação dos açúcares-nucleotídeos devido à estabilização da conformação da fração pirofosfato, além de auxiliar na estabilização do produto final por meio da neutralização de cargas envolvidas no UDP pelos mecanismos catalíticos. Cátion monovalentes como sódio e potássio inibiram a atividade da hialuronato sintase, conforme observado por Tlapak-Simmons *et al.* (2004). Cátions divalentes, como o cálcio, são ditos também importantes na conformação helicoidal da molécula de HA que,

por sua vez, é determinante em sua função biológica (Winter e Arnott, 1977). Stern (2003) inclui a concentração de cálcio também como fator determinante nos níveis de HA sintetizados por cultura de células humanas. Ainda em células humanas, a disponibilidade de zinco e magnésio é considerada fator de impacto nos níveis de HA (Thompson *et al.*, 1975).

Estudos avaliando o envolvimento direto do íon sódio na síntese de HA ainda são escassos. Porém, o efeito deste íon pode afetar indiretamente a produção do polímero visto que, para algumas bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus*, o sódio está diretamente envolvido na excreção de lactato por meio do simporte de íons sódio e do produto final da fermentação (White, 2000).

Além de sais, a adição de tampões ao meio de cultivo pode influenciar o crescimento e formação de produto. A suplementação do meio quimicamente definido empregado por Armstrong *et al.* (1997) com citrato de sódio e bicarbonato de sódio foi benéfico para o crescimento celular. A função do citrato ainda é incerta, embora foi relacionada com quelação de íons. O efeito do bicarbonato de sódio provavelmente está relacionado à manutenção das concentrações adequadas de dióxido de carbono (CO_2) no meio de cultivo. Embora CO_2 não seja produzido por *Streptococcus zooepidemicus* durante fermentação homolática, esse composto pode exercer importante função em reações anapleróticas que envolvem o consumo de CO_2 . Como *Streptococcus* não realizam o ciclo do ácido cítrico, as reações anapleróticas podem ser importantes para síntese de oxaloacetato, importante precursor de pirimidinas e família aspartato de aminoácidos, a partir de fosfoenolpiruvato (Kandler, 1983).

3.6.4. CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO

A produção microbiana de HA apresenta uma oportunidade de otimizar o rendimento e qualidade do produto por meio de engenharia genética e controle das condições de cultivo, visto que a maioria dos produtos formados pelos microrganismos é resultado de sua resposta a condições ambientais como nutrientes, vitaminas, íons, temperatura, pH e teor de oxigênio dissolvido (Shuler e Kargi, 2002).

3.6.4.1. TEMPERATURA

A temperatura é um importante fator que influencia tanto o crescimento celular como a formação do produto fermentativo. Contudo, a temperatura ótima para crescimento e formação de produto podem ser diferentes (Shuler e Kargi, 2002).

Kim *et al.* (1996) encontraram temperatura ótima de 37°C para crescimento e produção de HA por um mutante de *Streptococcus equi*. Uma redução na massa molar do HA produzido foi observada a temperaturas inferiores a 37°C.

Armstrong e Johns (1997) observaram um aumento no rendimento e massa molar de HA em menores temperaturas (32 a 35°C), enquanto a velocidade específica de crescimento foi maior a 40°C. Os autores sugerem que este efeito está relacionado à redução da velocidade específica de crescimento com a diminuição da temperatura e à competição por fontes de substrato e energia entre as vias catabólicas, anabólicas e de síntese de HA que existe durante a fase exponencial de crescimento. O metabólito UDP-NAG, por exemplo, é um precursor comum à síntese de parede celular e polimerização de HA. Quando a velocidade de crescimento microbiano é baixa, moléculas de precursores principalmente glicose e glutamina e energia podem estar disponíveis para a síntese de HA.

Chong e Blank (1998) analisaram o efeito de vários parâmetros da fermentação na massa molar de HA produzido por *Streptococcus zooepidemicus* e determinaram os fatores que tiveram maior efeito significativo na produção de HA de alta massa molar, dentre eles menor temperatura de processo (28°C).

3.6.4.2. POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (PH)

Sabe-se da importância do pH do meio de cultivo, visto sua influência na atividade de enzimas e, conseqüentemente, na velocidade de crescimento microbiana (Shuler e Kargi, 2002).

A enzima que catalisa a polimerização de HA, hialuronato sintase, apresenta atividade máxima a pH 7,1 em extratos livres de células obtidos de streptococci do grupo A de Lancefield (Stoolmiller e Dorfman, 1969). Tlapak-Simmons *et al.* (2004) determinaram uma ampla faixa de atividade (6,5-11,5) para hialuronato sintase extraída de células de *Streptococcus equisimilis*.

Quanto ao efeito do pH no cultivo de streptococci, Akasaka *et al.* (1988) demonstraram que pH 7,4 resulta em HA de maior viscosidade comparado a pH 6,0 e 7,9. Os efeitos do pH, agitação e aeração sobre a produção de HA por *Streptococcus zooepidemicus* foram estudados por Johns *et al.* (1994). Essas variáveis tiveram grande influência na produção de HA em cultivo em batelada, sendo que o pH ótimo foi $6,7 \pm 0,2$. Adicionalmente, Liu *et al.* (2008) investigaram uma estratégia de cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* sob stress alcalino intermitente (8,5),

que aumentou a produção de HA por meio do redirecionamento do fluxo de carbono de massa celular para o HA.

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

3.6.4.3. AGITAÇÃO

Agitação e aeração são fatores importantes em processos aeróbios e têm efeito significativo no rendimento da maioria dos biopolímeros (Richard e Margaritis, 2003).

HA pode ser produzido sob condições anaeróbias ou aeróbias, sendo a última condição mais favorável para obtenção de HA de maior massa molar. O efeito da agitação ainda não foi completamente esclarecido, sendo descrita a necessidade de agitação vigorosa para melhorar a transferência de massa, ainda que a cadeia polimérica possa ser suscetível à tensão mecânica. (Armstrong e Johns, 1997).

Segundo Armstrong e Johns (1997), a massa molar de HA produzido por *Streptococcus zooepidemicus* não foi afetada pelos diferentes níveis de agitação (300 a 1000 rpm) no fermentador, o que sugere que as moléculas de HA são relativamente resistentes a forças cisalhantes do agitador. Consequentemente, altas taxas de agitação, que melhoram o rendimento e taxa de produção de HA, podem ser empregadas sem danificar as moléculas do biopolímero.

3.6.4.4. AERAÇÃO

Com relação ao HA, aeração pode melhorar de forma considerável seu rendimento comparado com o rendimento correspondente à cultura em anaerobiose. *Streptococcus* são microrganismos anaeróbios facultativos incapazes de utilizar a fosforilação oxidativa. Entretanto, o oxigênio pode ser utilizado para oxidar o NADH por meio de várias NADH oxidases. Como resultado, a produção de etanol não será requerida com esse propósito e a bactéria pode produzir exclusivamente acetato, que conduz a um rendimento teórico de 4 ATP por mol de glicose (Chong *et al.*, 2005). A enzima piruvato formato liase é sensível a oxigênio não contribuindo, portanto, para elevar os níveis de acetato na presença de oxigênio (Abbe *et al.* 1982). Em seu lugar, a maior produção de acetato é atribuída à indução da enzima piruvato oxidase, capaz de

converter piruvato a acetil-fosfato na presença de oxigênio. Acetil-fosfato é então convertido a acetato com concomitante produção de ATP. Alternativamente, descarboxilação redutiva de piruvato pelo complexo piruvato desidrogenase produz acetil-CoA e CO₂. Acetil-CoA pode ser usada para produção de acetato com geração de energia associada. A atividade NADH oxidase (NOX) pode impedir a inibição da piruvato desidrogenase por altas razões NADH/NAD⁺ conhecidas ocorrer em muitas bactérias Gram-positivas. A desvantagem da aeração é a geração de peróxido pela piruvato oxidase e outras enzimas que podem inibir o crescimento do *Streptococcus* que é catalase negativo e conduzir a despolimerização de HA (Chong *et al.*, 2005).

Sob condições anaeróbias, o rendimento de HA varia na faixa de 0,3 a 1,0 g.L⁻¹ (Thonard *et al.*, 1964, Holmstrom e Ricica, 1967). O HA obtido nessas condições geralmente possui massa molar média 7×10^5 Da ou menor. Sob condições aeróbias, um produto com maior massa molar (cerca de 2×10^6 Da ou mais) pode ser obtido com rendimento equivalente (Akasaka *et al.*, 1988).

O papel do oxigênio na produção de HA é controverso, e sugere-se que HA funcione como um escudo protegendo o *Streptococcus* dos efeitos tóxicos do oxigênio. Então, condições aeróbias estimulariam a produção de HA por um mecanismo protetor das células. Essa teoria foi em parte suportada no trabalho de Swann *et al.* (1990) que, por meio de vários exemplos, determinaram que rendimentos mais elevados de HA são obtidos com o crescimento controlado dos microrganismos. Reduzindo a disponibilidade de oxigênio em uma etapa crítica da fase exponencial de crescimento das células, o microrganismo responde com maiores taxas de produção de HA. A escassez de oxigênio promove a produção de ácido láctico e HA, enquanto maiores níveis de oxigênio estimulam a produção de biomassa e de ácido acético, em detrimento do HA.

Armstrong e Johns (1997) demonstraram que a aeração de culturas de *Streptococcus zooepidemicus* conduziu a um maior rendimento de HA e de maior massa molar. Sob condições aeróbias, acetato foi produzido a partir de piruvato, o que conduz a uma regeneração de 1 mol de ATP por mol de glicose consumido, comparado com a produção de lactato. Visto que a biossíntese de HA é um processo dispendioso de energia, o maior rendimento em ATP sob condições aeróbias pode explicar o melhor rendimento e grau de polimerização de HA. Alguns trabalhos sugerem que condições anaeróbias podem aumentar a degradação de HA por radicais

livres derivados do oxigênio, o que conduziria a uma redução da massa molar e alargamento da distribuição da massa molar. Esse comportamento não foi observado por Armstrong e Johns (1997).

Huang *et al.* (2006) avaliaram a função do oxigênio dissolvido e da agitação na produção de HA por *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 e sugerem que a função do oxigênio na síntese de HA não é de substrato, mas sim como estimulante. Além disso, determinaram o nível crítico de oxigênio dissolvido para a produção de HA em 5% de saturação do ar.

Duan *et al.* (2009) investigaram o efeito do oxigênio dissolvido no rendimento e massa molar de HA e observaram que a expressão do gene *has* assim como a atividade da hialuronato sintase são reprimidas sob condições anaeróbias. Além disso, a massa molar de HA demonstrou dependência do efeito concomitante da geração de ATP e espécies reativas de oxigênio.

3.7. ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS

3.7.1. PRINCIPAIS FUNDAMENTOS TEÓRICOS

As respostas bioquímicas às diferentes condições nutricionais e de cultivo descritas nos itens 3.6.3 e 3.6.4 podem fornecer um melhor entendimento da fisiologia e metabolismo celular. Esse melhor entendimento pode ser obtido por meio da análise de fluxos metabólicos (MFA), importante ferramenta de análise do metabolismo celular que quantifica os fluxos no metabolismo de um determinado organismo, sob condições definidas (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

Considerando-se a importância das vias e fluxos metabólicos para a MFA, é importante elaborar bem suas definições. Uma via metabólica é definida como qualquer sequência de reações bioquímicas viáveis e observáveis, enquanto o fluxo metabólico representa a taxa na qual a substância é processada através desta via. A importância da viabilidade e observabilidade das reações deve ser ressaltada. Sequência de reações compreendendo enzimas que não estão presentes em uma célula, assim como enumeração de reações viáveis entre substratos e produtos que não podem ser observadas experimentalmente, são de pouco valor. Os fluxos metabólicos são determinantes fundamentais da fisiologia celular e, juntamente com a concentração intracelular

de metabólitos, definem a informação mínima necessária para descrever o metabolismo e fisiologia celular sob uma série de condições ambientais (Stephanopoulos, 1999).

Em termos matemáticos, o problema resume-se a encontrar a solução para um sistema linear de equações algébricas, as quais representam a estequiometria das reações metabólicas consideradas. Por esta razão, alguns autores preferem utilizar o termo Balanço de Fluxos Metabólicos ou ainda Análise de Fluxos Metabólicos (Varma e Palsson, 1994).

Os primeiros trabalhos que fizeram uso de um modelo estequiométrico para a interpretação de dados experimentais datam de décadas passadas (Aiba e Matsuoka, 1979; Papoutsakis e Meyer, 1985). No entanto, somente com o trabalho de Holms (1986), a MFA foi introduzida como uma técnica de análise do metabolismo e mais tarde, com o trabalho de Vallino e Stephanopoulos (1990), esta técnica foi sistematizada por meio do uso de álgebra linear e cálculo matricial.

O modelo estequiométrico baseia-se na aplicação de balanços de massa aos metabólitos considerados, sendo que para os metabólitos intracelulares assume-se a hipótese de pseudo estado estacionário, o que significa que as reações de formação balanceiam as reações de consumo de cada metabólito (ou que não há acúmulo de metabólitos internos) (Gombert, 2001).

O ponto de partida de uma MFA é a estequiometria das reações da rede metabólica, descrevendo como substratos são convertidos em produtos e constituintes celulares. A Figura 3.8 mostra uma representação geral das reações envolvidas em uma rede com J fluxos $v_1, \dots, v_J$ a serem calculados. Os cálculos baseiam-se na medida de taxas específicas de consumo de substrato (N substratos) e secreção de produto (M produtos). A conversão dos N substratos em M produtos ocorrem via K metabólitos intracelulares (Nielsen *et al.*, 2003).

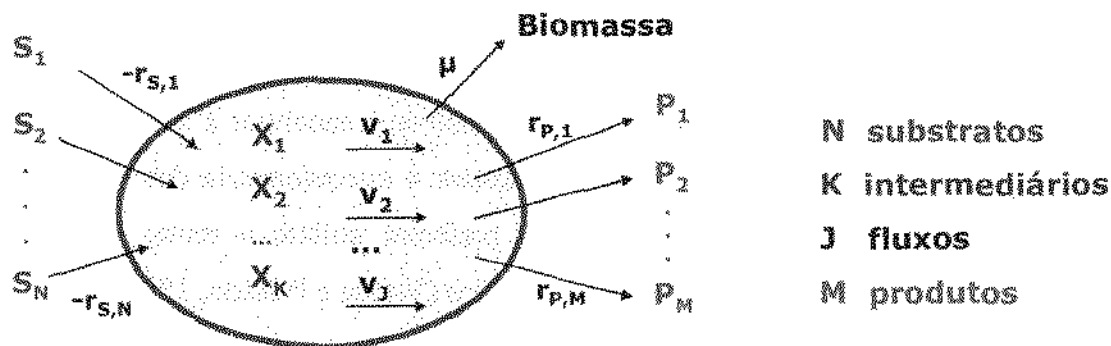


Figura 3.8 – Representação geral de reações consideradas em uma rede metabólica. N substratos entram na célula e são convertidos a M produtos metabólicos via um total de K metabólitos. As conversões ocorrem via J reações intracelulares pelas quais as taxas são dadas por $v_1, \dots, v_J$. Taxas de consumo de substrato ($-r_{s,1}, \dots, -r_{s,N}$) e formação de produtos ($r_{p,1}, \dots, r_{p,M}$) também são mostradas (Modificado de Nielsen *et al.*, 2003).

O balanço de massa aplicado aos K metabólitos intracelulares é dado pela equação 3.4 (Stephanopoulos *et al.*, 1998):

$$\frac{dc_{\text{met},k}}{dt} = r_{\text{met},k} - \mu_X \cdot c_{\text{met},k} \quad (3.4)$$

onde $c_{\text{met},k}$ é a concentração de cada um dos K metabólitos intracelulares considerados; $r_{\text{met},k}$ é a velocidade de formação do metabólito, que representa a soma de todas as reações nas quais ele é formado e consumido; e $\mu_X \cdot c_{\text{met},k}$ é o termo que representa a diluição do metabólito devido ao crescimento celular. Em função do estado estacionário metabólico, o termo da derivada no balanço de massa é igual a zero, ou seja, não existe acúmulo de metabólitos intracelulares. O estado estacionário metabólico é observado durante a fase exponencial de um cultivo em batelada ou durante o estado estacionário de um cultivo contínuo. Por outro lado, o termo referente à diluição do metabólito pode ser considerado desprezível em relação ao termo $r_{\text{met},k}$ visto que os metabólitos intracelulares têm uma concentração muito pequena em relação aos fluxos de sua formação e consumo (*turnover* muito rápido). Assim, o balanço de massa em torno de um metabólito intracelular se resume a:

$$r_{\text{met},k} = 0 \quad (3.5)$$

Considerando-se toda uma rede metabólica, as reações que levam à formação ou ao consumo de metabólitos intracelulares podem ser escritas como:

$$r_{\text{met},k} = \sum_{j=1}^J g_{jk} \cdot v_j \quad (3.6)$$

onde o índice k identifica o metabólito intracelular e o índice j a reação do metabolismo. A transformação da equação 3.6 em uma equação matricial permite reunir a informação sobre as velocidades de formação e consumo de todos os metabólitos intracelulares de uma rede metabólica, obtendo:

$$r_{\text{met},k} = G^T \cdot v \quad (3.7)$$

onde G é a chamada matriz estequiométrica dos metabólitos intracelulares, que contém colunas com informações sobre as reações de que um determinado metabólito participa e em linhas informações sobre quais metabólitos participam de uma determinada reação; v é o vetor de fluxos metabólicos, sendo alguns medidos e outros a serem calculados. Combinando-se as equações 3.5 e 3.7, obtém-se:

$$G^T \cdot v = 0 \quad (3.8)$$

A equação 3.8 pode ser considerada a equação fundamental da MFA e representa K balanços algébricos lineares para K metabólitos com J fluxos desconhecidos. Visto que o número de reações (J) é sempre maior que o número de metabólitos (K), existe um grau de liberdade (F) na série de equações algébricas dado por $F = J - K$.

Quando exatamente F taxas são medidas, o sistema torna-se determinado e a solução é única e obtida por inversão simples da matriz. Quando mais que F taxas são medidas, o sistema é sobredeterminado, podendo-se em sua resolução aplicar a matriz pseudo-inversa ou utilizar a redundância para verificar a consistência dos balanços globais, precisão dos fluxos medidos e validade da hipótese do estado estacionário metabólico. No caso de sistemas indeterminados, ou seja, com menos que F taxas medidas, algoritmo de otimização linear é empregado para calcular uma função distribuição que satisfaça uma dada função objetivo (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

Visto que as soluções das equações matriciais são geralmente deduzidas empregando-se técnicas numéricas, é importante avaliar a sensibilidade da solução com relação a pequenas

perturbações nas taxas extracelulares medidas. A sensibilidade do sistema à propagação de erros pode ser checada pelo cálculo do número de condicionamento da matriz (Equação 3.9), que depende unicamente da estequiometria das reações da rede metabólica. Se o número de condicionamento é alto (acima de 100), a matriz é mal condicionada e pequenos erros nas taxas medidas podem se propagar como grandes erros nos fluxos estimados (Bonarius *et al.*, 1997).

$$\text{número de condicionamento} = \|G^T\| \| (G^T)^\# \| \quad (3.9)$$

Na equação 3.9, $\| \cdot \|$ indica a norma da matriz estequiométrica G e $(G^T)^\#$ é a pseudo inversa da matriz estequiométrica dada pela equação 3.10.

$$G^\# = (G^T G)^{-1} G^T \quad (3.10)$$

Uma informação mais precisa da sensibilidade dos cálculos com relação às variações nos fluxos medidos é fornecida pela matriz sensibilidade que é dada pela inversa de G^T (equação 3.11).

$$\frac{\partial v}{\partial r_m} = (G^T)^{-1} \quad (3.11)$$

A derivada parcial especifica a sensibilidade de todos os elementos no vetor fluxo às taxas individuais medidas, ou seja, o elemento na j -ésima linha e i -ésima coluna especifica a sensibilidade do j -ésimo fluxo com relação a variações na medida da i -ésima taxa.

O conceito de balanço de metabólitos é uma ferramenta poderosa e atrativa, principalmente devido à sua simplicidade. Entretanto, apresenta como principal desvantagem seu limitado poder preditivo uma vez que informações regulatórias não são consideradas na formulação do modelo (Gombert and Nielsen, 2000).

O balanço de metabólitos fornece uma “fotografia” da distribuição dos fluxos metabólicos em um instante particular, sob diferentes condições ambientais (Vallino e Stephanopoulos, 1994). Para extração de maiores informações da rede metabólica, é necessária a combinação de balanço de metabólitos com experimentos utilizando substratos marcados, que permitem balanços de massa aplicados a átomos de carbono individuais. Essas restrições adicionais permitem uma estimativa mais confiável dos fluxos, além de uma análise das estruturas das vias e possíveis reversibilidades (Gombert e Nielsen, 2000).

3.7.2. ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO

Até o presente momento poucos trabalhos descrevem a utilização da MFA aplicada à produção de HA por processo fermentativo. Chong e Nielsen (2003) desenvolveram um modelo de fluxo metabólico para comparar os metabolismos de glicose e maltose durante o cultivo aeróbio de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246. Apesar das grandes diferenças no metabolismo energético, o rendimento e massa molar de HA foram pouco influenciados pelo açúcar empregado como substrato.

Gao *et al.* (2006) desenvolveram uma análise de fluxos metabólicos para produção de HA por *Streptococcus zooepidemicus* H23 em diferentes estágios do cultivo e sob diferentes tensões de oxigênio dissolvido. Os resultados mostraram que os fluxos para produção de células e HA alteraram significativamente para adaptar às condições ambientais, enquanto o fluxo para lactato foi praticamente estável.

Entretanto, Duan *et al.* (2009) compararam a distribuição dos fluxos metabólicos no cultivo aeróbio de *Streptococcus zooepidemicus* G1 em vários níveis de oxigênio dissolvido e demonstraram que a via para síntese de HA foi pouco afetada pelo nível de oxigênio dissolvido. Em contraste, os fluxos para lactato e acetato foram fortemente influenciados.

Chong e Nielsen (2003) e Duan *et al.* (2009) utilizaram o mesmo modelo estequiométrico Figura 3.9a, cuja estrutura se baseia na via Embden-Meyerhof-Parnas (v_1 - v_5); via das pentoses (v_{12} e v_{13}); reações responsáveis pela formação dos produtos de fermentação (lactato, acetato, formato e etanol) (v_6 - v_{10}); dados estimados da composição para *Streptococcus zooepidemicus*, incluindo a síntese de componentes da parede celular, lipídeos de membranas e grupamentos açúcar de nucleotídeos (v_{14} - v_{26} , v_{28} - v_{32}); via de produção de HA (v_{22} , v_{24} , v_{27}) e balanço de cofatores como ATP, NADH and NADPH.

A rede metabólica construída por Gao *et al.* (2006) se baseia no modelo desenvolvido por Chong e Nielsen (2003) desconsiderando, entretanto, a via das pentoses, a síntese dos grupamentos açúcar de nucleotídeos na composição celular e o cofator NADPH, que fornece o poder redutor para a biosíntese celular. Além disso, o modelo de Gao *et al.* (2006) não inclui a competição entre a síntese de HA e o crescimento celular por fonte de carbono e energia visto que, no modelo em questão, os precursores para a síntese de HA não são também considerados precursores para a biosíntese da parede celular. O modelo de Gao *et al.* (2006) é apresentado na

Figura 3.9b. Os metabólitos envolvidos em ambos os modelos são apresentados no Apêndice B do item 4.3 da seção de Resultados e Discussão.

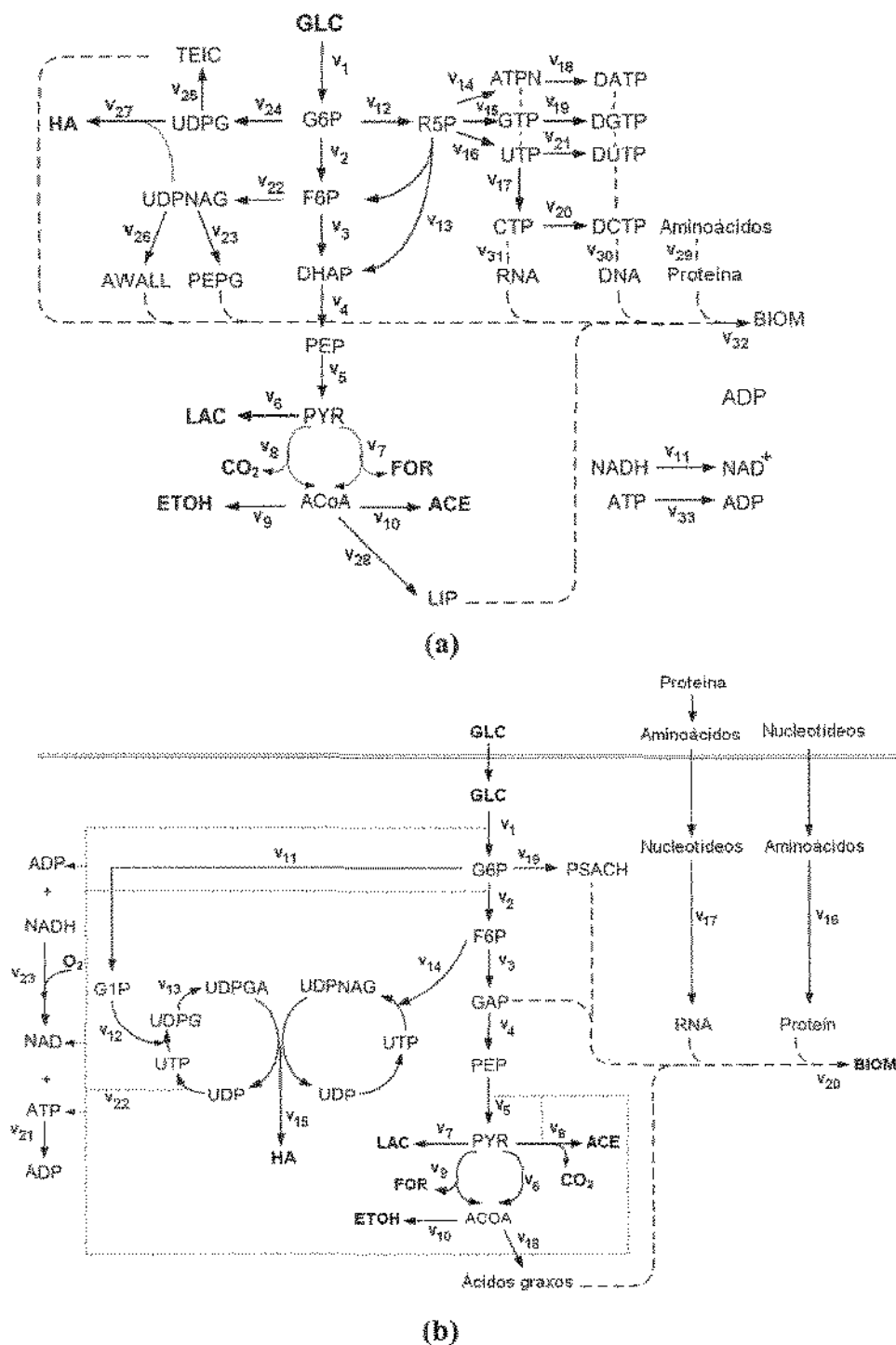


Figura 3.9 – Redes metabólicas para produção de HA por *Streptococcus zooepidemicus* definidas por (a) Chong e Nielsen (2003) e (b) Gao *et al.* (2006). As abreviações dos metabólitos são apresentadas no Apêndice B do item 4.3 da seção de Resultados e Discussão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção será apresentada na forma de capítulos, contendo os artigos submetidos a periódicos científicos selecionados de acordo com a afinidade do periódico com o aspecto abordado.

4.1. ALTERAÇÕES METABÓLICAS DECORRENTES DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE GLICOSE NO MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY”

METABOLIC EFFECTS FROM THE INITIAL GLUCOSE CONCENTRATION ON THE MICROBIAL PRODUCTION OF HYALURONIC ACID

Aline M. B. Pires and Maria H. A. Santana*

Laboratory of Development of Biotechnological Processes
School of Chemical Engineering, P.O.Box 6066
University of Campinas-UNICAMP
13083-970, Campinas-SP, Brazil

ABSTRACT – The metabolic effects induced by the initial glucose concentration (IGC) on the cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* for the production of hyaluronic acid (HA) were studied in this work. These effects were monitored along non-controlled pH cultivations, carried out in 125 mL Erlenmeyer flasks (natural aeration) and in a 3 L bioreactor (forced aeration) as well. The IGC effects were focused on three aspects: the main metabolites, the cell growth and HA production and the HA average molecular weight. Addressing the first aspect, the absence of glucose promoted a mixed acid metabolism independent from the oxygen supply, while for IGCs ranging from 5 to 90 g.L⁻¹ the homolactic metabolism was prevalent. Approaching the second effect, the IGC had no influence on the amounts of either the biomass or the HA produced in flasks cultivations. However, in the bioreactor cultivations, they were strongly dependent on the IGC. The highest HA concentration (1.21 g.L⁻¹) was obtained from 25 g.L⁻¹ IGC, which was the only cultivation where the conversion of glucose to HA was higher than the one of glucose to biomass. Regarding the average molecular weight, it increased with the IGC, independently from aeration. However, it decreased along cultivation under forced aeration, due to the shear imparted by stirring.

Key-words: hyaluronic acid; initial glucose concentration; metabolites, *Streptococcus zooepidemicus*.

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

Electronic address: mariahelena.santana@gmail.com

1. INTRODUCTION

The hyaluronic acid (HA) is an unbranched polysaccharide with high molecular weight, composed of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine disaccharides units, linked alternately by β -1-3 and β -1-4 glycoside bonds (1). Having unique hydrodynamic properties, the HA has been widely applied in the cosmetic and medical fields (2). The final products containing HA present high aggregated value ranging from US \$ 2,000 to 60,000.kg-1 regarding the above mentioned applications.

HA is widespread in nature, having been identified in vertebrate soft tissues, cultured eukaryotic cell lines and certain prokaryotes as pathogenic groups A and C streptococci which synthesize HA as an extracellular capsule (3).

Streptococci are Gram-positive bacteria whose main fermentation product from carbohydrates is lactate (lactic acid bacteria - LAB). The homolactic metabolism leads to more than 90% conversion of sugars into lactate. Contrary to that, under certain conditions, it is lost and high amounts of formate (in an anaerobic environment), acetate and ethanol are produced in what is called mixed acid metabolism (4). Both metabolisms are depicted in Figure 4.1.1.

Common to all oligosaccharides and polysaccharides microbial synthesis, the HA production is a carbon-intensive and energy-intensive process (5). Precursors for the HA synthesis (UDP- glucuronic acid and UDP- N-acetylglucosamine) are also precursors for the cell wall biosynthesis, specifically peptidoglycan, teichoic acids and antigenic wall polysaccharides. Therefore, the HA synthesis competes with the cell growth for carbon source and energy (6, 7).

Bacteria may alter cell metabolism and hence the carbon flux direction in response to environmental fluctuations. Thence, the analysis of the metabolic changes has been a valuable tool in the understanding of how to manipulate the culture conditions of an organism, in order to

improve the production of interesting substances (8). Since the 90's, a myriad of metabolic studies have focused on the effects of the nutrition and culture conditions upon the HA production by *Streptococcus zooepidemicus*, such as the carbon source, carbon-to-nitrogen ratio, initial glucose concentration (IGC), pH, agitation, aeration and temperature (7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19).

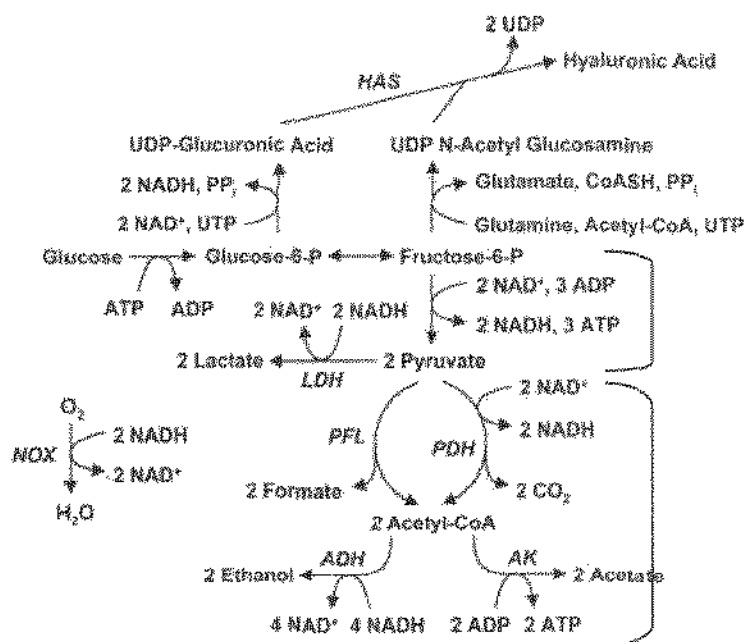


Figure 4.1.1 – Central metabolic pathways in *Streptococcus zooepidemicus* involved in the conversion of glucose to hyaluronic acid and fermentation products through the (a) homolactic and (b) mixed acid metabolisms. HAS, hyaluronate synthase; NOX, NADH oxidase; LDH, lactate dehydrogenase; PFL, pyruvate formate lyase; PDH, pyruvate dehydrogenase; ADH, alcohol dehydrogenase; AK, acetate kinase (Adapted from Chong and Nielsen, 2003b).

The only studies which focused upon the IGC effect on the HA production, were performed under controlled pH cultivations. Armstrong and Johns (14) investigated such effect on the HA molecular weight produced by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246; Chen *et al.* (15) the HA specific productivity by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. However, beyond the scarcity of studies on this topic, none of them examined the IGC effects either on the metabolite quantification or metabolism shifting.

Concerning the metabolic studies role on the improvement of the HA production, this work extended the previous findings by systematically studying the effects of IGC on the *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 cultivation under forced or natural aeration, at non-controlled pH. The metabolic effects were connected to the main metabolites involved in cell growth, HA production and average molecular weight.

2. MATERIALS AND METHODS

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

2.2. Culture Medium. The synthetic medium contained 60 g.L⁻¹ yeast extract and salts according to the composition reported by Swann *et al.* (16). The pH was adjusted to 7.5 prior to sterilization. A 20 % (w/v) glucose solution was autoclaved separately and added to obtain IGCs in the range of 0 and 90 g.L⁻¹.

2.3. Culture Maintenance and Inoculum Preparation. The stock culture was kept frozen in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 10% glycerol and glass beads at -20°C. The pre-inoculum was prepared by streaking the glass beads onto BHI agar plates supplemented with 5% sheep blood (Biotério Boa Vista, São Paulo, Brazil) and incubating at 37°C during 24 hours. Colonies were then transferred into the culture medium. For the cultivation in shake flasks 5 mL of inoculum was prepared at 37°C during 12 hours. For the bioreactor the inoculum was prepared with a series of transfers into the volumes of 25 and 250 mL of the same culture medium, both incubated at 37°C in a reciprocal shaker under 150 rpm during 12 and 6 hours, respectively.

2.4. Cultivations

2.4.1. Cultivation under natural aeration. All batch cultures were performed in 125 mL Erlenmeyer flasks with a working volume of 50 mL. The media were inoculated with 10% v/v. The flasks were incubated at 37°C, under 150 rpm for 24 hours. The evaluated IGCs were 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 g.L⁻¹. The cell mass, HA, glucose, lactate, acetate, formate and ethanol concentrations were determined for each flask at the initial and final times. The HA average molecular weight produced at the end of the cultivation was also determined.

2.4.2. Cultivation under forced aeration. All batch cultures were performed using a 3 L BioFlo III fermentation system (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ., USA) with an operating volume of 2.5 L, during 24 hours. The media were inoculated with 10% v/v. The agitation rate and temperature adopted were 250 rpm and 37°C, respectively. The bioreactor was sparged with a continuous air supply (2 vvm) and the culture pH was not controlled during cultivation. The evaluated IGCs were 0, 5, 25, 45, 90 g.L⁻¹. Samples were withdrawn at intervals not longer than 2 hours and their cell mass, HA, glucose, lactate, acetate, formate and ethanol concentrations were determined. The kinetic of HA average molecular weight was also determined.

2.5. Analytical Methods

2.5.1. Cell growth. Cell growth was determined by the cell dry weight according to the gravimetric method.

2.5.2. Concentrations of glucose, lactate, acetate, formate and ethanol. Culture samples were filtered through membranes with a pore size of 0.2 µm (Sartorius, Goettingen, Germany) and 20 µL of filtered sample were injected into an ion exchange HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a 7.8 mm × 300 mm HPX-87H fast acid column Aminex (Bio-Rad,

Hercules, CA., USA). The mobile phase was composed of 0.004 mol.L⁻¹ H₂SO₄ pumped at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹ as described by Chong and Nielsen (13). The column was maintained at 65°C. The peak elution profile was monitored with a Shimadzu RID-6A refractive index detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.5.3. HA concentration. Initially the culture broth was centrifuged at 3200 rpm during 20 minutes. The cell-free broth was treated with ethanol in a proportion 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down, remaining at 4°C during 1 hour for the precipitation of HA. The precipitated HA was redissolved in a 0.15 mol.L⁻¹ NaCl solution. Three precipitation and redissolution steps were performed to increase the yield of HA precipitated. Its concentration was measured by the carbazole method (20).

2.5.4. HA molecular weight. The HA average molecular weight was determined by size exclusion chromatography, using a Shimadzu chromatography system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), containing a 7.8 mm × 35 mm Polysep-GFC-P column guard (Phenomenex, Torrance, CA., USA) mounted in series with a 7.8 mm × 300 mm Polysep-GFC-P6000 column of the gel filtration (Phenomenex, Torrance, CA., USA) and a refraction index detector. The analysis conditions were: injected sample of 20 µL, 0.1 mol.L⁻¹ sodium nitrate as the mobile phase, 1.0 mL.min⁻¹ flow rate and 25°C temperature, as suggested by the column manufacturer. Dextran (American Polymer Standards, Mentor, Ohio, USA) with molecular weight ranging from 10³ to 10⁶ Da was used as a standard for the calibration curve as described by Balke *et al.* (21).

3. RESULTS AND DISCUSSION

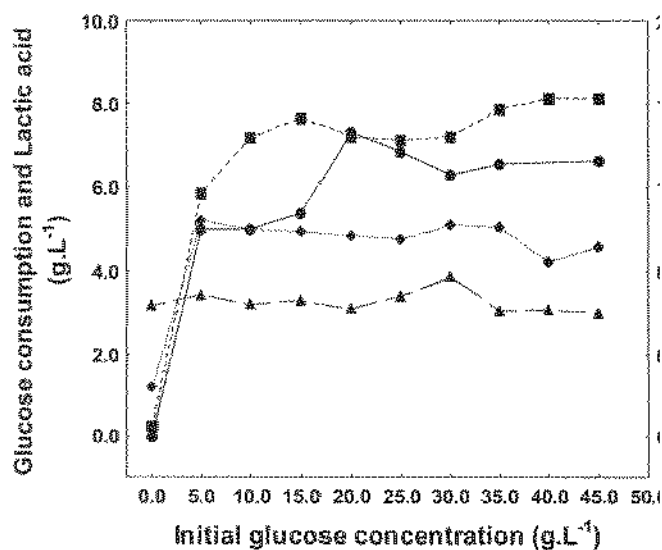
3.1. The initial glucose concentration (IGC) effects on the cultivation under natural aeration

The IGC effects on the metabolism of *Streptococcus zooepidemicus* cultured under natural aeration in shake flasks are presented in the Figure 4.1.2. It can be observed that the cell growth was independent of the IGC, even in the absence of glucose (0 g.L^{-1} glucose). These results are in accordance with the typical behavior for LAB whose biosynthesis needs are provided by the complex nitrogen source (6, 17). Furthermore, the vast majority of the glucose is recovered in the fermentation products, according for the low concentration of the lactate (0.25 g.L^{-1}) obtained in the cultivation in the absence of glucose (Figure 4.1.2a). As a consequence of that, a higher production of the acetate (1.08 g.L^{-1}) and ethanol (0.20 g.L^{-1}) was observed in the absence of glucose as illustrated in the Figure 4.1.2b.

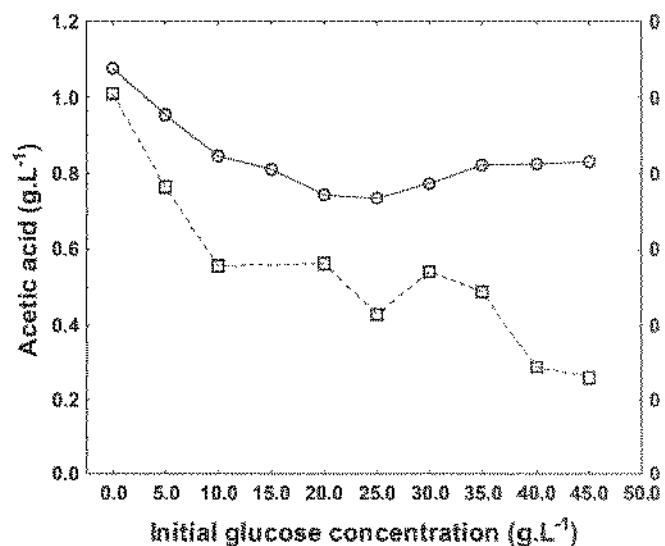
Under glucose limitations, the results indicated the redirection of the carbon flux. LAB shift from a homolactic to a mixed acid metabolism in order to make up for the decline of the cell energy (ATP) production (4). Consequence upon that, one additional mole of ATP is generated per mole of glucose, when the pyruvate is converted into acetate instead of lactate as shown in the Figure 4.1.1.

When the IGC increases in the medium, there is a substantial increment of the lactate parallel to a reduction of the acetate and ethanol concentrations. This behavior demonstrates the change to the homofermentative metabolism, which is the most ordinary route for the glucose catabolism in non-limiting conditions (22).

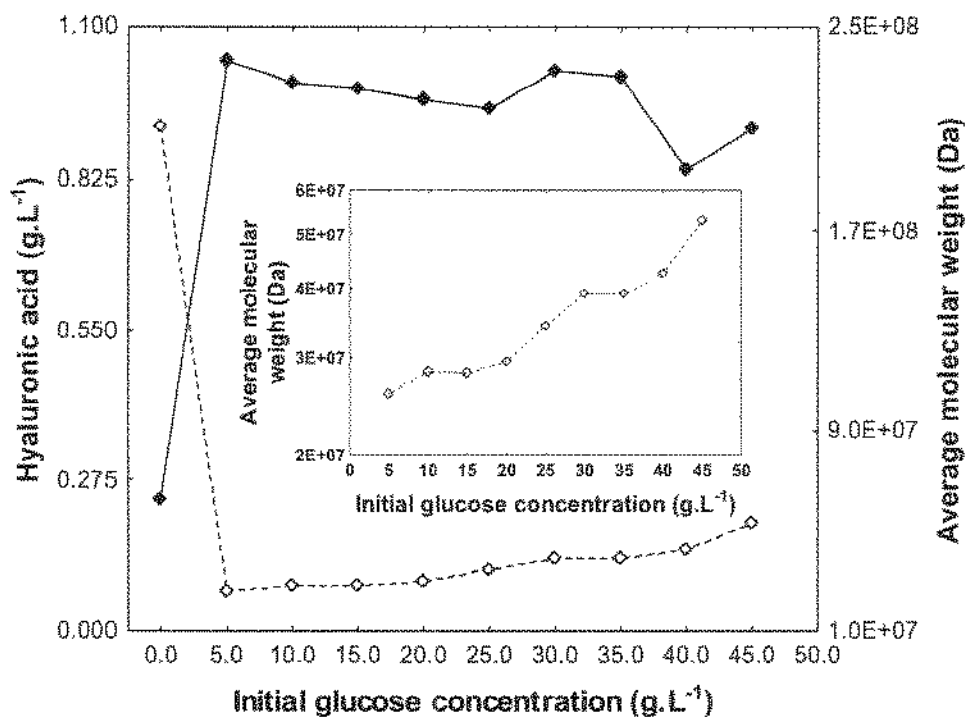
It was not observed any formate production in the range of glucose concentration used in the cultivations since the pyruvate formate lyase, involved in the production of the formate, is inactivated whenever the exposure of the cells to air occurs (23).



(a)



(b)



(c)

Figure 4.1.2 – Effects of the initial glucose concentration on the cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in shake flasks during 24 hours: (a) (●) glucose consumption; (■) lactate; (♦) hyaluronic acid; (▲) cell growth; (b) (○) acetate; (□) ethanol; (c) (♦) hyaluronic acid; (◇) hyaluronic acid average molecular weight.

The low HA production (0.24 g.L^{-1}) in the absence of glucose is due to the activated monomers' insufficient concentration for the hyaluronate synthase (13). Those monomers are produced from the intermediates glucose-6-P e fructose-6-P (Figure 4.1.1). The HA concentration increased four times compared to the HA concentration in the absence of glucose, when the IGC reached 5 g.L^{-1} . However, under the shake flasks limiting aeration, the HA concentration remained constant in others studied IGCs (Figure 4.1.2a).

The IGC also affected the HA average molecular weight as presented in the Figure 4.1.2c. The highest average molecular weight ($2.11 \times 10^8 \text{ Da}$) was obtained in the absence of glucose, nevertheless the lowest concentration of HA (0.28 g.L^{-1}). The presence of glucose caused an increase in the HA average molecular weight when the IGC ranged from 5 to 45 g.L^{-1} .

3.2. The initial glucose concentration (IGC) effects on the cultivation under forced aeration

Table 4.1.1 shows the IGC effects on the cells ($Y_{X/S}$) and HA ($Y_{HA/S}$) yield coefficients, both related to glucose, as well as the specific growth rate (μ_X) and volumetric productivity of HA. The μ_X was somehow constant (0.28 to 0.34 h^{-1}), except for the 5 g.L^{-1} IGC (0.41 h^{-1}). This is consequent of the faster exponential phase, 4 hours, compared to the other IGCs, in which the exponential phase remained between 8 and 12 hours.

Table 4.1.1 – Effects of the initial glucose concentration (IGC) on the specific growth rate and the yield coefficients related to glucose obtained in the cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* under forced aeration during 24 hours.

IGC (g.L^{-1})	μ_X	R^2	$Y_{HA/S}$	R^2	$Y_{X/S}$	R^2
0	0.32	0.9894	NC	NC	NC	NC
5	0.41	0.9985	0.06	0.9757	0.14	0.9916
25	0.34	0.9912	0.18	0.8441	0.11	0.9012
45	0.31	0.9967	0.09	0.7129	0.20	0.9655
90	0.28	0.8470	0.02	0.9543	0.10	0.9514

μ_X – specific growth rate (h^{-1}); $Y_{HA/S}$ – HA yield from glucose (g.g^{-1}); $Y_{X/S}$ – cell yield from glucose (g.g^{-1}); NC) - not calculated.

Among the considered IGCs, only at 25 g.L⁻¹ there was a higher glucose conversion into HA than into cells, as observed in the yield coefficient values ($Y_{HA/S}$, $Y_{X/S}$) in Table 4.1.1. This result, which has no precedent in the literature, indicates an inversion of the carbon source direction to the HA synthesis at the expense of cell growth in acidifying cultivation. A similar inversion was observed when *Streptococcus zooepidemicus* WSH-24 was grown under the intermittent alkaline-stress (pH 8.5) strategy at carbon-to-nitrogen ratio (C/N) of 2.8 (7). By correlating these effects, it may be suggested a relationship between the C/N ratio and pH extremes related to neutral pH 7.0, which deserves to be approached in depth. This behavior may be in consequence of the microorganism exposition to stress conditions, in which the cells produce an HA capsule as a way to shield from the acid or alkaline medium pH. This protection strategy has been described for group A streptococci as a protective shield to oxygen (24). In the other IGCs, the carbon source was preferentially converted into cell mass instead of HA.

The effect of medium C/N ratios at constant pH 7.0 influenced the HA specific productivity. However the changes were more attributed to the cell yield than to the HA yield (15). In this work, in non-controlled pH cultivations, it was observed that the changes occurred in both yields. For this reason, the pH control could also be related to the observed inversion of the carbon source direction.

The IGC effects on the HA volumetric and specific productivities and the HA average molecular weight are presented in Figure 4.1.3. The highest volumetric productivity of HA happened for the 25 g.L⁻¹ IGC (0.06 g.L⁻¹.h⁻¹) which is in accordance with the observed behavior of the yield coefficients (Table 4.1.1). The average molecular weight increased until 45 g.L⁻¹ IGC but it was reduced at 90 g.L⁻¹ IGC.

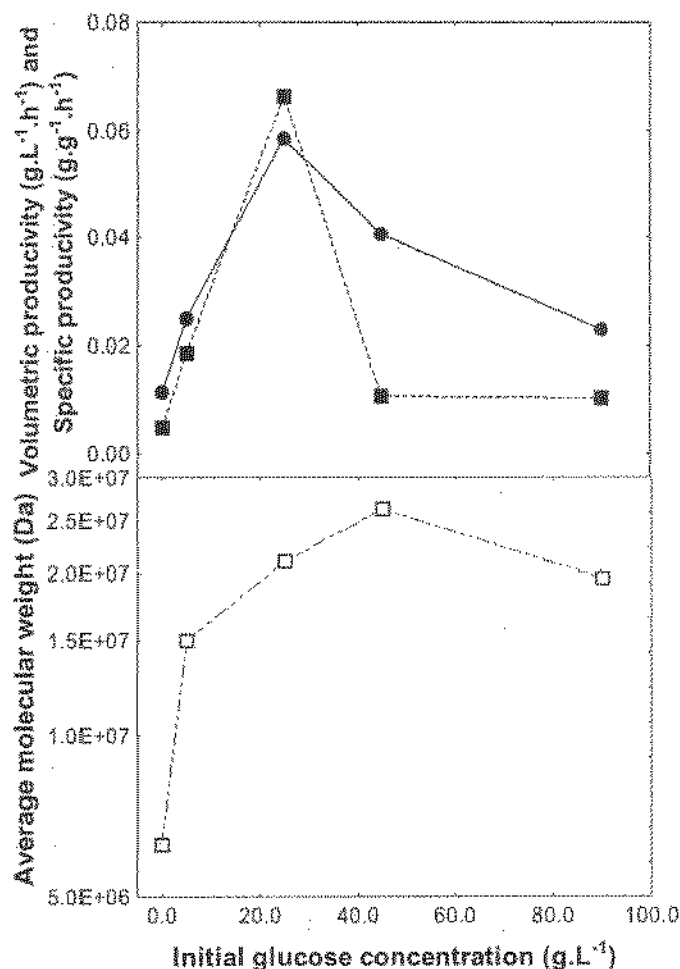


Figure 4.1.3 – Effects of the initial glucose concentration on (a) the hyaluronic acid volumetric (●) and specific (■) productivities and on (b) the hyaluronic acid average molecular weight (□) produced at the end of the cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* under forced aeration.

A comparison of the HA average molecular weight obtained at various IGCs in cultivations under natural and forced aeration is shown in the Table 4.1.2. At the same IGC, the HA average molecular weight was reduced when the cultivation was performed under forced aeration. These results may be associated with the polymer chains degradation along cultivation, imparted by the shear from the agitation and forced aeration.

Table 4.1.2 – HA average molecular weight at various initial glucose concentrations (IGC), obtained at the end of the cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* under natural and forced aeration.

IGC (g.L ⁻¹)	Average molecular weight (Da)	
	Natural aeration	Forced aeration
0	2.11×10^8	6.25×10^6
5	2.58×10^7	1.50×10^7
25	3.42×10^7	2.09×10^7
45	5.30×10^7	2.62×10^7

Effects of the IGCs on the organic acids concentrations as a consequence of the metabolic changes are presented in the Figure 4.1.4. The lactate, which is the main product of the homofermentative metabolism, was produced in all cultivations. Nevertheless, the mixed acid metabolism observed in the absence of glucose yielded the lowest levels of lactate, which was consumed by the cells as a carbon source after 12 hours of cultivation (Figure 4.1.4a). The kinetic of acetate production (Figure 4.1.4b) followed the cell growth kinetic ranging from IGC5 to 45 g.L⁻¹ IGC, reaching concentrations between 1.3 and 1.5 g.L⁻¹. In the absence of glucose, the metabolism from pyruvate shifted to acetate to compensate the reduction of the ATP production as mentioned above (Figure 4.1.1).

Formate was produced at low concentrations at the IGCs of 0 and 5g.L⁻¹ glucose, even though in both cases it was consumed by the cells due to either the absence or the total consumption of glucose at 5 g.L⁻¹ IGC (Figure 4.1.4c). The formate production, even under forced aeration, can be associated to anoxic conditions encountered for some cells given the greater cell aggregation in the presence of HA (13). Such aggregation avoids the pyruvate formate lyase inhibition under the excess of oxygen. The formate was not produced at the other IGCs.

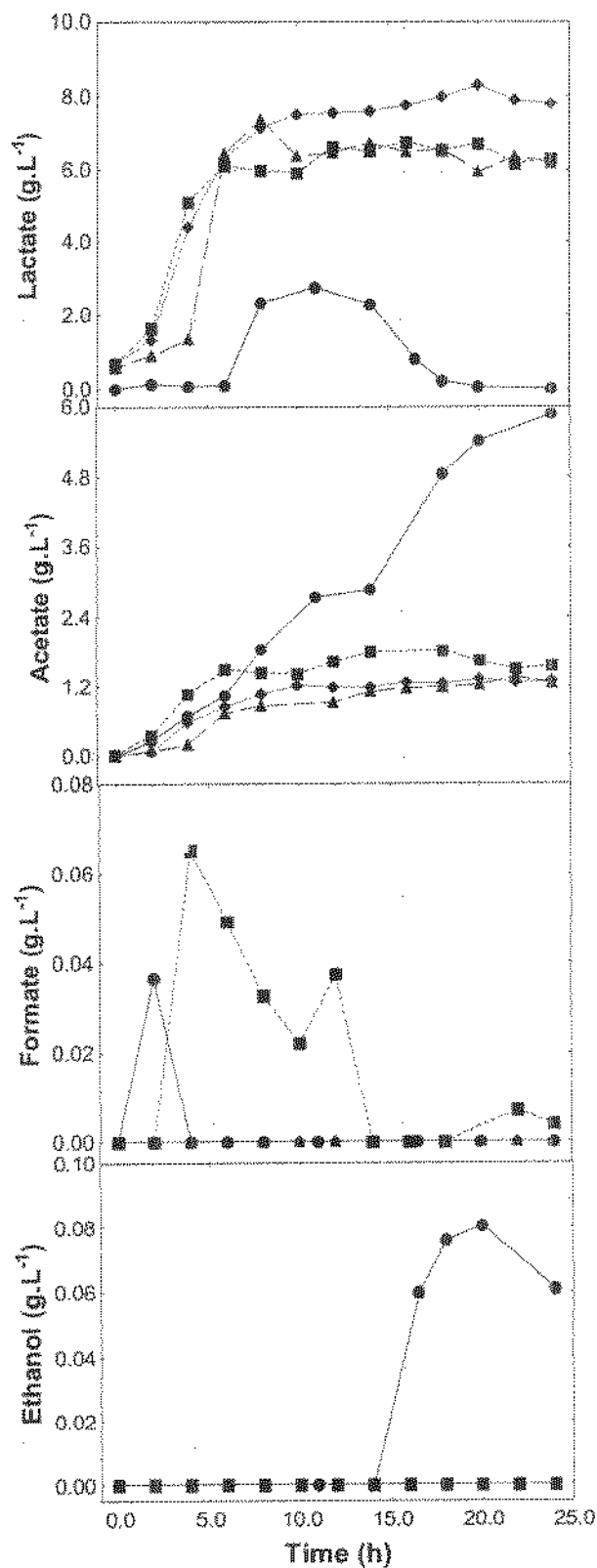


Figure 4.1.4 – Production of (a) lactate, (b) acetate, (c) formate and (d) ethanol, in the cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* under forced aeration at the initial glucose concentrations: (●) 0 g.L⁻¹; (■) 5 g.L⁻¹; (◆) 25 g.L⁻¹; (▲) 45 g.L⁻¹.

The ethanol production was observed in the absence of glucose only. It was produced after 14 hours, at the same time the lactate was consumed by the cells (Figure 4.1.4d). Hence, the ethanol production may be associated to the lactate catabolism.

Considering the above mentioned reasons, a metabolic flux analysis will contribute to a better understanding of the metabolic changes on the cell metabolism and their influences on the production of HA.

4. CONCLUSIONS

The three main effects of IGC on the *Streptococcus zooepidemicus* metabolism may be described. Firstly, the metabolic changes between the mixed acid and homolactic metabolisms. The former was observed only in the absence of glucose, independent of the oxygen supply. The presence of glucose induced the homofermentative metabolism in which the HA production and cell growth were dependent on the IGC under non-limiting oxygen supplying conditions only. Secondly, a higher HA production and productivity were observed in the cultivation at 25 g.L⁻¹ IGC, which was the only condition where the inversion of the carbon source direction to HA occurred. And last but not least, the HA molecular weight increased along with the IGC within the studied range.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge CNPq and FAPESP for the financial support, Investiga Group (Campinas, São Paulo, Brazil) for the maintenance of the bacteria culture, Laboratory of Bioseparations (University of Campinas, Campinas-SP, Brazil) for the availability of HPLC system, and Angela Klatil Ribeiro for the language review.

REFERENCES

1. Weissman, B. and Meyer, K. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* 76, 1753-1757.
2. Kogan, G., Soltes, L., Stern, R. and Gemeiner, P. (2007) *Biotechnol. Lett.* 29, 17-25.
3. Wessels, M.R., Moses, A., Goldberg, J.B. and Dicesare, T.J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 8317-8321.
4. Garrigues, C., Mercade, M., Cocaign-Bousquet, M., Lindley, N.D. and Loubiere, P. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 74 (2), 108-115.
5. Ruffing, A. and Chen, R.R. (2006) *Microb. Cell Fact.* 5, 25-33.
6. Chong, B.F., Blank, L.M., McLaughlin, R. and Nielsen, L.K. (2005) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 341-351.
7. Liu, L., Wang, M., Du, G. and Chen, J. (2008) *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 383-388.
8. Gombert, A.K. and Nielsen, J. (2000) *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 180-186.
9. Duang, X.J., Yang, L., Zhang, X. and Tan, W.S. (2008) *J. Microbiol. Biotechnol.* 18 (4), 718-724.
10. Huang, W.C., Chen, S.J. and Chen, T.L. (2006) *Biochem. Eng. J.* 32, 239-243.
11. Liu, L., Du, G., Chen, J., Wang, M. and Sun, J. (2008) *Bioresour. Technol.* 110, 923-926.
12. Gao, H.J., Du, G.C. and Chen, J. (2006) *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (4), 399-408.
13. Chong, B.F. and Nielsen, L.K. (2003) *Biochem. Eng. J.* 16, 153-162.
14. Armstrong, D.C. and Johns, M.R. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (7), 2759-2764.
15. Chen, S.J., Chen, J.L., Huang, W.C., Chen, H.L. (2009) *Korean J. Chem. Eng.* 26 (2), 428-432.
16. Swann, D.A., Sullivan, B.P., Jamieson, G., Richardson, K.R. and Singh, T. (1990) United States Patent: 4,897,349.

17. Armstrong, D.C., Cooney, M.J., Johns, M.R. (1997) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 309–312.
18. Cooney, M.J., Goh, L.-T., Lee, P. L., Johns, M. R. (1999) *Biotechnol. Prog.* 15, 898-910.
19. Johns, M.R., Goh, L.T., Oeggerli, A. (1994) *Biotechnol. Letters*. 16 (5), 507-512.
20. Dische, Z. (1946) *J. Biol. Chem.* 167, 189-198.
21. Balke, S., Hamielec, A., Leclkaier, B. and Pearce, S. (1969) *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 8 (1), 54-57.
22. Thomas, T.D., Ellwood, D.C. and Longyear, M.C. (1979) *J. Bacteriol.* 138 (1), 109-117.
23. Abbe, K., Takahashi, S. and Yamada, T. (1982) *J. Bacteriol.* 152 (1), 175-182.
24. Cleary, P.P., Larkin, A. (1979) *J. Bacteriol.* 140 (3), 1090-1097.

4.2. EFEITOS DO CONTROLE DO pH DO MEIO DE CULTURA NO METABOLISMO CELULAR E MASSA MOLAR DO ÁCIDO HIALURÔNICO PRODUZIDO

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY”

**METABOLIC CHANGES, HYALURONIC ACID PRODUCTION AND MOLECULAR WEIGHT IN
THE *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* ATCC 39920 CULTIVATION PROMOTED BY THE
pH CONTROL**

Aline Mara B. Pires and Maria Helena Andrade Santana*

Laboratory of Development of Biotechnological Processes
School of Chemical Engineering, P.O.Box 6066
University of Campinas-UNICAMP
13083-970, Campinas-SP, Brazil

ABSTRACT –The pH control effects on the cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 were studied, with focus on the microbial metabolism changes, the production and the molecular weight of hyaluronic acid (HA). The cultivations were performed in a 3 L bioreactor, with the maintenance of constant pH (7.0) as well as without the constant pH maintenance (acidifying condition). Not only did the pH control along cultivation result in higher cell productivity ($0.21 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), but also in the HA productivity ($0.10 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), with total consumption of glucose as a carbon source. However, in the acidifying cultivation an inversion of the carbon source direction to the HA synthesis at the expenses of cell growth was observed. Among the metabolic changes, the pH control allowed for higher lactate and acetate concentrations plus formate and ethanol production, metabolites which were not quantified in the cultivation performed under acidifying conditions. Although the above mentioned benefits, the HA average molecular weight produced at constant pH ($4.0 \times 10^6 \text{ Da}$) was lower than the HA produced under acidifying conditions ($2.1 \times 10^7 \text{ Da}$).

Key-words: hyaluronic acid, pH, metabolites, *Streptococcus zooepidemicus*

* Correspondent author. Phone: +55 19 3521 3921; Fax: +55 19 3521 3890
Electronic address: mariahelena.santana@gmail.com

1. INTRODUCTION

Hyaluronan (HA) is a ubiquitous connective tissue glycosaminoglycan which *in vivo* is present as a high molecular weight component of most extracellular matrices. The HA is comprised of repeating disaccharide units of D-glucuronic acid and N- acetylglucosamine linked alternately by β -1-3 and β -1-4 glycosidic linkages [1]. Presently, the importance of HA in the pharmaceutical and cosmetic fields is worldwide recognized, due to its unique physicochemical and biological properties [2, 3]. The microbial source HA presents properties with a better controlled quality, requires a smaller investment concerning its recovery and purification as well as it prevents from viral contamination opposed to the animal tissues extracted HA such as the rooster combs [4]. Moreover, microbial production allows for the optimization of the product yield, quality promoted through genetic engineering and the control of the culture conditions [5].

Streptococci have been the most used genus of bacteria in the microbial production of HA. These bacteria are aerotolerant anaerobes which grow well in both aerobic and anaerobic cultures. HA is a capsular biopolymer shedding to the medium, and the HA unreleased amount of capsule is relatively insignificant. As all lactic bacteria, its cultivation is characterized by the generation of organic acids, which create an unfavorable environment for its growth and cell viability. Benefits from the pH control on the production of exopolysaccharides by lactic bacteria have been extensively reported in the literature [6, 7, 8, 9], being its influence on this kind of cultivation considered more important than the nutrient supplementation in the cultivation media [10]. Except for some species of the *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Oenococcus* genus, the lactic bacteria are neutrophiles, i.e., optimum pH for growth in the range of 5 to 9 [11].

Although the numerous benefits from pH control on lactic bacteria, it is on the utilized strain that specific effects on the production and on the molecular weight of exopolysaccharides

depend [12]. Previous studies evaluated the pH influence on the HA production and molecular weight from different strains of *Streptococcus zooepidemicus*, such as ATCC 6580 [13], ATCC 35426 [14, 15], CKD 117 [16]. In general, better cell growth and HA production were obtained at pH close to 7.0 and no significant differences in the HA molecular weight were verified at pH 6.0, 7.0 or 8.0. Definition of operational conditions, such as the pH control for HA production is necessary for an economical fermentation process, as well as it contributes to the understanding of the complex HA formation mechanism from streptococci cultivation.

Even with important contributions from various previous studies, there is still little information available regarding the effects of pH and its control along cultivations in the metabolic changes. Additionally, although the various reports on the *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, which has also been used in our studies, there are no specific studies involving the pH effect on its cultivation. This is a mutant strain pointed out for the production of large amounts of high molecular weight HA [17].

Following to the previous findings, this study explored the effects of the neutral pH control on the metabolic changes along the *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 cultivation, HA production and molecular weight.

2. MATERIALS AND METHODS

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

2.2. Culture Medium. The synthetic medium was composed of 60 g.L⁻¹ yeast extract, 25 g.L⁻¹ glucose, and salts according to the composition reported by Swann *et al.* [18]. The medium pH was adjusted to 7.5 prior to sterilization and the glucose solution was autoclaved separately.

2.3. Culture Maintenance and Inoculum Preparation. The stock culture was kept frozen in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 10% glycerol and glass beads at -20°C. The pre-inoculum was prepared by streaking the glass beads onto BHI agar plates supplemented with 5% sheep blood (Biotério Boa Vista, São Paulo, Brazil) and incubating at 37°C during 24 hours. Colonies were then transferred into 25 mL of culture medium and grown on a rotatory shaker at 150 rpm, 37°C for 12 hours. Next, the inoculum was transferred into 250 mL of culture medium which was incubated under the same above mentioned conditions during 6 hours.

2.4. Cultivations. A 250 mL volume of inoculum, prepared as described in 2.3 item, was transferred to 3 L BioFlo III fermentation system (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ., USA) with an operating volume of 2.5 L. The agitation rate and temperature adopted were 250 rpm and 37°C, respectively. The bioreactor was sparged with a continuous air supply (2 vvm). The cultivations were carried out at non-controlled pH (acidifying cultivation) and pH controlled at 7.0. The pH control was performed through the feeding of sterile solution 5 mol.L⁻¹ NaOH along cultivation. Samples were withdrawn along 24 hours and their cell mass, HA, glucose, lactate, acetate, formate and ethanol concentrations were determined. The kinetic of HA average molecular weight was also determined.

2.5. Analytical Methods

2.5.1. Cell growth. Cell growth was determined by the cell dry weigh according to the gravimetric method.

2.5.2. Concentrations of glucose, lactate, acetate, formate and ethanol. Culture samples were filtered through membranes with a pore size of 0.2 µm (Sartorius, Goettingen, Germany) and 20 µL of filtered sample were injected into an ion exchange HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a 7.8 mm x 300 mm HPX-87H fast acid column Aminex (Bio-Rad,

Hercules, CA., USA). The mobile phase was composed of 0.004 mol.L⁻¹ H₂SO₄ pumped at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹ as described by Chong and Nielsen [19]. The column was maintained at 65°C. The peak elution profile was monitored with a Shimadzu RID-6A refractive index detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.5.3. HA concentration. Initially the culture broth was centrifuged at 3200 rpm during 20 minutes. The cell-free broth was treated with ethanol in a proportion 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down, remaining at 4°C during 1 hour for the precipitation of HA. The precipitated HA was redissolved in a 0.15 mol.L⁻¹ NaCl solution. Three precipitation and redissolution steps were performed to increase the yield of HA precipitated. Its concentration was measured by the carbazole method [20].

2.5.4. HA Molecular weight. The HA average molecular weight was determined by size exclusion chromatography, using a Shimadzu chromatography system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), containing a 7.8 mm x 35 mm Polysep-GFC-P column guard (Phenomenex, Torrance, CA., USA) mounted in series with a 7.8 mm x 300 mm Polysep-GFC-P6000 column of the gel filtration (Phenomenex, Torrance, CA., USA) and a refraction index detector. The analysis conditions were: injected sample of 20 µL, 0.1 mol.L⁻¹ sodium nitrate as the mobile phase, 1.0 mL.min⁻¹ flow rate and 25°C temperature, as suggested by the column manufacturer. Dextran (American Polymer Standards, Mentor, Ohio, USA) with molecular weight ranging from 10³ to 10⁶ Da was used as a standard for the calibration curve as described by Balke *et al.* [21].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Metabolic changes and HA production

The behavior of the non-controlled and pH controlled cultivations is shown in Figures 4.2.1 and 4.2.2, through its kinetic profiles along 24 hours cultivations. Tables 4.2.1 and 4.2.2 summarize the calculated kinetic parameters.

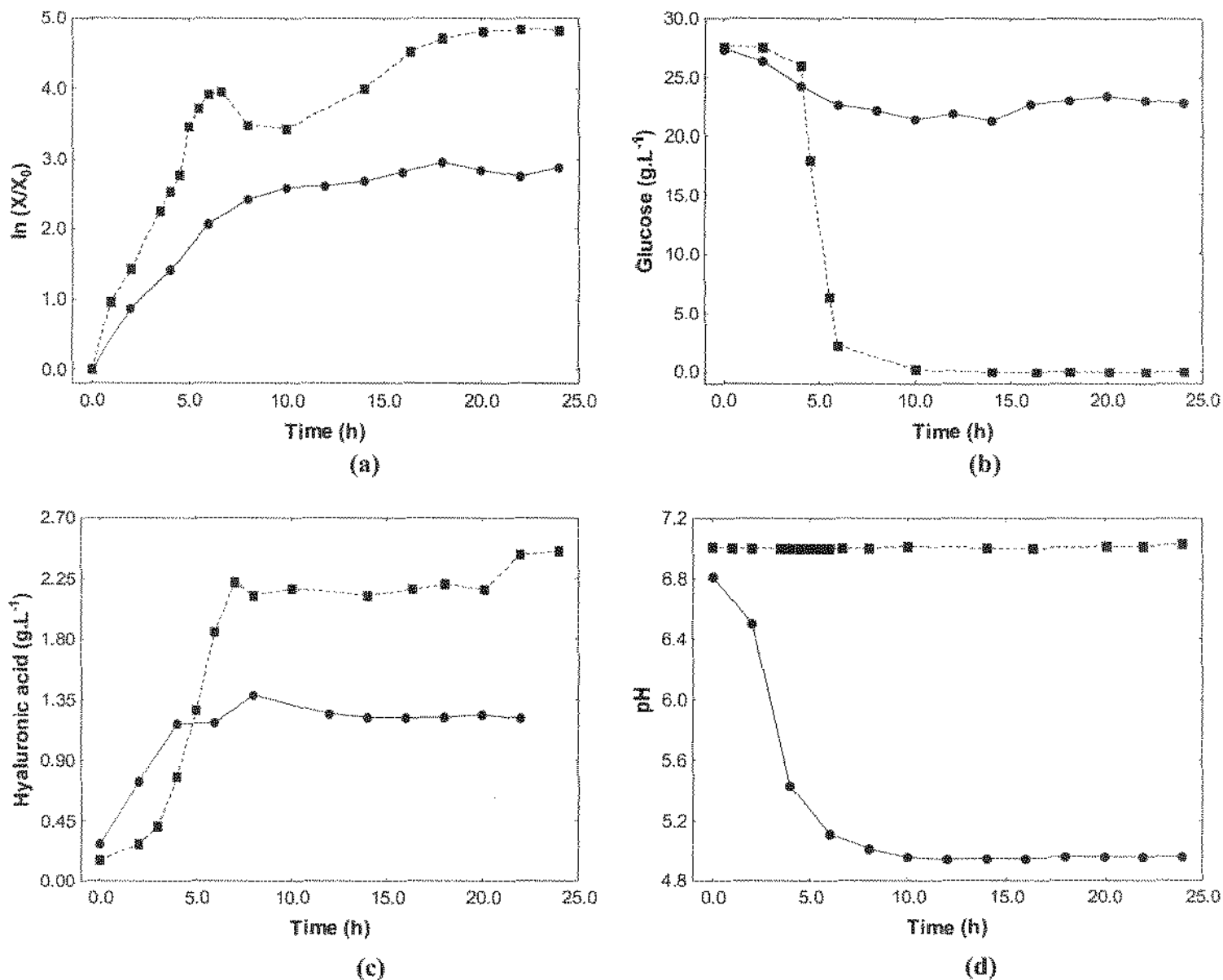


Figure 4.2.1 – Kinetic profiles of (a) cell growth, (b) glucose concentration, (c) HA concentration and (d) pH along cultivations using *Streptococcus zooepidemicus* under (●) non-controlled pH and (■) controlled pH at 7.0.

The results show, in both cases, the exponential phase along the first 6h (Figure 4.2.1a). At this time, the pH was drastically reduced to approximately 5.0, for non-controlled pH cultivation (Figure 4.2.1d), as expected for the cultivation of a lactic bacterium. The glucose was totally consumed in the pH controlled cultivation only (Figure 4.2.1b), and the HA production was about twice higher for the controlled pH cultivation (Figure 4.2.1c).

Table 4.2.1 – Effects of the pH control on the specific velocity of growth, yield coefficients and productivities obtained during the batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*.

Parameters	Non-controlled pH		Controlled pH (7.0)	
	Value	R ²	Value	R ²
μ_X (h ⁻¹)	0.34	0.9912	0.59	0.9867
$Y_{X/S}$ (g cells.g glucose ⁻¹)	0.11	0.9541	0.07	0.9634
$Y_{HA/S}$ (g HA.g glucose ⁻¹)	0.18	0.8441	0.05	0.9764
P_P (g HA.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0.06	-	0.10	-
P_X (g cells.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0.04	-	0.21	-

μ_X : specific growth rate; $Y_{HA/S}$: HA yield from glucose; $Y_{X/S}$: HA yield from glucose; P_P : HA productivity; P_X : cell productivity.

From the calculated parameters in Table 4.2.1, it may be observed that although the cell ($Y_{X/S}$) and HA ($Y_{HA/S}$) yields were higher in the non-controlled cultivation, the productivities (P_X and P_P) were higher at controlled pH due to higher glucose consumption. Furthermore, the pH control duplicated the specific growth rate (μ_X) for pH controlled cultivation, compared to the acidifying conditions.

The lactic bacteria sensitivity to low pH was reported by Nannen and Hutkins [22]. They observed for different strains of streptococci, a critical pH of around 5.0, defined as the pH at which the cell growth is stopped and the cell viability decreased, concomitant with the transmembrane pH gradient decrease. Our results also suggest a critical pH for the *Streptococcus zooepidemicus*, observed when the pH was lesser than 5.0 after 10 hours, in acidifying

cultivation, despite the high remaining glucose concentration (approximately 21.4 g.L⁻¹). In this case, the cell growth interruption is apparently due to the dissipation of the transmembrane pH gradient (ΔpH) instead of the starvation for glucose in the medium, as occurred in the pH controlled cultivation. After 10 hours a tendency for the diauxic behavior, described by Armstrong and Johns [14], was also observed in the pH controlled cultivation.

The higher HA production at controlled pH may also be related to the hyaluronan synthase (HAS) activity. Tlapak-Simmons *et al.* [23] found an effective pH range of activity between 6.6 and 11.5 for HAS from *Streptococcus equisimilis*. Additionally, HAS lost stability at acidic pH 5.0.

The higher glucose conversion to HA ($Y_{HA/S}$) than to cells ($Y_{X/S}$) was observed in non-controlled pH cultivation (Table 4.2.1) which suggests an inversion of the carbon source direction to the HA synthesis at the expense of cell growth. A similar inversion was observed when *Streptococcus zooepidemicus* WSH-24 was grown under the intermittent alkaline-stress condition [24]. Therefore this inversion may be related to the microorganism exposition to a pH stress condition, when the cells produce an HA capsule as a way to shield from the acid or alkaline medium pH. Cleary and Larkin [25] described a protective HA shield from oxygen for group A streptococci. By correlating these effects, a relationship may be suggested between the HA production and pH extremes related to neutral pH 7.0, which deserves to be approached in depth.

The pH control also produced metabolic changes as shown at the Figure 4.2.2 and Table 4.2.2. In both conditions, the lactate was the main metabolite produced, as expected. The acetate was also produced in both cultivations, although at controlled pH its production occurred along cultivation, even after the glucose exhaustion.

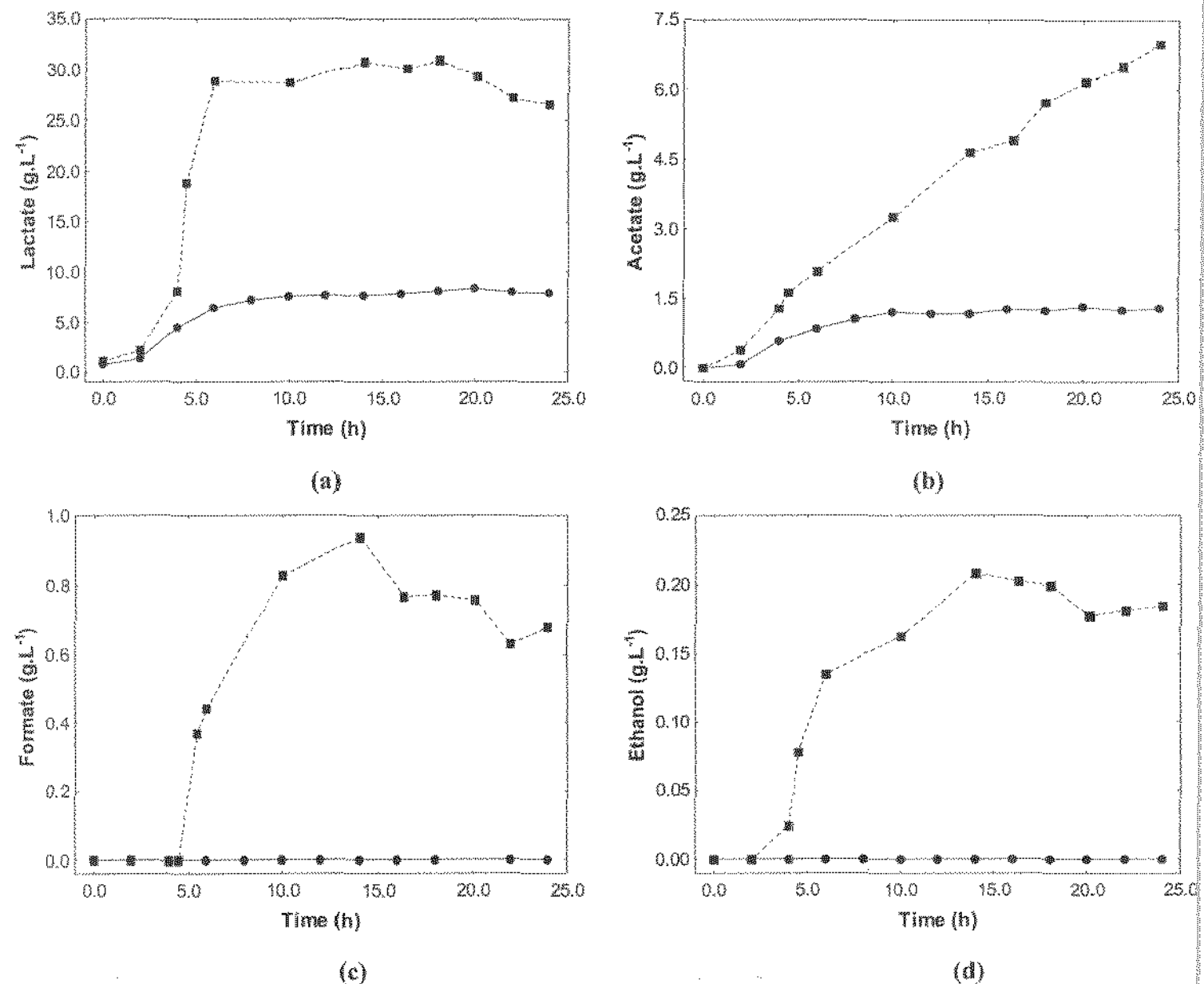


Figure 4.2.2 – Kinetic profiles of (a) lactate, (b) acetate, (c) formate and (d) ethanol along batch culture of *Streptococcus zooepidemicus* under (●) non-controlled pH and (■) controlled pH at 7.0.

Formate and ethanol were produced in small amounts at controlled pH only (Figure 2). Despite the pyruvate formate lyase sensitivity to oxygen, the formate production in aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* can be explained by the aggregation imparted by the presence of HA in medium as described by Chong and Nielsen [19]. All of these effects are

consequent upon the activity of the involved enzymes, for which the neutral or alkaline conditions are beneficial, as reported by Moat *et al.* [26]. Platt and Foster [27] pointed out the metabolic changes related to the pyruvate metabolism in response to the intracellular pH. Harvey [28] demonstrated the glycolytic activity reduction for streptococci, and the specific activities of hexokinase and acetate kinase at pH lesser than 5.0.

The yield parameters from Table 4.2.2 show that at constant neutral pH, 89.7 % of the carbon from glucose was recovered as metabolites, being 84.0% as lactate, 3.0 % as acetate, 2.0% as formate and 0.7 % as ethanol. In acidifying conditions, in addition to the carbon from glucose, the carbon from organic nitrogen source was probably also used, because the yields from glucose were higher than 1. Typical of lactic bacteria, in both cases, low levels of glucose carbon were recovered in cells [19].

Table 4.2.2 – Effects of the pH control on yield coefficients of the main metabolites produced during the batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*.

Parameters	Non-controlled pH		Controlled pH (7.0)	
	Value	R ²	Value	R ²
Y _{Lac/S} (g lactate.g glucose ⁻¹)	1.23	0.9908	0.84	0.9590
Y _{Ac/S} (g acetate.g glucose ⁻¹)	0.19	0.9844	0.03	0.9876
Y _{For/S} (g formate.g glucose ⁻¹)	0.00	-	0.03	0.9912
Y _{Eth/S} (g ethanol.g glucose ⁻¹)	0.00	-	0.00	0.9731

For fermentative bacteria as *Streptococcus zooepidemicus*, the production of lactate is important, considered the energetic point of view. The end-products efflux coupled to the proton translocation may spare ATP, since its hydrolysis, which is used in the pumping of protons to the extracellular medium, is diminished [29]. Hence, the ATP energetic equilibrium is a consequence of the metabolic changes promoted by the pH control in the medium, and may explain the higher HA production.

Concerning the above mentioned aspects, a metabolic flux analysis should be used as a tool for the better understanding of the relationship between metabolic changes on the cell metabolism and HA production.

3.2. HA average molecular weight and distribution

The evolution of the HA average molecular weight along cultivations carried out under controlled and non-controlled pH is presented in Figure 4.2.3. Although in both cases a high average molecular weight HA was produced, 10^7 and 10^6 Da, the HA average molecular weight decreased along cultivation. The decreasing was more severe in the neutral controlled pH cultivation. In the end of cultivations, the average molecular weights of HA were 2.1×10^7 and 4.0×10^6 Da for the non-controlled and controlled pH cultivations, respectively.

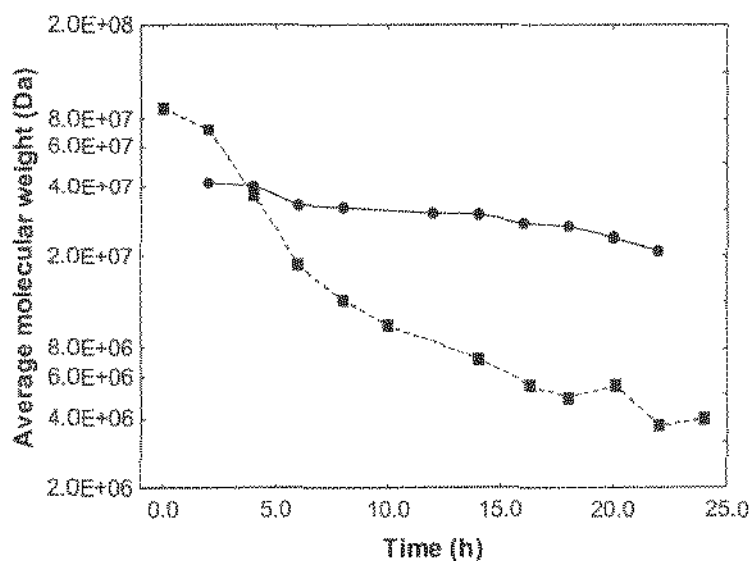


Figure 4.2.3 - Effect of pH control on the average molecular weight of HA produced under (●) non-controlled pH cultivation and (■) controlled pH 7.0 cultivation.

These results could be attributed to the higher susceptibility to shearing of the HA chains produced at controlled pH 7.0. According to Morris *et al.* [30], the acidifying conditions may contribute to a polymeric network more shearing resistant, given that intermolecular interactions are entropically favored by the electrostatic repulsions suppression. Moreover, the remaining glucose concentration in the non-controlled pH cultivation may help the strengthening of the HA network by the hydrogen bonds between HA and glucose molecules [31].

Although the transferase activity dependence on the pH and the mechanisms controlling chain length are not yet known, the pH may also influence the HA elongation through enzyme conformation changes, according to the pendulum hypothesis developed by Weigel [32].

Table 4.2.3 shows the HA molecular weight (MW) distribution from both cultivations. From the acidifying cultivation were observed two populations: the first with MW between 1.0×10^6 and 7.4×10^6 Da (24.5%) and the second with MW higher than 7.4×10^6 (75.5%), which was the highest MW within our standards. At controlled pH, an additional population in the range of 10^5 Da appeared in the distribution. The HA average MW of AH in the end of cultivations was 2.1×10^7 and 4.0×10^6 Da, for non-controlled and controlled pH cultivations.

Table 4.2.3 – Effect of pH on the HA molecular weight distribution.

pH	Molecular weight fraction (%)		
	MW around 10^5 Da	1×10^6 Da < MW < $7,4 \times 10^6$ Da	MW > $7,4 \times 10^6$ Da
Non-controlled	0.0	24.5	75.5
Controlled (7.0)	13.5	52.0	34.5

4. CONCLUSIONS

Various important features related to the neutral pH control, were found in the cultivations with *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. The control of neutral pH along cultivation increased both the cell and HA productions, with total consumption of glucose as a carbon source. The productivities were also increased compared to non-controlled pH cultivations. The carbon source inversion to the HA synthesis, at the expense of cell growth in the non-controlled pH cultivation, may indicate a defense mechanism from acid stress. Among the metabolic changes, there was a higher production of acetate besides the production of formate and ethanol in controlled pH. Under non-controlled pH conditions, formate and ethanol were not detected. And last but not least, the pH control benefited the production of HA with average molecular weight of 10^6 Da with three populations. Non-controlled pH conditions produced less HA yet with a higher average molecular weight of 10^7 Da within two populations only.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge CNPq (Brazil) for the financial support, Investiga Group (Campinas-SP, Brazil) for the maintenance of the bacteria culture, Laboratory of Bioseparations (University of Campinas, Campinas-SP, Brazil) for the availability of HPLC system, and Angela Klatil Ribeiro for the language review.

REFERENCES

- [1] Weissman B, Meyer K. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. J Am Chem Soc 1954; 76:1753-1757.
- [2] Garg, HG, Hales, CA. Chemistry and biology of hyaluronan. 1st ed. Oxford: Elsevier; 2004.
- [3] Kogan G, Soltes L, Stern R, Gemeiner P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnol Lett 2007; 29: 17-25.
- [4] O'Regan M, Martini I, Crescenzi F, De Luca C, Lansing M. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. Int J Biol Macromol 1994;16: 283-286.
- [5] Armstrong DC, Johns MR. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 2759–2764.
- [6] De Vuyst L, Vanderveken F, Van de Ven S, Degeest B. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. J Appl Microbiol 1998; 84: 1059–1068.
- [7] Grobben GJ, Chi-Joe I, Kitzen VA, Boels IC, Boer F, Sikkema J, Smith MR, De-Bont JAM. Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 1333–1337.
- [8] Gassem MA, Schmidt KA, Frank JF. Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J Food Sci 1997; 62: 171-173.
- [9] Mozzi F, Giori GS, Oliver G, Valdez GF. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. Biotechnol Lett 1996; 18: 435-439.
- [10] Degeest B, Vaningelgem F, De Vuyst L. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. Int Dairy J 2001; 11: 747–757.

- [11] van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002; 82: 187-216.
- [12] Gorret N, Maubois JL, Engasser JM, Ghoul M. Study of the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidipropionici* on Milk microfiltrate using a response surface methodology. *J Appl Microbiol* 2001; 90: 788-796.
- [13] Kim J, Yoo S, Oh D, Kweon Y, Park D, Lee C, Gil G. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme Microb Technol* 1996; 19: 440-445.
- [14] Armstrong DC, Johns MR. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 2759-2764.
- [15] Johns MR, Goh LT, Oeggerli A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biotechnol Lett* 1994; 16: 507-512.
- [16] Kim, SJ, Park, SY, Kim, CW. A novel approach to the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*. *J Microbiol Biotechnol* 2006; 16: 1849-1855.
- [17] Nimrod A, Greenmam B, Kanner D, Moshe B, Landsberg Y. Method of producing high molecular weight sodium hyalluronate by fermentation of *Streptococcus*. United State Patent: 4,780,414; 1988.
- [18] Swann DA, Sullivan BP, Jamieson G, Richardson KR, Singh T. Biosynthesis of hyaluronic acid. United States Patent: 4,897,349; 1990.
- [19] Chong BF, Nielsen LK. Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. *Biochem Eng J* 2003; 16: 153-162.

- [20] Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J Biol Chem* 1946; 167: 189-198.
- [21] Balke S, Hamielec A, Leckair B, Pearce S. Gel permeation chromatography. calibration curve from polydisperse standards. *Ind Eng Chem Prod Res Dev* 1969; 8: 54-57.
- [22] Nannen NL, Hutkins RW. Intracellular pH effects in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1991; 74: 741-746.
- [23] Tlapak-Simmons VL, Baron CA, Weigel PH. Characterization of the purified hyaluronan synthase from *Streptococcus equisimilis*. *Biochemistry* 2004; 43: 9234-9242.
- [24] Liu L, Wang M, Du G, Chen J. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Lett Appl Microbiol* 2008; 46: 383-388.
- [25] Cleary PP, Larkin A. Hyaluronic acid capsule: strategy for oxygen resistance in group A streptococci. *J Bacteriol* 1979; 140: 1090-1097.
- [26] Moat AG, Foster JW, Spector MP. *Microbial Physiology*. 4th ed. New York: John Wiley and Sons; 2002.
- [27] Platter, TB, Foster EM. Products of glucose metabolism by homofermentative streptococci under anaerobic conditions. *J Bacteriol* 1958; 75:453-459.
- [28] Harvey RJ. Damage to *Streptococcus lactis* resulting from growth at low pH. *J Bacteriol* 1965; 90: 1330-1336.
- [29] White D. *The physiology and biochemistry of prokaryotes*. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2000.
- [30] Morris ER, Rees DA, Welsh E.J. Conformation and dynamic interaction in hyaluronate solutions. *J Mol Biol* 1980; 138: 383-400.
- [31] Kobayashi Y, Okamoto A, Nishinari K. Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights. *Biorheol* 1994; 31: 235-244.

[32] Weigel PH. Bacterial hyaluronan synthases – an update. Science of hyaluronan today. # 6. 2004; Available at: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06a/HA06aE.html>>. Access: Aug. 07, 2009.

4.3. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS FLUXOS METABÓLICOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS ESTUDADAS

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO
“BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL”

METABOLIC FLUX ANALYSIS OF THE MICROBIAL PRODUCTION OF HYALURONIC ACID UNDER THE EFFECTS OF THE INITIAL GLUCOSE CONCENTRATION AND pH CONTROL

Aline M. B. Pires, Amaro G. Barreto Jr and Maria H. A. Santana*

Laboratory of Development of Biotechnological Processes
School of Chemical Engineering, P.O.Box 6066
University of Campinas-UNICAMP
13083-970, Campinas-SP, Brazil

ABSTRACT – A metabolic flux analysis of the hyaluronic acid (HA) production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 was carried out in order to investigate the effects of the initial glucose concentration (IGC) and pH on the cell metabolism. The fluxes through the metabolic reactions were estimated using the rates of glucose uptake biomass, HA, lactate, acetate, formate and ethanol. The metabolic flux distributions in the exponential-phase growth were described in cultivations performed under acidifying conditions at different IGCs (5, 25 and 45 g.L⁻¹ glucose) and in cultivation at 25 g.L⁻¹ IGC with the maintenance of constant pH (7.0). The results have demonstrated changes in the metabolic flux distributions in most of metabolites, except for the fluxes through the ATP used in cell maintenance which were similar for the various IGCs under acidifying conditions. The lactate and acetate productions show a close relationship with the ATP and NADH productions. However, the changes in the HA production pathway were more related to the distributions of fluxes to the precursors of HA synthesis than to the energy availability or redox state of the cells.

Key-words: hyaluronic acid, metabolic flux analysis (MFA), fermentation, *Streptococcus zooepidemicus*.

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

Electronic address: mariahelena.santana@gmail.com

1. INTRODUCTION

The hyaluronic acid (HA) is a linear, high molecular weight polysaccharide which consists of repeating disaccharide units of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine residues [1]. HA is produced by almost all members of the animal kingdom as a major component of the extracellular matrix [2], and by streptococci as a mucoid capsule surrounding the cell [3].

Among the HA biological roles are included the elastoviscosity maintenance of connective tissues, tissue hydration control, supramolecular assembly of proteoglycans in the extracellular matrix, and numerous receptor-mediated roles in cell detachment, mitosis, migration, tumor development and metastasis, and inflammation [4]. Reflecting upon this variety of natural functions, HA has been found suitable for a number of applications in the cosmetic and medical fields [5, 6, 7].

Traditionally, HA was extracted from rooster combs; however, considering the limited tissue sources, viral infection risks and high cost [8], microbial production has become increasingly more attractive for large-scale production [9]. Moreover, the bacterial process also allows for the optimization of product yield and quality, through genetic engineering and the culture conditions control [10].

HA has been produced commercially since the early 1980's through the cultivation of group C streptococci, in particular *S. equi* subsp. *equi* and *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. Thenceforth, traditional methods for HA production emphasizing mainly on the cell growth conditions [11, 12, 13, 14, 15, 16] rather than on the cell metabolism were effective in the optimization of the HA microbial production, whereas the cell regulation criteria to adapt to environmental stimulation have not been given much consideration [17].

A very prominent phenotypic investigation method that has been employed for the analysis of cells in different environments is the quantification of metabolic fluxes in cells grown under balanced conditions, such as in a steady-state chemostat or during the exponential phase of a batch culture [18]. A common approach for the estimation of intracellular fluxes is the metabolic flux analysis (MFA) or, more specifically, metabolite balancing [19, 20]. It uses mass balancing techniques and the assumption of metabolic steady state for the formulation of linear constraints. These constraints, together with the measurements of extracellular uptake and secretion rates, allow the calculation of intracellular net reaction rates and, thus, the determination of metabolic flux distributions in a defined stoichiometric network [21]. Comparison of metabolic flux distributions under different environmental perturbation may provide valuable knowledge about the interactions between different pathways and the cellular physiology and metabolism [21, 22].

So far, few studies regarding the MFA and HA production have been developed. Chong and Nielsen [23] developed a metabolic flux model to compare the glucose and maltose metabolisms during an aerobic batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246. Despite the large differences in energy metabolism, the HA yield was as largely unaffected as was the molecular weight. The analysis of metabolic models carried out by Gao *et al.* [17] for *Streptococcus zooepidemicus* H23 in different culture stages and under different dissolved oxygen tension (DOT) showed that the fluxes to biomass and HA changed significantly in order to adapt to environmental conditions, while the flux to lactate was quite stable. However, Duan *et al.* [24] compared the metabolic flux distribution of *Streptococcus zooepidemicus* G1 under aerobic conditions at various DO levels and demonstrated that the HA synthesis pathway was little affected by the DO level. In contrast, the lactate and acetate fluxes were greatly influenced.

In this study, the metabolic fluxes were analyzed under environmental perturbations such as the initial glucose concentrations and non-controlled or controlled pH along cultivations. Models of metabolic network at different conditions were established using the MFA approach and the relationship between cell growth, HA production, metabolites production, energy flux and reducing equivalent was discussed.

2. MATERIALS AND METHODS

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

2.2. Culture Medium. The synthetic medium contained 60 g.L⁻¹ yeast extract and salts according to the composition reported by Swann *et al.* [25]. The pH was adjusted to 7.5 prior to sterilization. A 20 % (w/v) glucose solution was autoclaved separately and added to obtain initial glucose concentration in the range of 0 and 90 g.L⁻¹.

2.3. Culture Maintenance and Inoculum Preparation. The stock culture was kept frozen in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 10% glycerol and glass beads at -20°C. The pre-inoculum was prepared by streaking the glass beads onto BHI agar plates supplemented with 5% sheep blood (Biotério Boa Vista, São Paulo, Brazil) and incubating at 37°C during 24 hours. Colonies were then transferred into 25 mL of culture medium and grown on a rotatory shaker at 150 rpm and 37°C for 12 hours. Next, the inoculum was transferred into 250 mL of culture medium which was incubated under the same above mentioned conditions during 6 hours.

2.4. Cultivations. All batch cultures were performed using a 3 L BioFlo III fermentation system (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ., USA) with an operating volume of 2.5 L. The media were inoculated with 10% v/v. The bioreactor was sparged with a continuous air supply

(2 vvm) and the agitation rate and temperature adopted were 250 rpm and 37°C, respectively. The initial glucose concentrations of 5, 25 and 45 g.L⁻¹ were studied in cultivations performed under non-controlled pH. For the 25 g.L⁻¹ initial glucose concentration, the cultivations were carried out under non-controlled pH (acidifying cultivation) and controlled pH at 7.0, by the addition of 5 mol.L⁻¹ NaOH solution. Samples were withdrawn at intervals not longer than 2 hours and their cell mass, HA, glucose, lactate, acetate, formate and ethanol concentrations were determined.

2.5. Analytical Methods

2.5.1. Cell growth. Cell growth was determined by the cell dry weight according to the gravimetric method.

2.5.2. Concentrations of glucose, lactate, acetate, formate and ethanol. Culture samples were filtered through membranes with a pore size of 0.2 µm (Sartorius, Goettingen, Germany) and 20 µL of filtered sample were injected into an ion exchange HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a 7.8 mm x 300 mm HPX-87H fast acid column Aminex (Bio-Rad, Hercules, CA., USA). The mobile phase was composed of 0.004 mol.L⁻¹ H₂SO₄ pumped at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹ as described by Chong and Nielsen [23]. The column was maintained at 65°C. The peak elution profile was monitored with a Shimadzu RID-6A refractive index detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

2.5.3. HA concentration. Initially the culture broth was centrifuged at 3200 rpm during 20 minutes. The cell-free broth was treated with ethanol in a proportion 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down, remaining at 4°C during 1 hour for the precipitation of HA. The precipitated HA was redissolved in a 0.15 mol.L⁻¹ NaCl solution. Three precipitation and redissolution steps were performed to increase the yield of HA precipitated. Its concentration was measured by the carbazole method [26].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. The mathematical aspects of the stoichiometric model in *Streptococcus zooepidemicus*

Chong and Nielsen [23] constructed a metabolic network (Figure 4.3.1) whose framework was based on the Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway (v_1 - v_5), the pentose phosphate pathway (v_{12} and v_{13}), the reactions responsible for the fermentation products (v_6 - v_{10}), the estimated compositional data for *S. zooepidemicus* (v_{14} - v_{26} , v_{28} - v_{32}) including synthesis of the cell wall components, lipid membranes and the sugar moiety of nucleotides, the HA production pathway (v_{22} , v_{24} , v_{27}) and the cofactor balances such as ATP, NADH and NADPH. The final model presented 33 reactions (Appendix A), 7 measured net conversions of metabolites and 27 metabolite balances and therefore was an overdetermined system, i.e., there were more measured rates (7) than there were degrees of freedom of the systems (6). All metabolites are described in Appendix B.

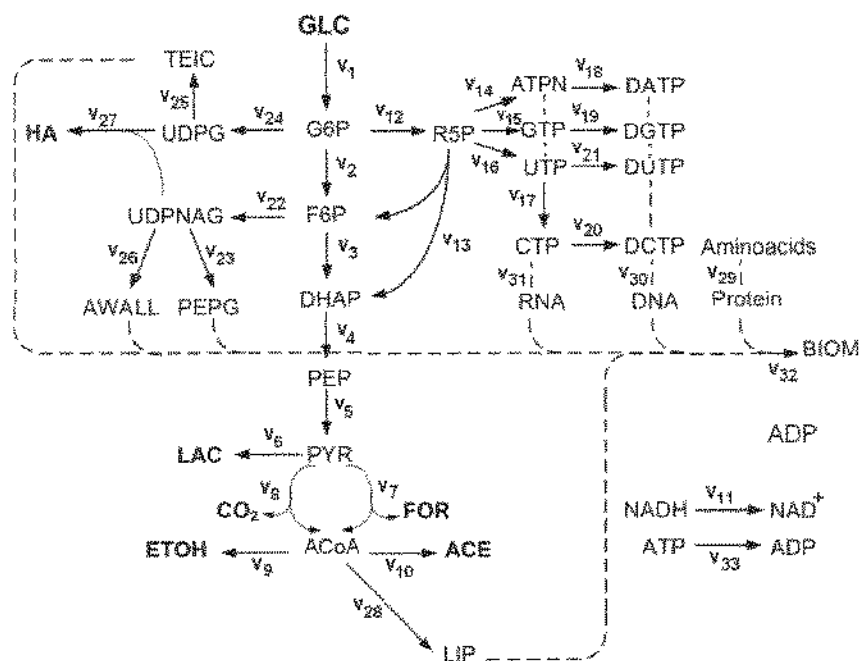


Figure 4.3.1 – The metabolic model of *Streptococcus zooepidemicus*.

Given that the solutions of matrix equations are generally derived using numerical techniques, it is important to measure the solution sensitivity with respect to small perturbations in the measurements. The first step in this sensitivity analysis is to examine whether the stoichiometric matrix is well-conditioned through the calculation of its condition number. For fermentation rates, a requirement for a well-conditioned stoichiometric matrix is that the condition number be between 1 and 100. If the condition number is greater than 100 the stoichiometric matrix is ill-conditioned and even small variations in the measurements may have a very large impact on the calculated fluxes [21].

The stoichiometric matrix described by Chong and Nielsen [23] showed a high condition number of 1.6×10^8 . As an overdetermined system, its solution can be found by using the matrix pseudo-inverse which represents the least squares estimate for the flux vector or by using a subset of the measured rates which forms the determined system [27]. The condition number was also calculated for the determined systems obtained from the overdetermined systems and values in the range of 10^4 were found.

A most accurate information about the sensitivity of the calculations with respect to variations in the measured fluxes is supplied by the sensitive matrix elements which specify the sensitivity of all the elements in the flux vector to the individual measured rates [27]. The overdetermined system used in this work showed high sensitivity with elements presenting values of up to 10^4 . These maximum values decreased and ranging from 10^1 to 10^2 for the determined systems derivated from this overdetermined system.

Therefore, the metabolite balancing approach was used essentially to provide a "snapshot" of the metabolic flux distributions at a particular instance [28] under different environmental conditions. To extract more information from a metabolic network, it is necessary to use a

combination of metabolite balances and labelling experiments [29]. Through the use of ^{13}C -labelled glucose and measurements from the intracellular metabolites labeling pattern by either nuclear magnetic resonance (NMR) or gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), the application of balances for the individual carbon atoms in addition to the metabolic balances becomes feasible [30]. This additional information allows for a more reliable estimation of the fluxes, as well as for the pathway structures analysis and possible reversibilities [18].

3.2. Effect of initial glucose concentration on metabolic flux distributions

Based on the glucose uptake rate, HA and other metabolic product formation rate, and biomass formation rate, the metabolic fluxes were calculated using the stoichiometric matrix. The metabolic flux distributions at different initial glucose concentration (IGC) during the exponential phase of cultivations performed in acidifying conditions (with no pH control) are illustrated in Figure 4.3.2.

Lactate and acetate were produced in all IGCs unlike formate that was only produced in a 5g.L^{-1} IGC. Ethanol was not produced in any of the IGCs. The flux to lactate was inversely proportional to the specific glucose uptake rate (Figure 4.3.2) and the highest flux to lactate occurred in the cultivation that showed the lowest flux to NADH (45g.L^{-1} IGC; Figure 4.3.2c) when there is likely lower inhibition of pyruvate dehydrogenase (PDH) by high NADH/NAD^+ ratios known to occur in many Gram-positive bacteria [31]. The flux to acetate decreased with the increase of the IGC which was not related to the ATP flux that was similar in the different conditions. Usually the pyruvate metabolism shifts to acetate to compensate the reduction of the ATP production but here the acetate flux changes seem to be associated with the decrease in the flux to acetyl-CoA.

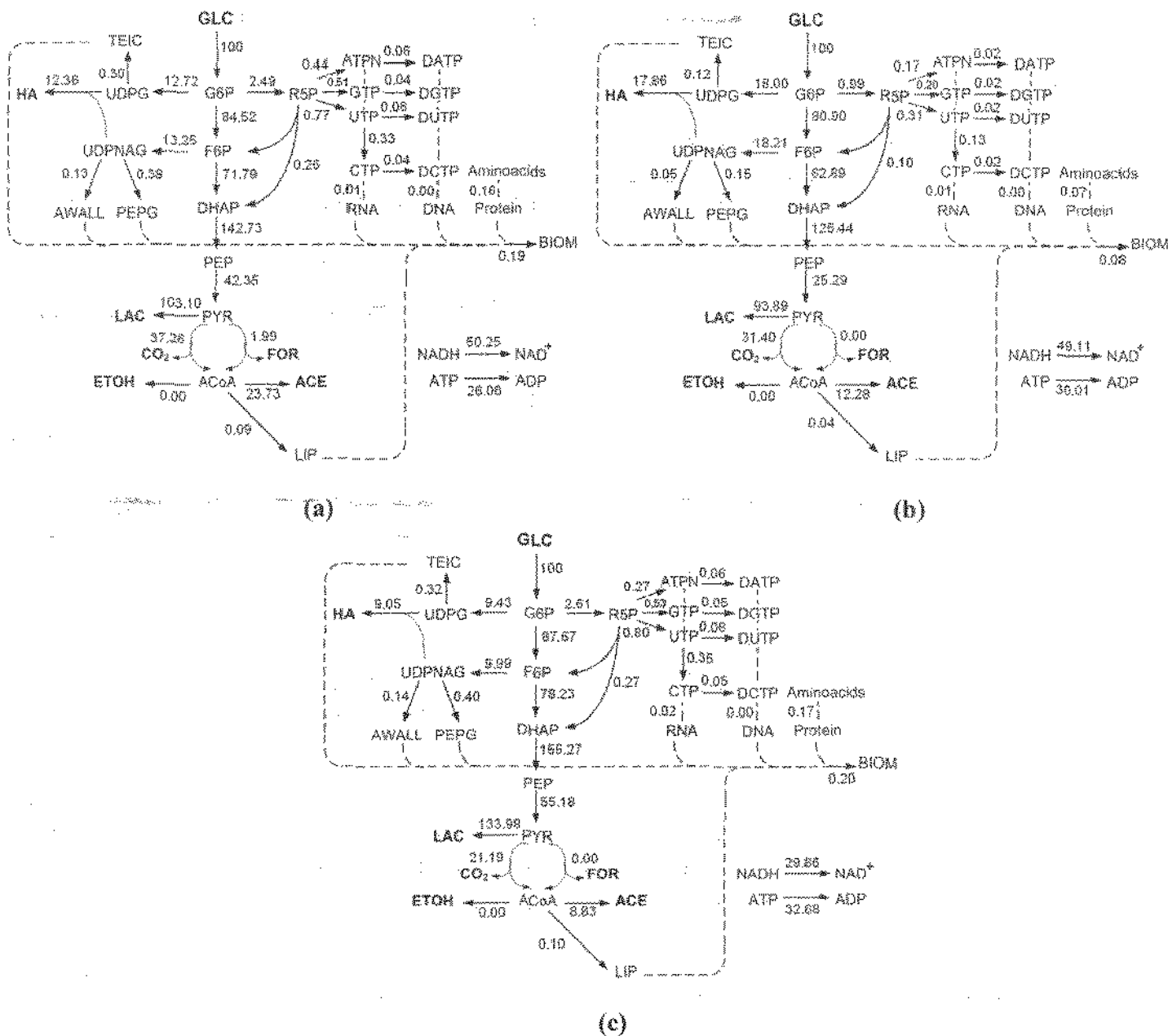


Figure 4.3.2 – Flux distribution for the exponential-phase growth of *Streptococcus zooepidemicus* at different initial glucose concentrations (IGC), without the control of the culture pH: (a) 5g.L⁻¹ IGC; (b) 25g.L⁻¹ IGC; (c) 45g.L⁻¹ IGC. All fluxes are expressed as a percentage of the specific glucose uptake rate in Cmol_{GLC}.Cmol_{BIOM}.h⁻¹ that was (a) 2.31, (b) 4.93, and (c) 1.58.

The fluxes to HA increased with the decrease of the fluxes to lactate, suggesting the inhibition of lactate on the HA synthesis as previously described by Cooney *et al.* [14] and Liu *et al.* [12]. The lowest flux to biomass occurred in the cultivation that showed the highest flux to

HA which is justified by the competition between the cell growth and the HA synthesis for carbon source and energy [9].

3.3. The effect of controlled pH on metabolic flux distributions

Figure 4.3.3 shows the metabolic network model for the exponential phase in batch culture of *Streptococcus zooepidemicus* performed at 25g.L^{-1} IGC and constant pH.

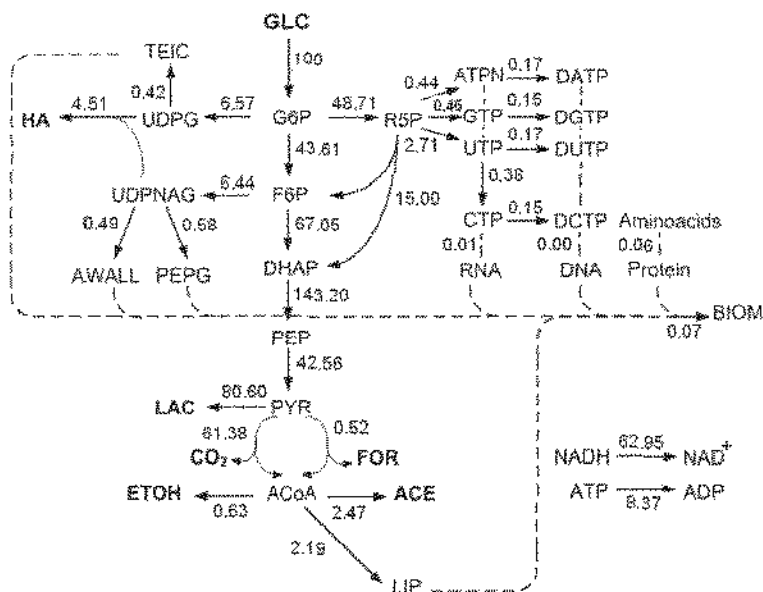


Figure 4.3.3 – Flux distribution for the exponential-phase growth of *Streptococcus zooepidemicus* at 25g.L^{-1} initial glucose concentration and constant culture pH. All fluxes are expressed as a percentage of the specific glucose uptake rate that was $7.67\text{Cmol}_{\text{GLC}}.\text{Cmol}_{\text{BIOM}}.\text{h}^{-1}$

Lactate was also the main product of the metabolism in this new environmental condition but the continuous pH correction resulted in the depletion of glucose provided as carbon source which was not observed in the cultivation under acidifying conditions (Figure 4.3.4).

The flux to lactate was also inversely proportional to the specific glucose uptake rate which resulted in a lower flux to lactate (80.60%) compared to the flux to lactate in the cultivation under acidifying conditions (93.89%). The flux to acetate which is usually related to ATP production decreased in the cultivation at constant pH possibly due to lower cell maintenance energy

required in this environmental condition. The mechanisms for the intracellular pH maintenance at a constant level even with large variations in the extracellular medium pH occur at the expense of a significant increase in the maintenance demands [27] represented by v_{33} in the stoichiometric model. A comparison of Figures 4.3.2 and 4.3.3 shows the reduction of the cell maintenance energy from 30.01% to 8.37% of the specific glucose uptake rate when the cultivation from 25 g.L⁻¹ IGC was performed at constant pH. Moreover, the fluxes to formate and ethanol were observed even in small amounts (Figure 4.3.3).

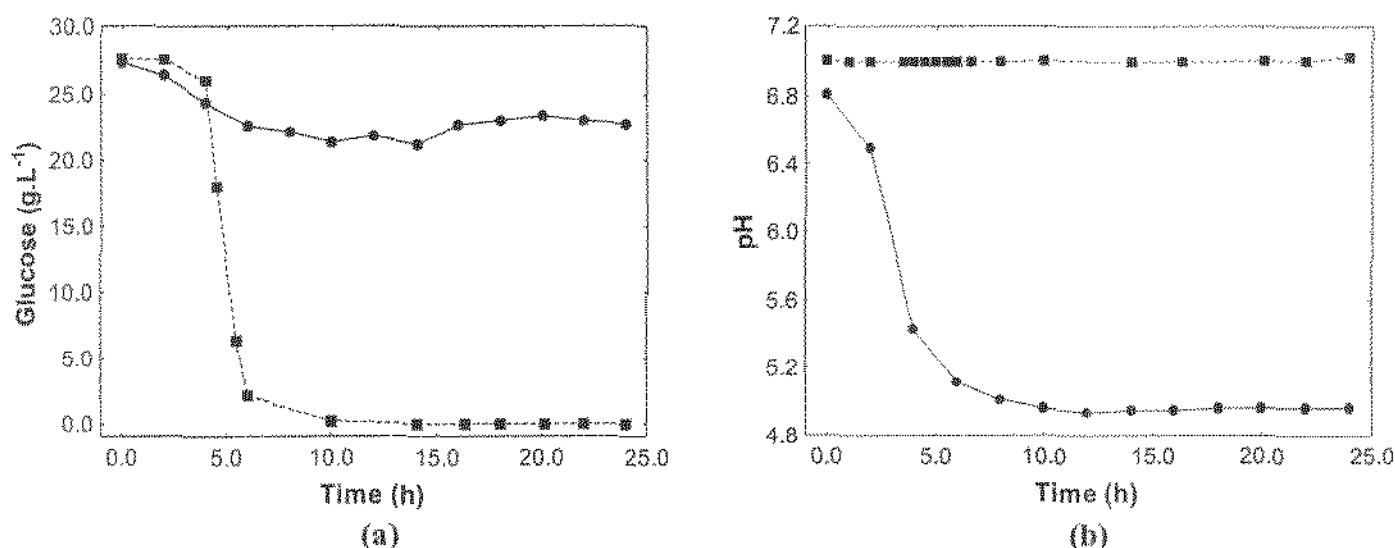


Figure 4.3.4 – Profiles of the (a) glucose concentration and (b) pH for batch culture of *Streptococcus zooepidemicus* at 25g.L⁻¹ initial concentration glucose in cultivations performed (●) under acidifying conditions and (■) at constant pH (7.0).

The continuous correction of culture pH at 25 g.L⁻¹ IGC did not change the flux to biomass (Figure 4.3.2b and 4.3.3) however it decreased the flux to HA despite the higher HA productivity observed due to higher glucose consumption.

3.4. Energy and reducing equivalent balance at different environmental conditions

The redox balance and ATP production calculations are summarized in Table 4.3.1. NADH was produced by the glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH), by PDH and by UDP-glucose

dehydrogenase (HASB) during the HA synthesis. GAPDH was the chief source for the reducing equivalent since it provides 2 moles of NADH per mole of glucose consumed in the EMP pathway. The HASB and PDH contributions change according to the direction of the metabolism. The PDH contribution was more pronounced in the 25 g.L⁻¹ IGC cultivation at controlled pH resulting in the higher flux through NADH oxidase (NOX) as seen in Table 4.3.1.

Table 4.3.1 – Energy and reducing equivalent balance for the exponential-phase growth of *Streptococcus zooepidemicus* at different environmental conditions.

Parameter	Environmental Conditions			
	5 g.L ⁻¹	25 g.L ⁻¹	45 g.L ⁻¹	25 g.L ⁻¹ pH (7.0)
Reducing equivalent				
v_{NADH}^a	50.25	49.11	29.86	62.95
Total NADH produced (%)				
GAPDH	69.7	65.1	79.8	67.0
HASB	12.1	18.6	9.3	4.2
PDH	18.2	16.3	10.9	28.7
Total NADH consumed (%)				
LDH	66.8	65.5	81.2	53.5
ADH	0.0	0.0	0.0	0.8
NOX	32.5	34.2	18.1	41.8
BIOM	0.7	0.3	0.7	3.1
Energy				
v_{ATP}^b	26.06	30.01	32.68	8.37
r_{ATP}^c (Cmol _{ATP} .Cmol _{BIOM} .h ⁻¹)	3.17	4.94	2.23	9.29
$Y_{\text{ATP/S}}^d$ (Cmol _{ATP} .Cmol _{GLC} ⁻¹)	1.37	1.00	1.41	1.21

^a NADH flux; ^b ATP flux; ^c ATP production; ^d ATP yield from glucose.

Lactate dehydrogenase (LDH) and NOX reoxidised most of the reduced cofactor. Some NADH was also consumed during the lipids formation, teichoic acids (BIOM) and ethanol by the alcohol dehydrogenase (ADH) though their contribution was very small by comparison. The highest NADH consumption by LDH in the 45 g.L⁻¹ IGC cultivation was responsible for the lowest flux through NOX.

Energy was generated by substrate-level phosphorylation (r_{ATP}) and can be estimated by $v_4 + v_5 + v_{10} - v_3$. The ATP production was proportional to the specific glucose uptake rate which resulted in similar ATP yields. The excessive ATP in the metabolism (v_{ATP}) which is consumed by cells for maintenance activities was similar in the different IGCs studied and it was lower in the cultivation at constant pH as mentioned above.

The ATP and NADH produced in the cultivation did not show a close relationship with the HA synthesis. Changes in the HA production pathway were more related to the distributions of fluxes to the precursors of HA synthesis, UDP-glucuronic acid (UDPG) and UDP-N-acetylglucosamine (UDPNAG), than to the energy availability or redox state of the cells as equally observed by Chong and Nielsen [23, 32]. Despite the fluxes of precursors, the HA synthesis also seems to be affected by the pH effects on the activity of hyaluronan synthase. Tlapak-Simmons *et al.* [33] determined as 6.5 to 11.5, as the pH range for the optimal activity of a hyaluronan synthase from *Streptococcus equisimilis*. Hence, the pH control at 7.0, benefits the HA production compared to acidifying conditions.

4. CONCLUSIONS

Metabolic fluxes provide the fundamental basis for the characterization of cells and cellular function. Being so, they must be determined systematically under different environmental conditions and for different genetic backgrounds. This information will allow for the understanding of the fundamentals of cellular metabolism and will also provide the basis for rational modification and flux control. However, although stoichiometric models are clearly very powerful, the main drawback they present is the limited predictive power, which is due to the lack of regulatory information in the model formulation.

The environmental conditions, IGCs and pH control, studied in this work redirected the ATP, NADH and metabolites flux. The ATP and NADH produced in the cultivation show a close relationship mainly with the lactate and acetate production. Differently, the changes in the HA production pathway were more related to the distributions of fluxes to the precursors of HA synthesis than to the energy availability or redox state of the cells. These results illustrate the difficulties in improving the production of a substance whose synthesis competes with the biomass synthesis in precursor and energy requirements. The balancing of the two principal HA pathway branches (fluxes to the two precursors) is a novel metabolic engineering challenge. Additionally, the maintenance of pH at 7.0 is favorable for the activity and stability hyaluronan synthase, compared to the low levels of pH reached at acidifying conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge CNPq (Brazil) for the financial support, Investiga Group (Campinas-SP, Brazil) for the maintenance of the bacteria culture, Laboratory of Bioseparations (University of Campinas, Campinas-SP, Brazil) for the availability of HPLC system, and and Angela Klatil Ribeiro for the language review.

5. APPENDICES

Appendix A – Metabolic reactions in *Streptococcus zooepidemicus* (Chong *et al.*, 2003).

v_1	$GLC + PEP \rightarrow G6P + PYR$
v_2	$G6P \rightarrow F6P$
v_3	$F6P + ATP \rightarrow 2 \text{ DHAP} + ADP$
v_4	$DHAP + NAD + ADP + PI \rightarrow PEP + NADH + ATP$
v_5	$PEP + ADP \rightarrow PYR + ATP$
v_6	$PYR + NADH \rightarrow LAC + NAD$
v_7	$PYR + COA \rightarrow FOR + ACOA$
v_8	$PYR + COA + NAD \rightarrow ACOA + NADH + CO_2$
v_9	$ACOA + 2 \text{ NADH} \rightarrow ETOH + COA + 2 \text{ NAD}$
v_{10}	$ACOA + ADP + PI \rightarrow ACE + COA + ATP$
v_{11}	$2 \text{ NADH} + O_2 \rightarrow 2 \text{ NAD} + 2 \text{ H}_2O$
v_{12}	$G6P + 2 \text{ NADP} \rightarrow R5P + 2 \text{ NADPH} + CO_2$
v_{13}	$3 \text{ R5P} \rightarrow 2 \text{ F6P} + \text{DHAP}$
v_{14}	$A + R5P + 4 \text{ ATP} \rightarrow \text{ATPN} + 4 \text{ ADP} + \text{PPI}$
v_{15}	$G + R5P + 4 \text{ ATP} \rightarrow \text{GTP} + 4 \text{ ADP} + \text{PPI}$
v_{16}	$U + R5P + 4 \text{ ATP} \rightarrow \text{UTP} + 4 \text{ ADP} + \text{PPI}$
v_{17}	$UTP + \text{GLN} + \text{ATP} \rightarrow \text{CTP} + \text{GLU} + \text{ADP} + \text{PI}$
v_{18}	$\text{ATPN} + \text{NADPH} \rightarrow \text{DATP} + \text{NADP}$
v_{19}	$\text{GTP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{DGTP} + \text{NADP}$
v_{20}	$\text{CTP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{DCTP} + \text{NADP}$
v_{21}	$\text{UTP} + \text{MTHF} + 2 \text{ ATP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{DTTP} + \text{DHF} + 2 \text{ ADP} + \text{NADP} + \text{PPI}$
v_{22}	$\text{F6P} + \text{GLN} + \text{ACOA} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDPNAG} + \text{GLU} + \text{COA} + \text{PPI}$
v_{23}	$2 \text{ UDPNAG} + \text{PEP} + 3.5 \text{ ALA} + \text{GLU} + \text{LYS} + 8 \text{ ATP} + \text{NADPH} \rightarrow \text{PEP} + 2 \text{ UTP} + 8 \text{ ADP} + 7 \text{ PI} + \text{NADP}$
v_{24}	$\text{G6P} + \text{UTP} \rightarrow \text{UDPG} + \text{PPI}$
v_{25}	$\text{UDPG} + 3 \text{ DHAP} + 3 \text{ NADH} + 5 \text{ ATP} \rightarrow \text{TEIC} + 3 \text{ NAD} + 5 \text{ ADP} + \text{UTP} + 2 \text{ PPI}$
v_{26}	$\text{UDPNAG} + 2 \text{ G6P} + 2 \text{ NADPH} + 3 \text{ ATP} \rightarrow \text{AWALL} + \text{UTP} + 2 \text{ NADP} + 3 \text{ ADP} + 2 \text{ PPI}$
v_{27}	$\text{UDPG} + \text{UDPNAG} + 2 \text{ NAD} + 2 \text{ ATP} \rightarrow \text{HA} + 2 \text{ UTP} + 2 \text{ NADH} + 2 \text{ ADP}$
v_{28}	$23.9 \text{ ACOA} + 2.1 \text{ DHAP} + 0.65 \text{ UDPG} + 43.5 \text{ NADPH} + 24.3 \text{ ATP} + 2.1 \text{ NADH} \rightarrow \text{LIP} + 23.9 \text{ COA} + 43.5 \text{ NADP} + 24.3 \text{ ADP} + 2.1 \text{ NAD} + 0.65 \text{ UTP} + 1.1 \text{ PPI} + 2.2 \text{ PI} + 2.1 \text{ H}_2O$
v_{29}	$100 \text{ Aminoacids} + 430.6 \text{ ATP} \rightarrow 100 \text{ Protein} + 430.6 \text{ ADP} + 430.6 \text{ PI}$
v_{30}	$29 \text{ DATP} + 29 \text{ DTTP} + 21 \text{ DGTP} + 21 \text{ DCTP} + 137.2 \text{ ATP} \rightarrow 100 \text{ DNA} + 137.2 \text{ ADP} + 132 \text{ PI} + 100 \text{ PPI}$
v_{31}	$26.2 \text{ ATPN} + 21.6 \text{ UTP} + 32.2 \text{ GTP} + 20 \text{ CTP} + 40 \text{ ATP} \rightarrow 100 \text{ RNA} + 40 \text{ ADP} + 40 \text{ PI} + 100 \text{ PI}$
v_{32}	$86.7 \text{ Protein} + 2 \text{ PEPG} + 1.6 \text{ TEIC} + 0.7 \text{ AWALL} + 1.1 \text{ DNA} + 7.6 \text{ RNA} + 0.5 \text{ LIP} \rightarrow 100 \text{ BIOM}$
v_{33}	$\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{PI}$

Appendix B – Abbreviations for the metabolites.

Measured metabolites	Balanced metabolites	Others
Acetate (ACE)	Acetyl-CoA (ACoA)	Adenine (A)
Biomass (BIOM)	Adenosine triphosphate (ATP)	Adenosine diphosphate (ADP)
Ethanol (ETOH)	ATP incorporated into biomass (ATPN)	Alanine (ALA)
Formate (FOR)	Antigenic wall polysaccharide (AWALL)	Carbon dioxide (CO ₂)
Glucose (GLC)	Cytidine triphosphate (CTP)	Coenzyme A (CoA)
Hyaluronic acid (HA)	Deoxyadenosine triphosphate (DATP)	Dihydrofolate (DHF)
Lactate (LAC)	Deoxycytidine triphosphate (DCTP)	Guanine (G)
	Deoxyguanosine triphosphate (DGTP)	Glutamine (GLN)
	Deoxythymidine triphosphate (DTTP)	Glutamate (GLU)
	Dihydroxyacetone phosphate (DHAP)	Glycine (GLY)
	Deoxyribonucleic acid (DNA)	Water (H ₂ O)
	Fructose-6-phosphate (F6P)	Lysine (LYS)
	Glucose-6-phosphate (G6P)	N ⁵ ,N ¹⁰ -methylene-THF (MTHF)
	Guanosine triphosphate (GTP)	Nicotinamide adenine dinucleotide (oxidised) (NAD)
	Lipid (LIP)	NAD phosphate (oxidised) (NADP)
	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced) (NADH)	Oxygen (O ₂)
	NAD phosphate (reduced) (NADPH)	Orthophosphate (PI)
	Phosphoenolpyruvate (PEP)	Pyrophosphate (PPI)
	Peptidoglycan (PEPG)	Uracil (U)
	Protein	
	Pyruvate (PYR)	
	Ribose-5-phosphate (R5P)	
	Ribonucleic acid (RNA)	
	Teichoic acid (TEIC)	
	UDP-glucose (UDPG)	
	UDP-N-acetylglucosamine (UDPNAG)	
	Uridine triphosphate (UTP)	

REFERENCES

- [1] B. Weissman, K. Meyer, The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *J Am Chem Soc* 1954; 76:1753-1757.
- [2] T.C. Laurent, J.R.E. Fraser, Hyaluronan. *FASEB J.* 6 (1992) 2397-2404.
- [3] M.R. Wessels, A. Moses, J.B. Goldberg, T.J. Dicesare. Hyaluronan acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 (1991) 8317-8321.
- [4] M.K. Cowman, S. Matsuoka, Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydr. Res.* 340 (2005) 791-809.
- [5] G. Kogan, L. Soltes, R. Stern, P. Gemeiner, Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett* 29 (2007) 17-25.
- [6] M.B. Brown, A.S. Jones, Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *JEADV* 19 (2005) 308-318.
- [7] E. Esposito, E. Menegatti, R. Cortesi, Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. *Int. J. Pharm.* 288 (2005) 35-49.
- [8] M. O'Regan, I. Martini, F. Crescenzi, C. De Luca, M. Lansing, Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 16 (1994) 283-286.
- [9] B.F. Chong, L.M. Blank, R. McLaughlin, L.K. Nielsen, Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66 (2005) 341-351.
- [10] D.C. Armstrong, M.R. Johns, Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 2759-2764.
- [11] L. Liu, G. Du, J. Chen, M. Wang, J. Sun, Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioprocess Biosyst Eng.* Published online: 11 February 2009.

- [12] L. Liu, G. Du, J. Chen, M. Wang, J. Sun, Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioresour. Technol.* 110 (2008) 923–926.
- [13] W.C. Huang, S.J. Chen, T.L. Chen, The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic fermentation. *Biochem. Eng. J.* 32 (2006) 239–243.
- [14] M.J. Cooney, L.-T. Goh, P.L. Lee, M.R. Johns, Structured model-based analysis and control of the hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: physiological implications of glucose and complex-nitrogen-limited growth. *Biotechnol. Prog.* 15 (1999) 898–910.
- [15] D.C. Armstrong, M.J. Cooney, M.R. Johns, Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47 (1997) 309–312.
- [16] J. Kim, S. Yoo, D. Oh, Y. Kweon, D. Park, C. Lee, G. Gil, Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme Microb Technol* 19 (1996) 440–445.
- [17] H.J. Gao, G.C. Du, J. Chen, Analysis of metabolic fluxes for hyaluronic acid (HA) production by *Streptococcus zooepidemicus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (2006) 399–408.
- [18] A.K. Gombert, J. Nielsen, Mathematical modelling of metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 (2000) 180–186.
- [19] H.P.J. Bonarius, G. Schmid, J. Tramper, Flux analysis of underdetermined metabolic networks: the quest for the missing constraints. *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 308–314.
- [20] A. Varma, B.O. Palsson, Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Biotechnology* 12 (1994) 994–998.

- [21] G.N. Stephanopoulos, A.A. Aristidou, J. Nielsen, Metabolic engineering: principles and methodologies. Academic Press, San Diego, 1998.
- [22] S. Ostergaard, L. Olsson, J. Nielsen, *Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol.Biol. Rev. 64 (2000) 34-50.
- [23] B.F. Chong, L.K. Nielsen, Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. Biochem. Eng. J. 16 (2003) 153-162.
- [24] X.J. Duan, H.X. Niu, W.S. Tan, X. Zhang, Mechanism analysis of effect of oxygen on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. J. Microbiol. Biotechnol. 19 (2009) 299-306.
- [25] D.A. Swann, B.P. Sullivan, G. Jamieson, K.R. Richardson, T. Singh, Biosynthesis of hyaluronic acid. United States Patent: 4,897,349, 1990.
- [26] Z. Dische, A new specific color reaction of hexuronic acids. J. Biol. Chem. 167 (1946) 189-198.
- [27] J. Nielsen, J. Villadsen, G. Lidén, Bioreaction Engineering Principles. 2nd ed. Plenum Publishers, New York, 2003.
- [28] J.J. Vallino, G. Stephanopoulos, Carbon flux distributions at the glucose 6-phosphate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction. Biotechnol. Prog. 10 (1994) 327-334.
- [29] B. Christensen, A.K. Gombert, J. Nielsen, Analysis of flux estimates based on ¹³C-labelling experiments. Eur. J. Biochem. 269 (2002) 2795-2800.
- [30] K. Schmidt, J. Nielsen, J. Villadsen, Quantitative analysis of metabolic fluxes in *Escherichia coli*, using two-dimensional NMR spectroscopy and complete isotopomer models. J. Biotechnol. 71 (1999) 175-190.

- [31] J.L. Snoep, M.J. Teixeira de Mattos, M.J. Starrenburg, J. Hugenholtz, Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and alpha-acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. *J. Bacteriol.* 174 (1992) 4838-4841.
- [32] B.F. Chong, L.K. Nielsen, Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Biotechnol.* 100 (2003) 33-41.
- [33] V.L. Tlapak-Simmons, C.A. Baron, P.H. Weigel, Characterization of the purified hyaluronan synthase from *Streptococcus equisimilis*. *Biochemistry* 43 (2004) 9234-9242.

4.4. INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÍONS MINERAIS NO CRESCIMENTO CELULAR, RENDIMENTO E MASSA MOLAR DO ÁCIDO HIALURÔNICO PRODUZIDO

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO
“ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY”

THE INFLUENCE OF MINERAL IONS ON THE MICROBIAL PRODUCTION AND MOLECULAR WEIGHT OF HYALURONIC ACID

Aline Mara B. Pires, Silvia Y. Eguchi and Maria Helena Andrade Santana*

Laboratory of Development of Biotechnological Processes
School of Chemical Engineering, P.O.Box 6066
University of Campinas-UNICAMP
13083-970, Campinas-SP, Brazil

ABSTRACT – The influence of the culture medium supplementation with mineral ions has been studied, with focus on the *Streptococcus zooepidemicus* growth, the production and the average molecular weight (MW) of hyaluronic acid (HA). The ions were investigated as individual absence from the totally supplemented medium (C+) or individual presence to the non-supplemented medium (C–). C+ and C– were used as controls. The differences between the effects were analyzed by the Turkey test at $p < 0.05$. The adopted criteria considered required, the ions whose individual absence attained at 80% or less of the C+ and their individual presence was 20% or more than the C–. The supplementation was either inhibitory or acted in synergy with other ions, when the individual absence or presence was 20% higher than C+ or 20% lower than C– respectively. The results showed that the C+ or C– effects were equal for both the HA production and the HA yield from glucose. However, C+ was more beneficial to the cell growth and the individual absence of Na^+ ion to the HA production. The highest MW of HA (7.4×10^7 Da) was observed in the individual presence of Na^+ in spite of the lowest HA concentration (0.65 g.L^{-1}). These results suggest that the HA quality may be modulated through the mineral ion supplementation.

Key words: hyaluronic acid, ion supplementation, *Streptococcus zooepidemicus*.

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

1. INTRODUCTION

The hyaluronic acid (HA) is a linear polysaccharide with high molecular weight, composed of disaccharide units of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine linked alternately by β -1-3 and β -1-4 glycoside bonds [1]. Due to its unique physicochemical, rheological and biological properties, HA is a high aggregated value biopolymer, which has been applied to products of great importance for the medical, pharmaceutical and cosmetic industries [2].

Recently, the HA microbial production has proved to be highly attractive since it does not present the risk of viral contamination and the high costs in the HA purification which characterize the HA produced from animal sources [3]. Moreover, the microbial production provides opportunities for optimization and quality control of the produced HA.

It is a widely recognized fact that environmental conditions such as oxygen, pH, temperature, and the media supplementation with nutrients, vitamins and ions play an important role on the generation of products by fermentation [4]. Minerals such as magnesium (Mg^{++}), potassium (K^+), sodium (Na^+), iron (Fe^{++} e Fe^{+++}), zinc (Zn^{++}), manganese (Mn^{++}), molibdenium (Mo^{++}), cobalt (Co^{++}), copper (Cu^{++}) and calcium (Ca^{++}), supply essential elements for the cell growth, which take part in various intracellular reactions and biological functions [5].

Although there is the inclusion of ions in the various culture media used for the HA production, the literature reports variations in the number, type and concentration of ions. Furthermore, the reported complex or synthetic media had different compositions, as well as different strains of *Streptococcus* were used in the cultivations. Additionally, there are no studies addressing the individual influence of ions on cultivations as well as their influence on cell growth and HA production.

As reported in general information from the literature, Mg^{++} and Mn^{++} were identified as cofactors for glycosyltransferases involved in the synthesis of the disaccharides in polymer chains [6]. According to Petrová *et al.* [7], the activity of the majority of glycosyltransferases depends on a divalent cation which contributes for the binding of sugar-nucleotides, through the stabilization of the conformation from the pyrophosphate fraction.

In the specific case of HA, divalent cations such as Ca^{++} , play an important role on its helicoidal conformation and biological function [8]. Stern [9] considered the concentration of Ca^{++} ion as a determinant factor for the synthesis of HA in cultures of human cells. The availability of Zn^{++} as well, strongly contributes for the HA metabolic synthesis in animals [10]. Monovalent cations (K^{+} and Na^{+}) inhibited the hyaluronan synthase, which is the enzyme responsible for the binding of sugar nucleotides precursors of the HA synthesis [11]. Moreover, the Na^{+} ion may contribute for the HA microbial production, due to its role in the lactate excretion in bacteria of *Streptococcus* genus [12].

Considering the importance of ions in the metabolic processes as well as the lack of information in the literature focusing upon the real necessity for the ions which are used in the culture media for the HA microbial production, it was performed a systematic study aiming to evaluate the influence of potassium, magnesium, manganese, iron, calcium, sodium zinc and copper mineral ions on the *Streptococcus zooepidemicus* growth, yield coefficient of HA from glucose, the HA production and molecular weight.

2. MATERIALS AND METHODS

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

2.2. Control Media. Two control media containing glucose and yeast extract were used in the assays: one of them was supplemented with salts (Table 4.4.1), based on the composition reported by Swann *et al.* [13], which corresponds to the supplemented C+ control. The other medium, the C– control, was composed by glucose and yeast extract only at the same concentration. Table 4.4.2 shows the content of ions in the yeast extract used in both media. Thus, the C+ and C– control media were not positive and negative controls, respectively, but they represent the total supplemented (C+) and non-supplemented (C–) media. The glucose and the salts stock solutions were autoclaved separately and the FeSO₄ solution was sterilized by filtration in 0.22 µm membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). The pH was adjusted to 7.5 before sterilization.

Table 4.4.1 – Composition of the salt-supplemented complex medium (C+ control) based on Swann *et al.* [13].

Components	Concentration (g.L ⁻¹ of deionized water)
Glucose	25.0
Yeast extract	60.0
K ⁺	0.58
Mg ⁺⁺	0.10
Na ⁺	0.03
Ca ⁺⁺	2.73*
Fe ⁺⁺	1.00*
Mn ⁺⁺	0.25*
Zn ⁺⁺	0.23*
Cu ⁺⁺	0.03*
PO ₄ ⁻⁻⁻	0.97 mL
pH 7.5	

* mg.L⁻¹ of deionized water

Table 4.4.2 – Composition of salts in the non-supplemented complex medium (C– control).

Ions	Concentration (g.L⁻¹ of deionized water)
K ⁺	3.44 ±0.09
Mg ⁺⁺	< LQ (24.3)*
Na ⁺	1.54 ± 0.11
Ca ⁺⁺	< LQ (23.8)*
Fe ⁺⁺	< LD (8.97)*
Mn ⁺⁺	< LD (5.00)*
Zn ⁺⁺	< LD (8.50)*
Cu ⁺⁺	< LD (15.8)*

The results are the average and standard deviation of three determinations;

* mg.L⁻¹ of deionized water; LD: Detection limit; LQ: Quantification Limit.

2.3. Culture Maintenance and Pre-Inoculum Preparation. The stock culture was maintained frozen in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 10% glycerol and glass beads at -20°C. The pre-inoculum was prepared by streaking the glass beads onto BHI agar plates supplemented with 5% sheep blood (Biotério Boa Vista, São Paulo, Brazil) and incubating at 37°C during 24 hours.

2.4. Inoculum Propagation. Aiming to exhaust the mineral ions accumulated inside the cell, the inoculum propagation was performed in four steps. In all of the steps the culture medium was the C– control. In the first step a loop of slant from the reactivated colonies (pre-inoculum) was transferred to 5mL of the culture medium and incubated at 37°C along 12 hours. The subsequent steps involved in the transfer of crescent inoculums volumes (1, 5 and 10 mL) propagated at the previous steps in 9, 45 and 90 mL of sterile medium respectively, at the same temperature and time. The volumes from the third and fourth steps were stirred at 150 rpm.

2.5. Cultivations. The cultivations were carried out in 125 mL Erlenmeyer flasks with a working volume of 50 mL medium, inoculated with 10% v/v of the culture from the fourth step of propagation, stirred at 150 rpm and incubated at 37°C during 24 hours. The cultivations were

conducted in duplicate and the pH, cell mass, glucose and HA concentrations, were determined for each flask at the initial and final times. The HA average molecular weight was also determined. The analyses were performed in triplicate. The mineral ions influence was evaluated in terms of the individual absence or presence of the ion under evaluation in the culture medium. The ions individual absence was evaluated in culture media supplemented with all of the studied salts, as described in Table 4.4.1, except for the salt containing the ion under evaluation. The effects of the ions individual presence were evaluated through the addition of the salt containing the ion being evaluated, to the medium containing glucose and yeast extract only. The cultivations were carried out in sets of 10 flasks containing the control media and the other eight, containing the appropriate medium for the ions evaluation. Both the supplemented (C+) and non-supplemented (C-) media were used as controls in the analysis.

2.6. Analytical Methods

2.6.1. Cell growth. The cell growth in the cultivations was determined by the cell dry weight according to gravimetric method and in the inoculum propagation steps by viable cells counting using a microdrop plating technique [14].

2.6.2. Glucose concentration. The glucose concentration was determined through a glucose oxidase commercial kit (LABORLAB, São Paulo, Brazil).

2.6.3. HA concentration. Initially the culture broth was centrifuged at 3200 rpm during 20 minutes. The cell-free broth was treated with ethanol in a proportion 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down, remaining at 4°C during 1 hour for the precipitation of HA. The precipitated HA was redissolved in a 0.15 mol.L⁻¹ NaCl solution. Three precipitation and redissolution steps were performed to increase the yield of HA precipitated. Its concentration was measured by the carbazole method [15].

2.6.4. HA average molecular weight. The average HA molecular weight was determined by size exclusion chromatography, using a Shimadzu chromatography system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), containing a 7.8 mm x 35 mm Polysep-GFC-P column guard (Phenomenex, Torrance, CA, USA) mounted in series with a 7.8 mm x 300 mm Polysep-GFC-P6000 column of the gel filtration (Phenomenex, Torrance, CA, USA) and a refraction index detector (Shimadzu RID-6A). The analysis conditions were: injected sample of 20 μL , 0.1 mol.L⁻¹ sodium nitrate as the mobile phase, flow rate of 1.0 mL.min⁻¹ flow rate and 25°C temperature, as suggested by the column manufacturer. Dextran (American Polymer Standards, Mentor, OH, USA) with molecular weight ranging from 10³ to 10⁶ Da was used as a standard for the calibration curve as described by Balke *et al.* [16].

2.6.5. Ions concentration. The concentration of the ions was determined in the medium containing glucose and yeast extract only (C- control). The ions Ca⁺⁺, Cu⁺⁺, Fe⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, K⁺ and Zn⁺⁺ were analysed by optical emission spectrometry with plasma coupled individually - ICP-OES (Perkin Elmer – 3000 DV, Norwalk, Connecticut, USA), while the Na⁺ ion was quantified by atomic absorption spectrometry - AAS (NovAA 300 – Analytik Jena AG, Jena, Turingia, Alemanha).

2.7. Statistical analysis. The variance was analysed by ANOVA method and the media compared through the Turkey test at 5% probability level ($p < 0,05$).

2.8. Analysis criteria. The following analysis criteria were adopted, aiming at a better results evaluation: The ions whose individual absence attained at 80% or less of C+ and their individual presence was 20% more than C-, were considered required ions. The supplementation was considered either inhibitory or acted in synergy with other ions, when the individual absence or presence were 20% higher than C+ or 20% lower than C-, respectively.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Inoculum propagation

The inoculum was prepared through a previous starvation of the ions from the cells. The growth and viability of the microorganisms in the incubation steps in the non-supplemented medium (C– control) are shown in Table 4.4.3. The results demonstrate the inoculum preparation's reproducibility for both treatment types for the evaluation of the ions influence in the cultivations. The same magnitude order of the cell counting, along the four steps incubation, assure similar starting conditions in the cultivations. The observed cell mass decline following the incubations demonstrates the starving of the ions inside the cells.

Table 4.4.3 – Growth and cell viability from incubations for inoculum propagations in non-supplemented medium for applications in the evaluation of the ions influence on the cultivations.

Treatment type	Absence of the individual ion		Presence of the individual ion	
	Cell counting (UFC.mL ⁻¹)	Cell mass (g.L ⁻¹)	Cell counting (UFC.mL ⁻¹)	Cell mass (g.L ⁻¹)
1 st incubation	ND	0.84	8.6×10^8	1.33
2 nd incubation	5.3×10^8	0.71	4.6×10^8	0.63
3 rd incubation	7.3×10^8	0.51 ± 0.02	8.6×10^8	0.40 ± 0.04
4 th incubation	4.6×10^8	0.40 ± 0.03	4.6×10^8	0.35 ± 0.05

*ND – Not determined.

3.2. The influence of ions on the cultivations

The results below show the influence of the K⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Fe⁺⁺, Ca⁺⁺, Na⁺, Zn⁺⁺ and Cu⁺⁺ mineral ions on the growth of *Streptococcus zooepidemicus*, yield coefficient of HA from glucose, the HA production and molecular weight, considering the criteria described in item 2.8.

3.2.1. Cell growth

The influence of the ion supplementation on the *Streptococcus zooepidemicus* cell growth is presented in Figure 4.4.1. According to the adopted criteria, the individual absence or presence of ions was classified as non-required. However, the total presence of ions (C+) was considered required for a better cell growth which evidenciates the ions synergic behavior. Surprisingly, the C- control medium was not strongly deleterious to cells since the cell growth attained at 69% in the C+ control.

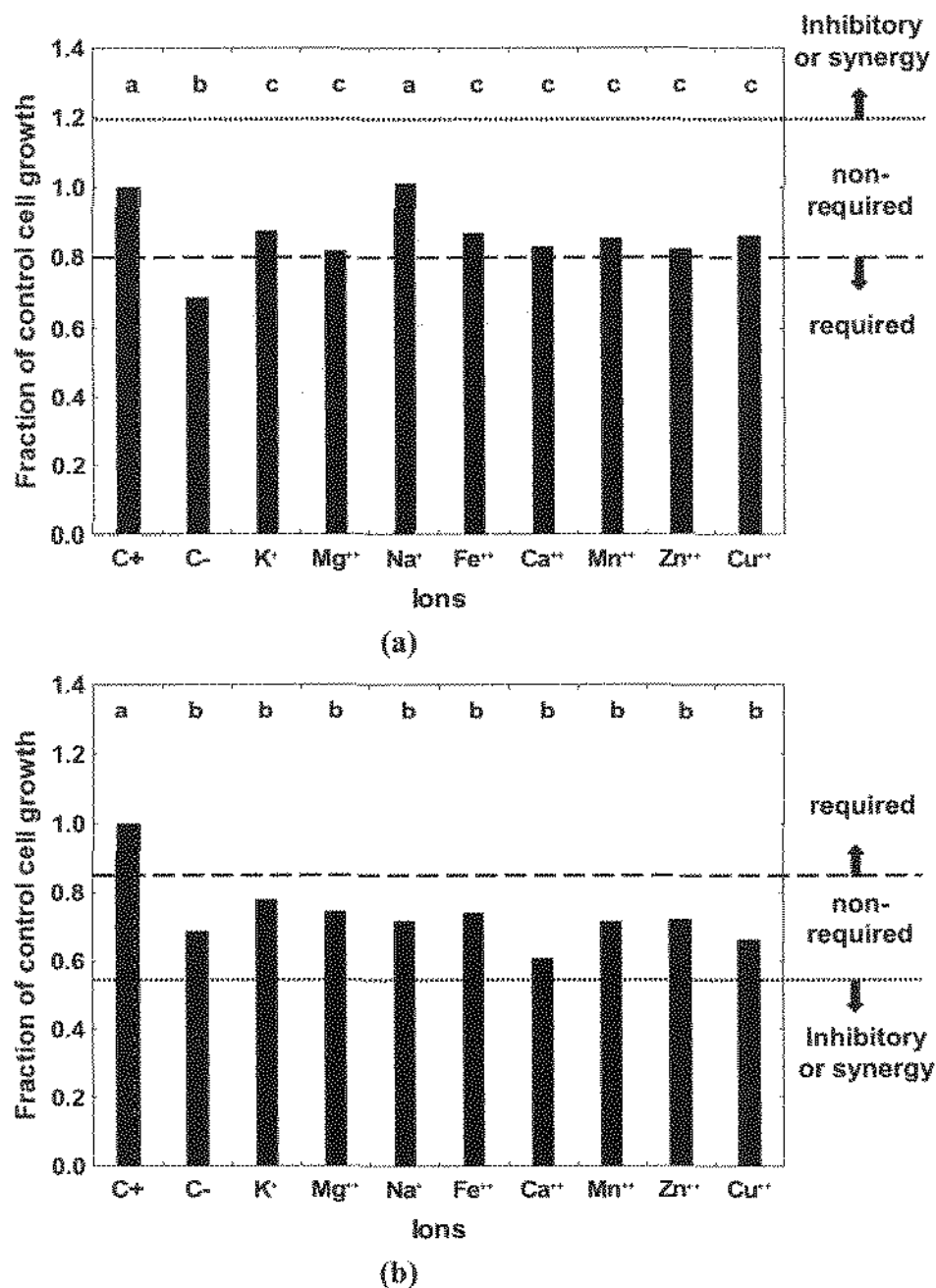
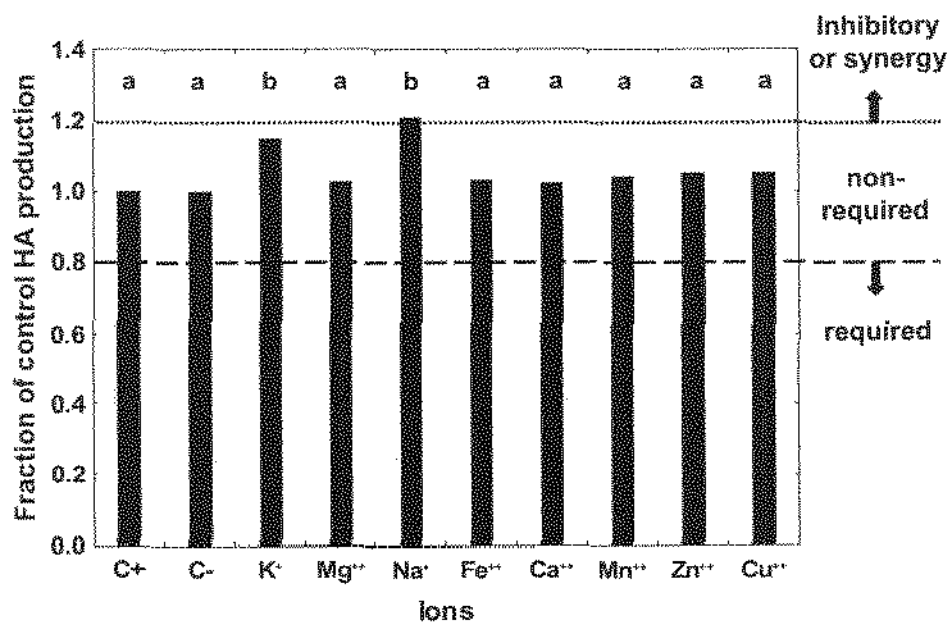


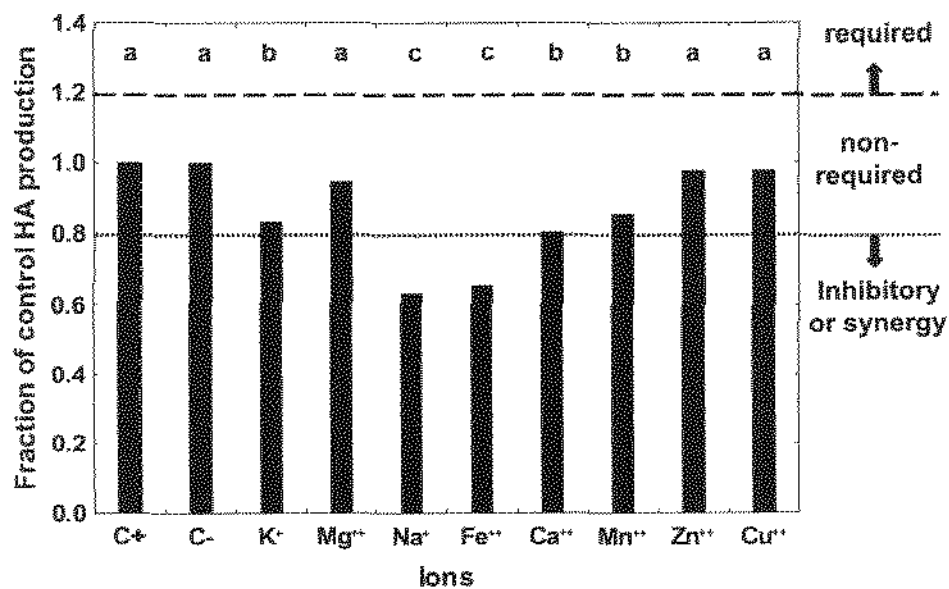
Figure 4.4.1 – Effects of the individual (a) absence or (b) presence of the mineral ions on the growth of *Streptococcus zooepidemicus*. a - the reference value of the average cell growth (0.91 g.L^{-1}) in the control medium supplemented with all of the evaluated ions (C+ control). b - the reference value of the average cell growth (0.62 g.L^{-1}) in the non-supplemented control medium (C- control). The letters above the bars mean the statistical comparisons performed by the Turkey test at 5% probability ($p < 0.05$). Bars with the same letters are not significantly different.

3.2.2. Production of hyaluronic acid (HA)

The results in Figure 4.4.2 show that the total supplementation of the culture medium with ions did not have any influence on the HA production ($C^+ = C^-$). The individual absence or presence revealed inhibitory effects especially due to the Na^+ ion whose individual absence resulted in 22% increase in the HA production and individual presence in 37% reduction related to the controls. The Na^+ effects on the HA production may be associated with the metabolic energy deviation to maintain the protons potential inside the cells [12]. Additionally, according to Tlapak-Simmons [11] monovalent cations such as K^+ and Na^+ inhibited the hyaluronan synthase. The Fe^{++} ion showed inhibitory effect in individual presence only, suggesting a synergic behavior with the other ions.



(a)



(b)

Figure 4.4.2 – Effects of the individual (a) absence or (b) presence of the mineral ions on the production of HA. a - the reference value of the HA production (1.03 g.L^{-1}) in the control medium supplemented with all of the evaluated ions (C+ control). b - the reference value of the HA production (1.03 g.L^{-1}) in the non-supplemented control medium (C- control). The letters above the bars mean the statistical comparisons performed by the Turkey test at 5% probability ($p < 0.05$). Bars with the same letters are not significantly different.

3.2.3. Yield coefficient of HA from glucose

Figure 4.4.3 shows the effects of the ions on the yield coefficient of HA from glucose ($Y_{HA/S}$). Similar to the HA production, no difference was identified between the total supplementation and non-supplementation of the culture medium with ions ($C^+ = C^-$). This result agrees with the individual behavior, in which none of the ions could be classified as required for the $Y_{HA/S}$, according to the adopted criteria. However, the analysis of individual absence or presence spectra points out the Na^+ as the main inhibitor of the $Y_{HA/S}$. Minor effects may attributed to Mn^{++} , Zn^{++} and Cu^{++} ions, which were non-required in the individual absence or in the individual presence only. Considering the lower concentration in the culture medium (below 0.25 mg.L^{-1}) compared the other ions, these effects suggest a synergic action with other ions.

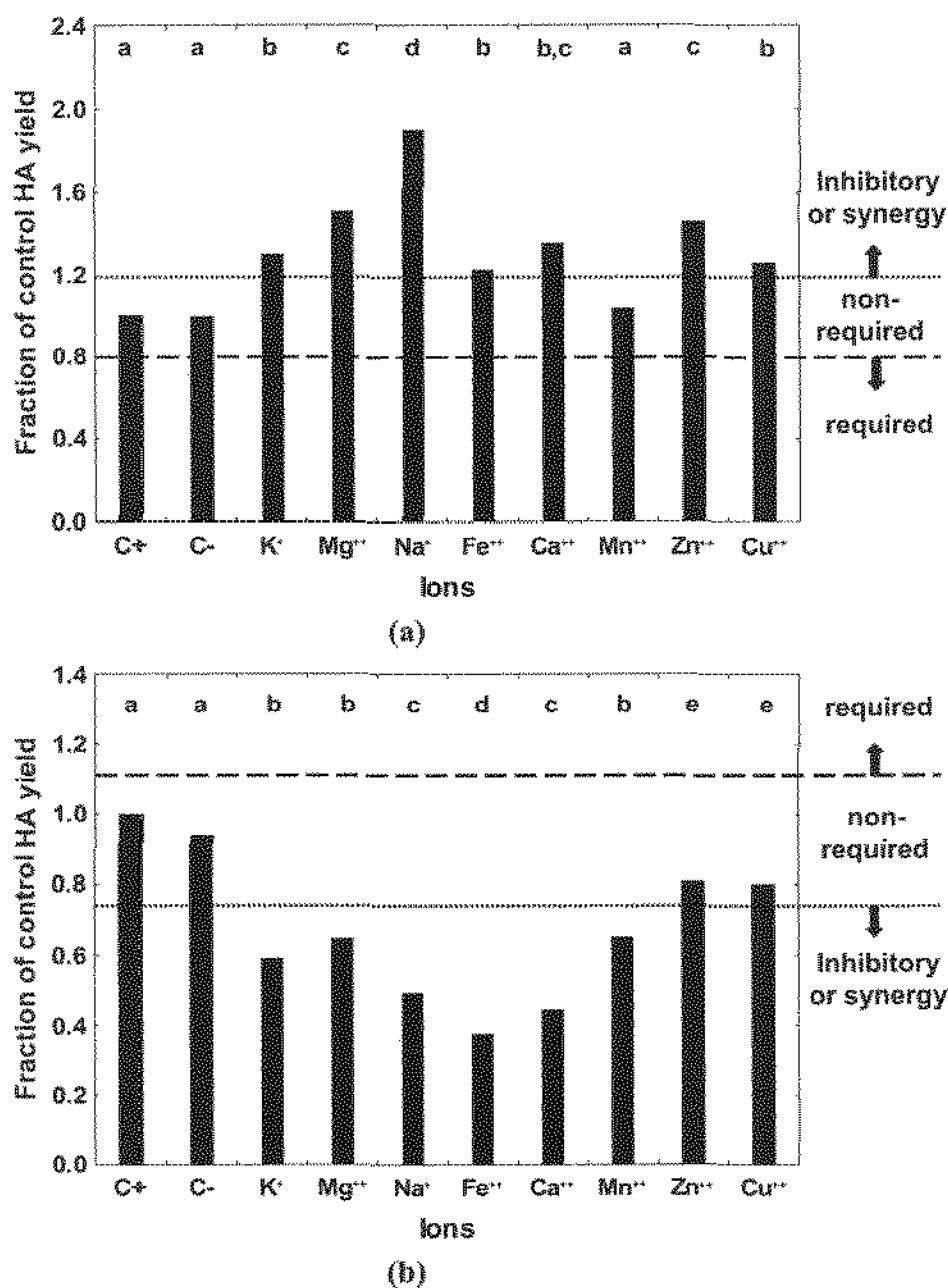
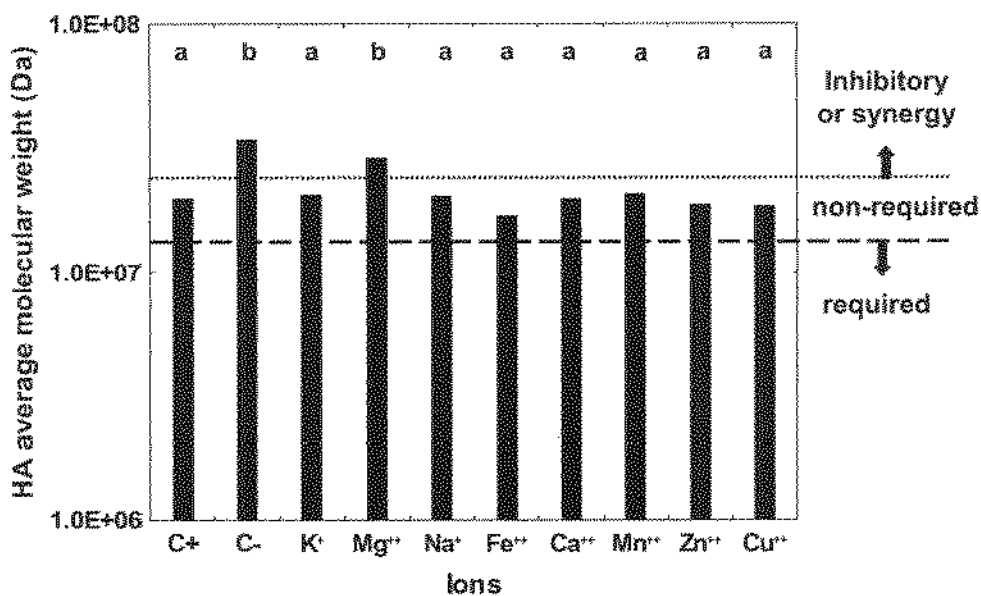


Figure 4.4.3 – Effects of the individual (a) absence or (b) presence of the mineral ions on the global yield coefficient of HA from glucose. a - the reference value of the yield (0.17 g.g^{-1}) in the control medium supplemented with all of the evaluated ions (C+ control). b - the reference yield value (0.16 g.g^{-1}) in the non-supplemented control medium (C- control). The letters above the bars mean the statistical comparisons performed by the Turkey test at 5% probability ($p < 0.05$). Bars with the same letters are not significantly different.

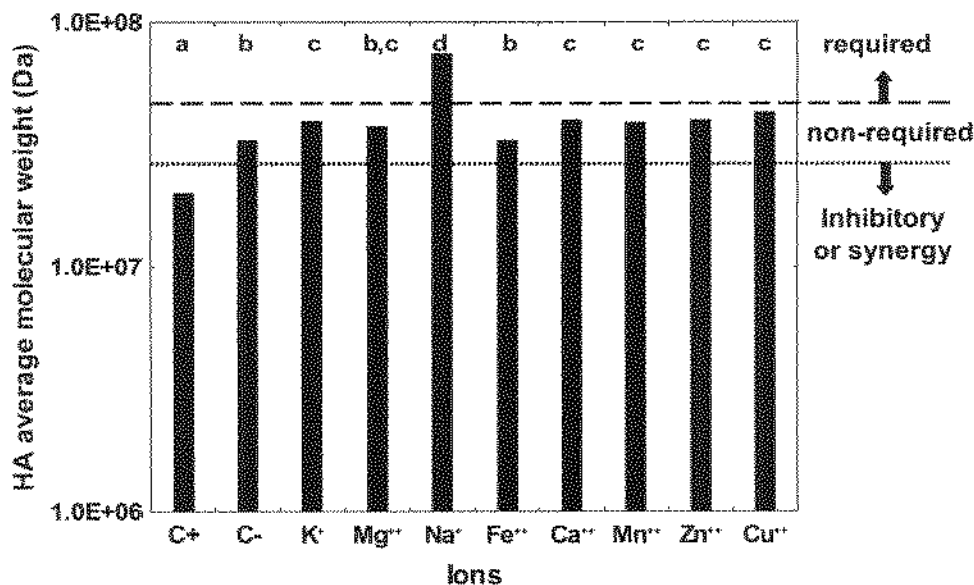
3.2.4. The HA molecular weight (MW)

The total supplementation of the culture medium with ions was not favorable to the MW of HA, as shown in Figure 4.4.4 (C- > C+). The spectra show that the individual absence of the ions had the same influence that the C+ control, except to Mg^{++} , whose individual absence or presence leaded the MW to the same level of the C- control. Thus, the main inhibition observed in the C+ control may be related to Mg^{++} ion.

According to the criteria, none of the individual ions could be classified as required based on the spectrum of the individual presence, except Na^{+} which increased the MW in more than 20% of the C- control. Hence, the individual supplementation of the culture medium with Na^{+} represents the best condition for a higher MW of HA (7.4×10^7 Da) in the cultivation studied in this work, in spite of the lowest HA concentration (Figure 4.4.2).



(a)



(b)

Figure 4.4.4 – Effects of the individual (a) absence or (b) presence of the mineral ions on the molecular weight (MW) of HA. a - the reference value of the MW of HA (2.0×10^7 Da) in the control medium supplemented with all of the evaluated ions (C+ control). b - the reference value of the MW (3.3×10^7 Da) in the non-supplemented control medium (C- control). The letters above the bars mean the statistical comparisons performed by the Turkey test at 5% probability ($p < 0.05$). Bars with the same letters are not significantly different.

4. CONCLUSIONS

The experimental results indicate that the non-supplemented culture medium used in this work (C- control), containing 25 g.L⁻¹ glucose and 60 g.L⁻¹ yeast extract, do not require ion supplementation to be favorable for the HA production. The total supplementation of the culture medium (C+ control) was the best situation for the cell growth only. However, the best condition for the HA production as well as for the yield coefficient of HA from glucose was the individual absence of Na⁺ ion. Opposite conditions benefit the HA production and MW. The highest MW of polymer was observed in the individual presence of Na⁺ ion despite the lowest HA concentration. Therefore, medium supplementation with ions may drives to a higher HA production or MW, depending the quality of desired product.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge CNPq and FAPESP for the financial support, Investiga Group (Campinas, São Paulo, Brazil) for the maintenance of the bacteria culture, Laboratory of Bioseparations for the availability of HPLC system, and Angela Klatil Ribeiro for the language review.

REFERENCES

1. Chong BF, Blank LM, McLaughlin R, Nielsen LK. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 66: 341-351.
2. Zhang F, Ding X, Yang L, Kong Z. A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 72: 168-172.
3. O'Regan M, Martini I, Crescenzi F, De Luca C, Lansing M. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *Int J Biol Macromol* 1994;16: 283-286.
4. Shuler ML, Kargi F. *Bioprocess engineering: basic concepts*. 2nd ed. New Jersey: Prentice Hall; 2002.
5. Vogel HC, Todaro CL. *Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design, and equipment*. 2nd ed. New Jersey: Noyes Publications; 1997.
6. Deangelis PL. Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases. *Glycobiology* 2002; 12: 9R-16R.
7. Petrová P, Koca J, Imberty A. Molecular dynamics simulations of solvated UDP-glucose in interaction with Mg^{2+} cations. *Eur J Biochem* 2001; 268: 5365-5374.
8. Winter WT, Arnott S. Hyaluronic acid: the role of divalent cations in conformation and packing. *J Mol Biol* 1977; 117: 761-784.
9. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 2003; 13: 105R-115R.
10. Thompson RW, Gilbreath RL, Bielk F. Alteration of porcine skin acid mucopolysaccharides in zinc deficiency. *J Nutr* 1975; 105: 154-160.

11. Tlapak-Simmons VL, Baron CA, Weigel PH. Characterization of the purified hyaluronan synthase from *Streptococcus equisimilis*. *Biochemistry* 2004; 43: 9234-9242.
12. White D. The physiology and biochemistry of prokaryotes. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2000.
13. Swann DA, Sullivan BP, Jamieson G, Richardson KR, Singh T. Biosynthesis of hyaluronic acid. 1990; United States Patent: 4,897,349.
14. Cliquet S, Jackson MA. Comparison of air-drying methods for evaluating the desiccation tolerance of liquid culture-produced blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus*. *World J Microbiol Biotechnol* 1997; 13: 299-303.
15. Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J Biol Chem* 1946; 167: 189-198.
16. Balke S, Hamielec A, Leckair B, Pearce S. Gel permeation chromatography. calibration curve from polydisperse standards. *Ind Eng Chem Prod Res Dev* 1969; 8: 54-57.

4.5. DETERMINAÇÃO DAS PRINCIPAIS PROPRIEDADES REOLÓGICAS DO ÁCIDO HIALURÔNICO PRODUZIDO

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“BIOPOLYMERS”

RHEOLOGICAL ASPECTS OF MICROBIAL HYALURONIC ACID

Aline M. B. Pires and Maria H. A. Santana*

Laboratory of Development of Biotechnological Processes
School of Chemical Engineering, P.O.Box 6066
University of Campinas-UNICAMP
13083-970, Campinas-SP, Brazil

ABSTRACT – The rheological properties of the hyaluronic acid produced by the *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 cultivation in synthetic medium at constant pH of 7.0 were determined. Initially, the HA pureness related with proteins, the average molar weight and distribution were determined, as basic requirements for its rheological study. The protein content of HA was reduced through cultivation at controlled pH and precipitation with ethanol at pH 7.0. A concentration as low as 0.44 mg.g^{-1} was reached. The HA average molecular weight was 2.1×10^7 and 4.0×10^6 Da, for non-controlled pH cultivation and precipitation at pH 4.96 and controlled pH 7.0 cultivation and precipitation respectively. The concentration dependence of specific viscosity showed two linear regimes that intercept at critical overlap concentration (c^*) equal to 4 mg.mL^{-1} . The storage (G') and loss (G'') moduli increasing along the HA concentration. Estimates out of the studied range indicate that a cross-over frequency decreased with the increasing HA concentration. The high G' concentration dependence as well as the deviations of the Cox-Merz rule for most of the HA concentrations indicate hyperentangled properties for the HA chains, which could be visualized through atomic force microscopy images even at 0.01 mg.mL^{-1} concentration.

Key-words: hyaluronic acid, rheology, viscoelasticity, *Streptococcus zooepidemicus*.

* Correspondent author. Phone: +55 19 3521 3921; Fax: +55 19 3521 3890
Electronic address: mariahelena.santana@gmail.com

1. INTRODUCTION

The hyaluronic acid (HA) is a naturally occurring, biocompatible, and biodegradable polymer which was identified in vertebrate soft tissues, cultured eukaryotic cell lines and certain prokaryotes as pathogenic group A and C streptococci .HA is a linear polysaccharide composed by repeating disaccharide units composed of N-acetylglucosamine and D-glucuronic acid linked by a β -1-4 glucosidic bond while the disaccharides are linked by β -1-3 bonds. It has one carboxylate group per disaccharide unit, and is therefore a polyelectrolyte. HA is polydisperse with molecular weight typically ranging from 10^4 to 10^7 Da.¹

It is remarkable that HA shows high specificity and versatility interacting with proteoglycans, cell membranes, and receptors on a molecule-to-molecule basis.² Amongst its biological functions are include the maintenance of elastoviscosity of liquid connective tissues such as the joint synovial fluid and eye vitreous, control of tissue hydration and water transport, supramolecular assembly of proteoglycans in the extracellular matrix, and numerous receptor-mediated roles in cell detachment, mitosis, migration, tumor development and metastasis, and inflammation.³

Despite the simple, well-defined chemical structure of HA and research on its properties solutions for over 60 years, the HA conformation in solution is still controversial.⁴ It may adopt different conformations depending on the level of hydration, the ionic environment and the temperature.⁵ According to Gatej *et al.*⁶, it may be possible that for the polymeric chain, dynamic H-bonded regions exist, controlling the molecule average stiffness. Thus, on the basis of hydrodynamic, spectroscopic and theoretical investigations, in dilute solution under physiological solvent conditions, HA chains adopt semiflexible random coil configurations.⁷ The chains occupy large hydrodynamic domains with a low density of chain segments, as a result of the high HA molecular weight, the local stiffness arising from the intrinsically large size of the monomeric

134

units (sugar rings), the hindered rotations about the glycosidic linkages and the dynamically formed and broken interresidue hydrogen bonds.^{8,9} The HA conformation is sensitive to its electrolyte environment. In solution, it undergoes electrostatically induced coil contraction with increasing electrolyte concentration due to the interaction of these ions with the numerous carboxylate groups that exist in the macromolecule.^{5,10}

Balazs and Gibbs¹¹ showed that at low frequencies (long periods of deformation) HA macromolecules have enough time to readjust themselves to the original conformation through the disentanglements of chain segments. Under this condition, the material response is essentially viscous. On the other hand, when HA is subjected to rapid deformation, at high frequencies, the entangled network structure can readjust itself very quickly and reform other entanglements giving rise to the overall elastic response of the material. These structural features account for the viscoelastic rheology and ability of the polymer to retain large volumes of water which are important in determining the HA functions.¹²

The biological specificities and remarkable viscoelastic properties make the HA an attractive biomaterial for various applications in ophthalmology,¹³ rheumatology,¹⁴ dermatology¹⁵ pharmacology and drug delivery¹⁶. In some applications, HA is crosslinked to increase its molecular weight and alter its physical properties and resorption rate.¹⁷

The rheological analysis is a useful tool to explore relationships between mechanical behavior and structure, concentration and molecular weight of biopolymers solutions.¹⁸ Whereas rheological properties relate directly to many parameters of commercial interest, developers and manufacturers of a wide range of products need to measure, understand, and control rheological properties.¹⁹ It provides valuable indications to better design proper substitutes for specific medical and cosmetic application. The rheological behaviors are of decisive importance for all applications.²⁰

The aim of this work was to determine the main rheological properties of microbial HA produced by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 cultivated at controlled pH 7.0 and precipitated with ethanol at the same pH. The conformation of polymer from solution was also observed by atomic force microscopy (AFM).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. HA production. The HA used in this study was produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 cultivation in synthetic medium containing glucose, yeast extract and salts. The cultivations were carried out at non-controlled pH (acidifying cultivation) and pH controlled at 7.0 over 24 hours, using a 3 L BioFlo III fermentation system (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, USA).

2.2. HA precipitation. Initially the cultivation broth was centrifuged at 3200 rpm during 20 minutes. The cell-free broth was treated with ethanol in a proportion 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down, remaining at 4°C during 1 hour for the precipitation of HA. The precipitated HA was redissolved in a 0.15 mol.L⁻¹ NaCl solution. Three steps of precipitation and redissolution were performed to increase the yield of precipitated HA.

2.3. Analytical Methods

2.3.1. HA concentration. The HA concentration was measured by the carbazole method.²¹

2.3.2. HA Molecular weight. The average molecular weight of HA was determined by size exclusion chromatography (SEC). It was used a Shimadzu chromatography system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), containing a 7.8 mm x 35 mm Polysep-GFC-P column guard (Phenomenex, Torrance, CA, USA) mounted in series with a 7.8 mm x 300 mm Polysep-GFC-P6000 column of the gel filtration (Phenomenex, Torrance, CA, USA) and a refraction index

detector (Shimadzu RID-6A). The analysis conditions were: injected sample of 20 μL , 0.1 mol.L^{-1} NaNO_3 as the mobile phase, flow rate of 1.0 mL.min^{-1} and 25°C temperature, as suggested by the column manufacturer. Dextran (American Polymer Standards, Mentor, OH, USA) with molecular weight ranging from 10^3 to 10^6 Da was used as a standard for the calibration curve as described by Balke *et al.*²²

2.3.3. Protein concentration. The protein content in HA precipitate was determined by UV absorption at 280nm,²³ using bovine serum albumin (BSA, Sigma, St. Louis, MO, USA) as a standard.

2.3.4. Rheological analysis: steady shear tests and dynamic oscillatory tests. Rheological properties were measured by a Haake RheoStress 1 rheometer (Haake Inc., Karlsruhe, BW, Germany). Rheological behavior of the microbial HA in 0.15 mol.L^{-1} NaCl solution was assessed by measuring the oscillatory viscoelastic parameters and the permanent flow analysis at 25°C, using 35 mm parallel plates. Coaxial cylinder sensor system was used for lower HA concentration samples. Oscillatory measurements were conducted in the linear region, at a stress of 1.188 Pa, under a frequency range of 0.1-12.92 Hz. Steady shear measurements were carried out at shear rates of 1-50 s^{-1} .

2.3.5. Atomic force microscopy. In the AFM analysis, the HA precipitate was redissolved in water in all precipitation steps to avoid the presence of NaCl. At the end of the precipitation, the HA precipitate was dissolved at a concentration of 10 mg.mL^{-1} and filtered through 0.45 μm membranes (Sartorius, Goettingen, Germany). The HA solution was diluted to final concentrations of 0.01 and 1 mg.mL^{-1} with 0.01 mol.L^{-1} MgCl_2 solution and equilibrated under magnetic stirring for 16 hours at 25°C. After cleavage, mica was hydrated with 100 μL of 0.01 mol.L^{-1} MgCl_2 solution for 15 s which was drained on a filter paper. The surface was rinsed

with 3 x 100 μ L of deionized water and 70 μ L of dilute HA solution was deposited on mica surface, allowed to interact for 5 min, then rinsed with deionized water and dried under a gentle stream of N₂. The mica surface was used immediately for AFM studies. The AFM instrument was an Autoprobe cp (Park Scientific, Sunnyvale, CA) and images were obtained in air at room temperature and humidity. The tapping mode was employed, using silicon probes of 125 μ m nominal length, at a drive frequency of ~160 kHz. Data were stored in 256 $\times$ 256 pixel format and images were processed using the Gwyddion software (Gwyddion 2.15, GNU General Public License, <http://www.gwyddion.net>, 2009).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. HA pureness characterization for the rheological studies

Proteins are the main contaminant of HA. In general, the contaminant proteins cause allergenic and/or adverse effects on the HA for pharmaceutical or cosmetic applications. In terms of rheology, the protein content changes the entanglement, flexibility and conformation of the HA chain, which contribute to the HA viscosity and viscoelasticity properties. Therefore, the HA purification and the precise characterization of the protein content in HA are critical aspects to the understanding of its rheology.

Considering the above mentioned reasons, the protein content in the HA obtained from the *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 cultivation was quantified prior to the rheological studies. Aiming to decrease the protein content in order to reach the medical grade specifications, HA was precipitated with ethanol from the cultivation broths at pH 7.03 and 4.06. Figure 4.5.1a presents the chromatogram from the UV-VIS detector signal at the wavelength 280nm. The results illustrate the pH influence on the protein concentration in both aspects: the cultivation

broths of the *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 at acidifying conditions and controlled pH 7.0, as well as on the precipitation with ethanol. The protein contents of HA precipitated at pH 4.96 was 86.4 mg.g⁻¹. However, the one from the HA precipitated at pH 7.0 was 0.44 mg.g⁻¹ which complies with the British Pharmacopeia 2003 specifications²⁴ for medical grade HA (< 1 mg.g⁻¹). The HA pureness grade may also be observed through the color of the obtained precipitates (Figure 4.5.1b and 4.5.1c). The strong reduction of the color identifies the absence of proteins and the other contaminants.

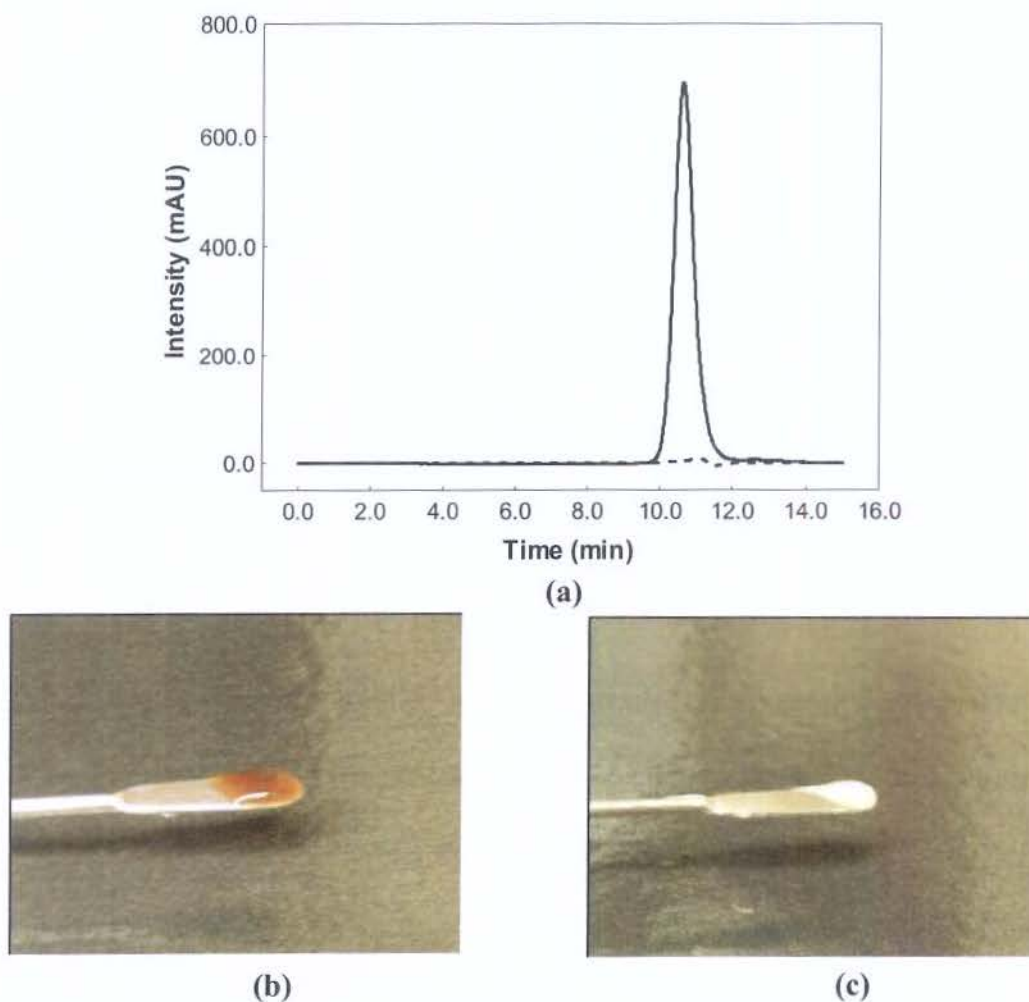


Figure 4.5.1 – The pH effects on (a) the protein content and (b, c) the color of the obtained precipitates from the *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 (—, b) cultivation in acidifying conditions precipitated at pH 4.96; (— —, c) cultivation and precipitation at pH 7.0. The intensity measurements were obtained from a UV-VIS detector at 280nm.

3.2. HA molecular weight

The HA average molecular weight (MW) in the end of cultivations was 2.1×10^7 and 4.0×10^6 Da, for non-controlled pH cultivation and precipitation at pH 4.96 and controlled pH 7.0 cultivation and precipitation respectively. The MW distributions from both cultivations are shown in Figure 4.5.2.

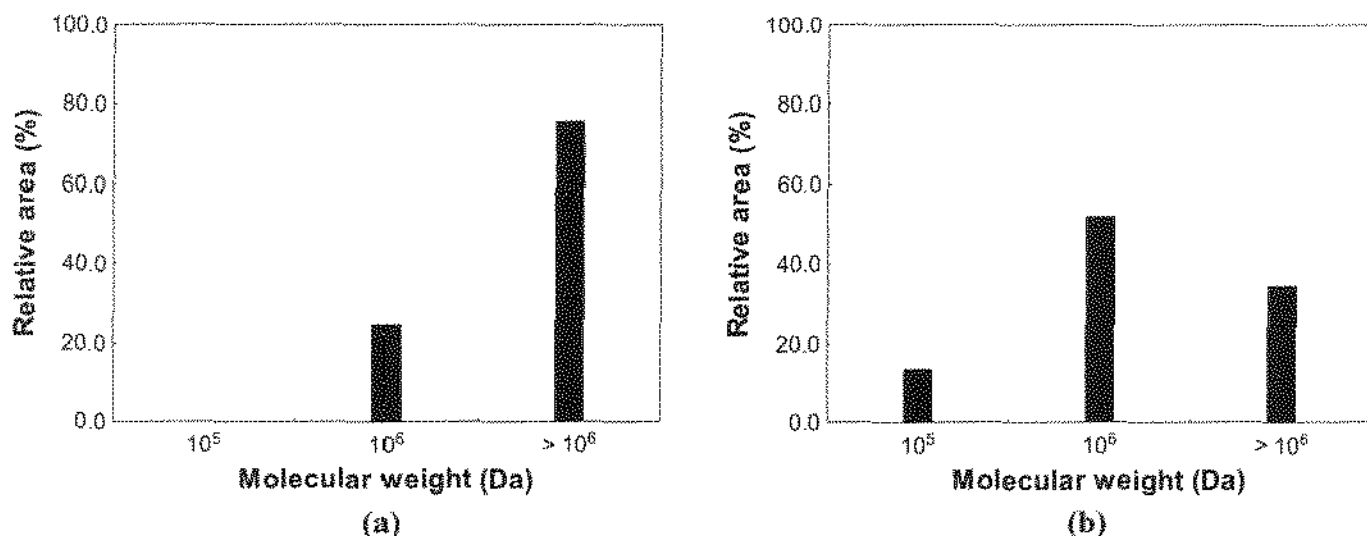


Figure 4.5.2 – The pH effects on the molecular weight distribution of HA produced from the *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 (a) cultivation at acidifying conditions and precipitated at pH 4.96; (b) cultivation and precipitation at pH 7.0.

3.3. Rheological characteristics of microbial HA

Once the rheological behavior of HA solutions is extremely sensitive to protein contamination, the polymer produced in the controlled pH cultivation (lower protein content) was used in determination of the main rheological characteristics.

3.3.1. Shear flow measurements

Shear-thinning (viscosity decreasing with increasing of the shear rate) is a well-known polymer solutions property²⁵ which is typical of entangled networks. In these networks, the rheological response is controlled by the entanglement formation and disruption rates. At low

shear the two rates are similar and the active entanglement total number is almost constant. As the shear rate increases, the disruption rate becomes predominant, leading to thinning.²⁰ Figure 4.5.3a shows this rheological behavior for the higher HA concentrations studied.

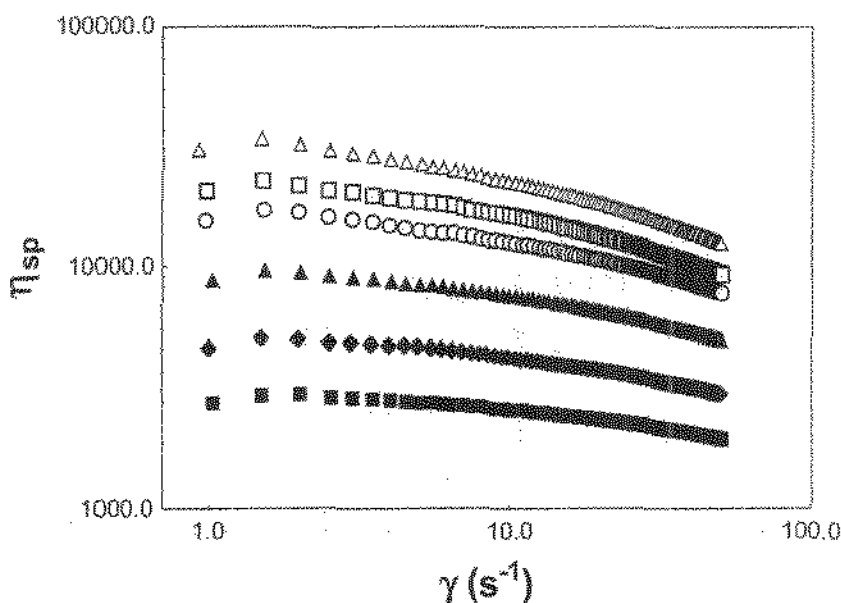


Figure 4.5.3 – The influence of shear rate (γ) on the specific viscosity (η_{sp}) of microbial HA at different concentrations in 0.15 mol.L^{-1} NaCl solution at 25°C : ($\blacksquare$) 50; ($\blacklozenge$) 60; ($\blacktriangle$) 70; ($\circ$) 80; ($\square$) 90; ($\triangle$) 100 mg.mL^{-1} . All concentrations are expressed as mg.mL^{-1} .

The η_{sp} concentration dependence defines the fractional increase in viscosity due to the presence of the polymer. Taking the maximum value of η_{sp} (the “zero shear viscosity”, η_{sp0}), Morris *et al.*²⁶ observed that this dependence shows similar behaviors for various random-coil polysaccharides such as dextran, alginate, carboxymethylamylose, and k-carrageenan. Once it was not possible to determine η_{sp0} for all HA concentrations, in this study, the concentration dependence was observed using η_{sp} at shear rate of 50 s^{-1} (Figure 4.5.3).

Two distinct slope linear regimes (Figure 4.5.4) may be identified which are consistent with data reported by Morris *et al.*²⁶ The first regime with a slope of 1.02 corresponds to the dilute solution where isolated chains are present. The second one with a slope of 3.09 represents semi-

dilute solutions. Morris *et al.*²⁶ found a slope of 1.4 in the dilute solution for all polymers studied, while in the concentrated region the slope increased to 3.3.

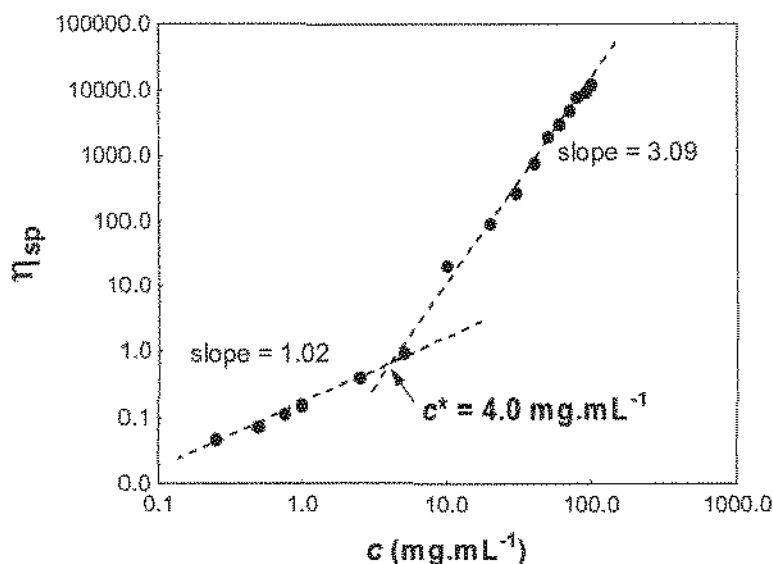


Figure 4.5.4 – Specific viscosity (η_{sp}) dependence on the concentration for the microbial HA in 0.15 mol.L⁻¹ NaCl solution at 25°C.

From the two straight-lines intersection (Figure 4.5.4) the critical overlap concentration (c^*) was calculated to be 4.0 mg.mL⁻¹. The c^* corresponds to the concentration at which the chains start to overlap and the free motion of a single chain is restricted by the presence of the others. This value is close to that estimated by Mo *et al.*²⁷, 2 mg.mL⁻¹, for HA in 0.1 mol.L⁻¹ NaCl solution at 20°C with MW of 2.0×10^6 Da.

3.3.2. Dynamic measurements

The viscous and elastic responses of viscoelastic systems can be quantified by dynamic oscillatory measurements. The storage (G') and loss (G'') moduli are functions of frequency and may be expressed in terms of the amplitude ratio and phase shift relative to the strain, as defined by the Equations 1 and 2.²⁸

$$G' = (\sigma_0 / \gamma_0) \cos (\delta) \quad (1)$$

$$G'' = (\sigma_0 / \gamma_0) \sin (\delta) \quad (2)$$

where (σ_0 / γ_0) is the amplitude ratio, δ is the phase shift, σ_0 is the amplitude of shear stress and γ_0 is the amplitude of the strain equal to L/h , when the motion of the upper (oscillating) plate is $L \sin (\omega t)$, ω is the frequency expressed in rad.s^{-1} , which is equivalent to $\omega/(2\pi)$ Hz, and h is the distance between the plates.

The complex viscosity η^* , defined by equation 3, describes the total resistance to a dynamic shear.

$$\eta^* = \sigma_0 / (\gamma_0 \cdot \omega) \quad (3)$$

In this work, both (G') and (G'') moduli increased with frequency (Figure 4.5.5). Since the storage modulus usually represents the elastic character and the loss modulus describes the viscous behavior, this result suggests that the enhancement in structural entanglement increases the G' modulus, while structural breakdown increases the G'' modulus.²⁹ In addition, with increasing HA concentration, the moduli at the same angular frequency increased.

Dynamic rheological tests also showed that the magnitudes of G'' were greater than those of the G' for the other concentrations, in all of the angular frequency studied range (Figure 4.5.5). HA solutions with concentration below 10 mg.mL^{-1} showed unsatisfactory results with oscillations in dynamic rheological tests due to the rheometer sensitivity and limitations in the used geometry.

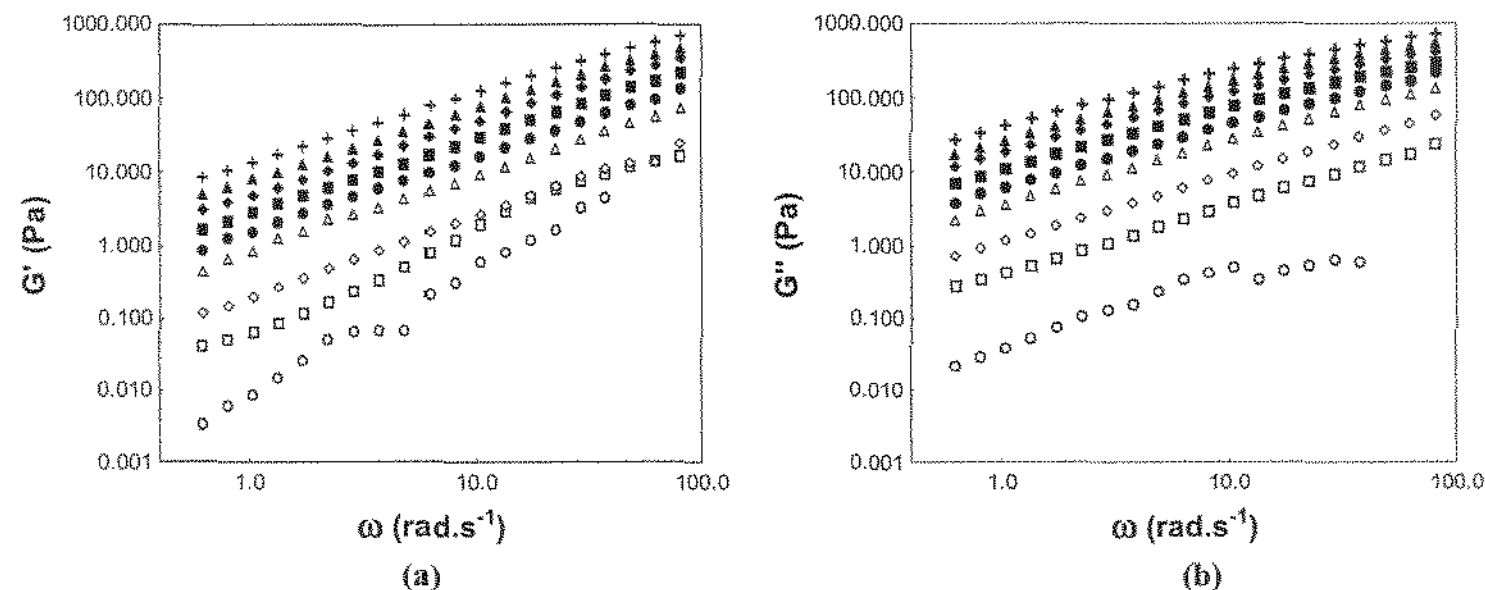


Figure 4.5.5 – Storage (a) and loss (b) shear moduli of microbial HA solutions in 0.15 mol.L⁻¹ NaCl at 25°C as a function of angular frequency: (○) 10; (□) 30; (◇) 40; (△) 50; (●) 60; (■) 70; (◆) 80; (▲) 90; (+) 100 mg.mL⁻¹. All concentrations are expressed as mg.mL⁻¹.

Although G' and G'' values were similar, the G' were slightly higher than the G'' slopes for each concentration (Figure 4.5.5), indicating that a probable cross-over point at frequency ω_0 should take place at frequencies higher than the studied range. According to the estimated intercepts in Table 4.5.1, the cross-over frequency (ω_0) should decrease with the increasing HA concentration.

Table 4.5.1 – G' and G'' slopes and intercepts determining the cross-over frequency (ω_0) from microbial HA solutions in 0.15 mol.L⁻¹ NaCl at 25°C.

HA concentration (% w/v)	G'		G''		Intercept (log ω_0)
	Slope	R ²	Slope	R ²	
4	1.099	0.9983	0.901	0.9998	3.83
5	1.030	0.9980	0.848	0.9985	3.50
6	1.019	0.9993	0.821	0.9981	3.09
7	1.016	0.9997	0.781	0.9949	2.67
8	0.999	0.9995	0.740	0.9935	2.40
9	0.966	0.9989	0.726	0.9912	2.35
10	0.925	0.9987	0.679	0.9909	2.09

As shown in Figure 4.5.6, measured values of $\log G'$ for HA in 0.15 mol.L^{-1} NaCl solution at 25°C increased linearly along with the polymer concentration logarithm ($\log c$). Slopes of the double-logarithmic plot close to value 2 are often observed for biopolymers with a large number of potential binding sites along each chain (i.e. high 'functionality') at concentrations substantially higher than the minimum required for a continuous network formation.³⁰ In this work, the slope was 3.31 which suggests a very coiled polymer with intense intra and intermolecular chain interactions. According to Bozzi *et al.*³¹ these high values are due to an increase in the yield of crosslinks when polymer concentration increases. Xu *et al.*³² found a slope of 3.97 for the A gum, exopolysaccharide produced by *Aeromonas nichidenii* 5797, at 25°C .

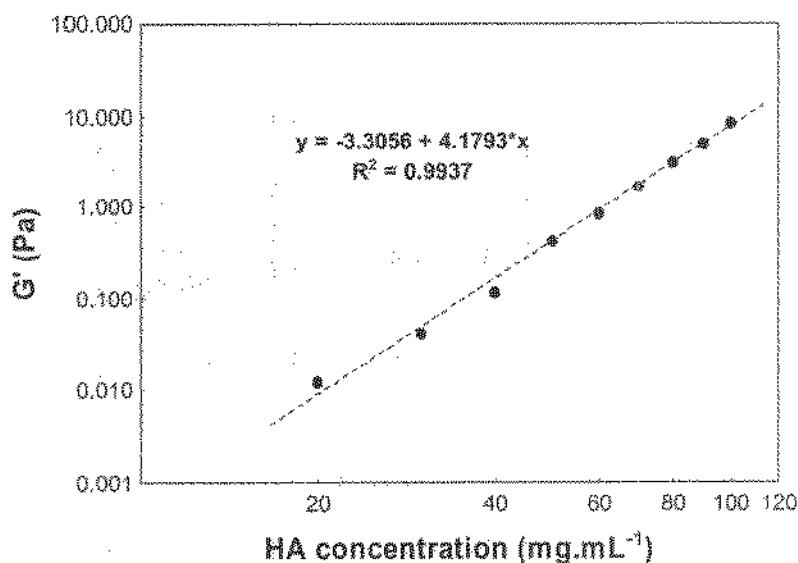


Figure 4.5.6 – Storage modulus (G') concentration dependence for microbial HA in 0.15 mol.L^{-1} NaCl solution at 25°C , measured at frequency of 0.63 rad.s^{-1} .

It is of interest to determine the relationship between the rheological parameters determined from oscillatory tests such as complex viscosity (η^*) and the apparent viscosity (η), from steady shear flow tests.³³ The superimpositions of η and η^* at equal values of frequency (ω) and shear rate ($\dot{\gamma}$) are known as the Cox-Merz rule, defined by equation (1).

$$|\eta^*(\omega)| = \eta(\dot{\gamma} = \omega) \quad (1)$$

This empirical correlation was found to be applicable to fluids with a homogeneous structure, such as random-coil polysaccharide solutions.²⁶ Good superposition of $\eta(\dot{\gamma})$ and $\eta^*(\omega)$ was found only for HA concentration of 40 mg.mL⁻¹, as shown in Figure 4.5.7. Deviations in behavior from theoretical predictions, as observed for the other HA concentrations, occur for biopolymer dispersions with either hyperentanglements (i.e., high density entanglements) or aggregates³⁴ whenever η^* is higher than η at equivalent rates of deformation indicating a tenuous network which remains its integrity under low-amplitude oscillation but is disrupted by continuous shear.³⁵

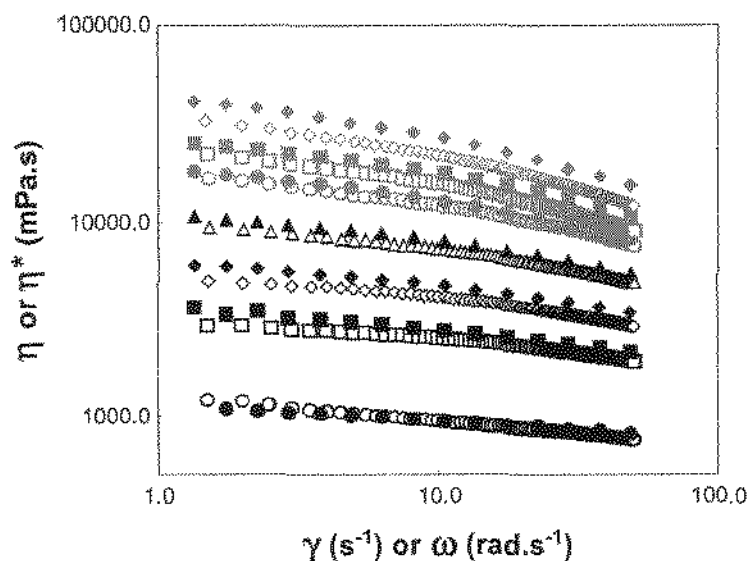


Figure 4.5.7 – Cox-Merz plot of the microbial HA in 0.15 mol.L⁻¹ NaCl solution at 25°C, with various concentrations: (○) 40; (□) 50; (◇) 60; (△) 70; (⊙) 80; (▣) 90; (⊞) 100 mg.mL⁻¹. All concentrations are expressed as mg.mL⁻¹. Open symbol: η ; Closed symbol: η^* .

3.4. The microbial HA conformations

HA conformation was observed through the tapping mode atomic force microscopy (AFM) in air. When deposited on mica and studied under butanol or in air through a thin layer of water

existing on the mica surface, HA has a tremendous tendency to self-associate,^{3,36} forming networks of fibrils and fenestrated structures as may be seen in Figure 4.5.8.

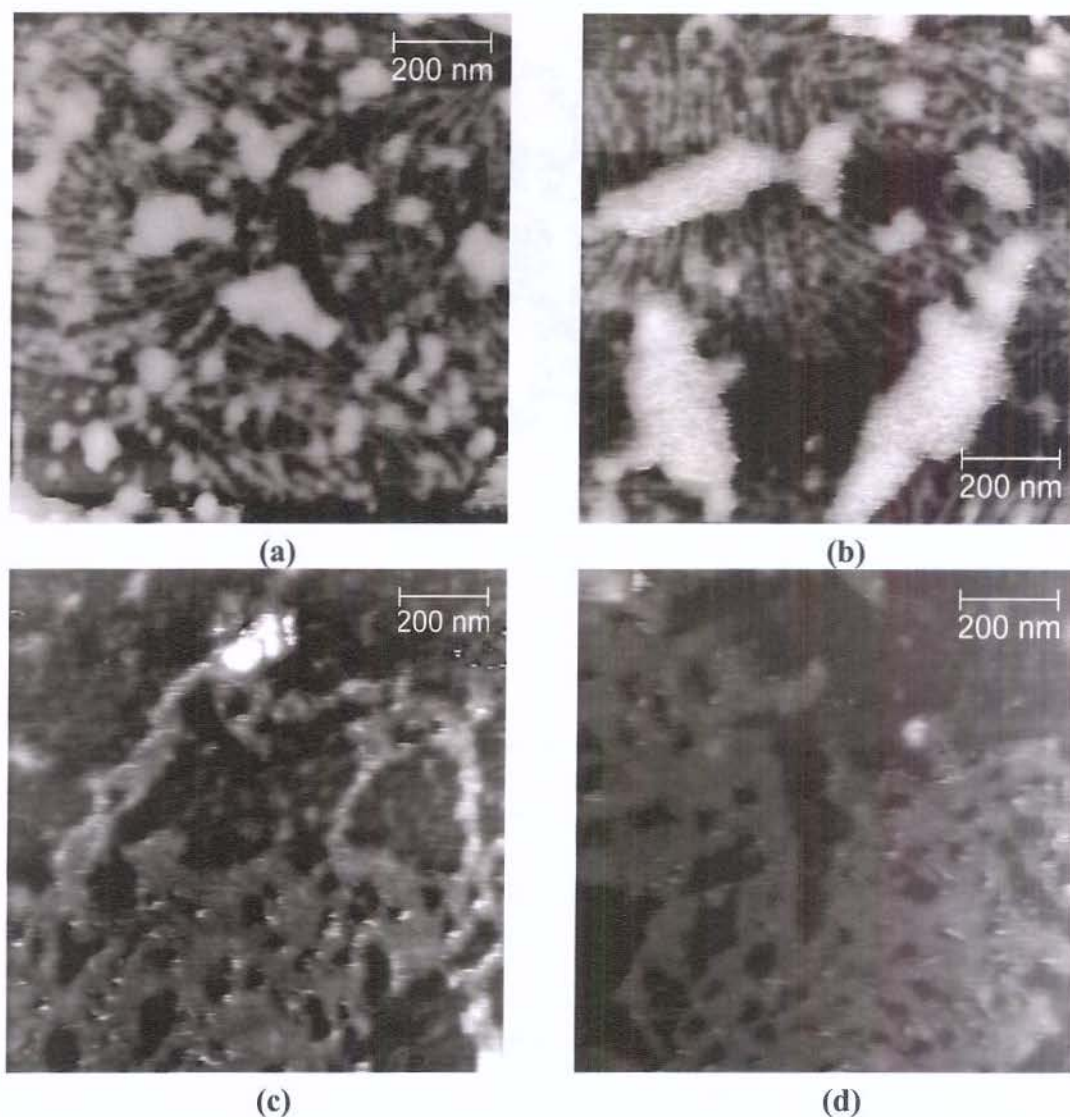


Figure 4.5.8 – Networks formed by microbial HA in $0.01 \text{ mol.L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ solution deposited on mica: (a) c (b) 0.01 mg.mL^{-1} ; (c) c (d) 1.0 mg.mL^{-1} . Height image $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$.

Neither homogeneous networks nor meshes were found within the same sample, which were not related to the deposited solution concentration. As observed by Scott *et al*,² the thickness of the strands increased with the HA concentration (Figure 4.5.8). Large spherical shape clusters of HA chains with diameters of $1.4 \mu\text{m}$ were observed for 0.01 mg.mL^{-1} HA solution (Figure 4.5.9).

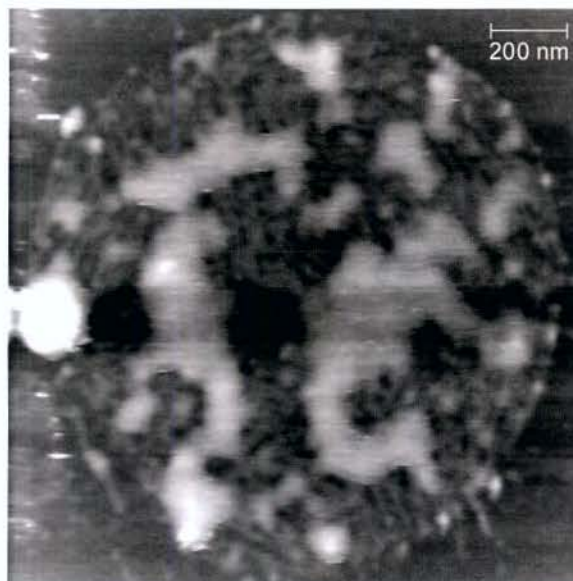


Figure 4.5.9 – Clusters of microbial HA chains observed when 0.01 mg.mL^{-1} HA solution were deposited on mica. Height image $1.5 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$.

4. CONCLUSIONS

The rheological analysis has been a useful tool to explore relationships between mechanical behavior and structure, concentration and molecular weight of the HA produced by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 in cultivation performed at constant pH 7.0 followed by precipitation with ethanol at pH 7.0.

The specific viscosity (η_{sp}) concentration dependence showed behavior similar to most random-coil polysaccharide solutions and polyelectrolytes. Frequency sweeps showed a concentration dependence, with the storage (G') and loss (G'') moduli increasing along with the HA concentration. Estimates out the studied range indicate that the cross-over frequency should decrease with the increasing HA concentration.

The G' slope along with HA concentration was above the c^2 -dependence often observed for biopolymers with high functionality. Regarding the correlation between the rheological parameters determined from oscillatory and steady shear flow tests, the Cox-Merz rule was not

obeyed for the majority of concentrations. Thus, the deviations of the Cox-Merz rule as well as the high G' concentration dependence confirm the high entanglements density of the HA chains. Large spherical shape clusters of chains were observed through AFM even at 0.01 mg.mL^{-1} HA concentrations.

These results contribute to a better understanding of the rheological HA behavior in solution, which is of extreme importance for specific medical and cosmetic applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the CNPq and FAPESP for the financial support and the Investiga Group (Campinas, São Paulo, Brazil) for the maintenance of the bacteria culture. We also thanks Prof. Dr. Edvaldo Sabadini (Institute of Chemistry, University of Campinas) for the permission of the use of rheometer and Prof^a. Dr^a. Mônica Cotta (Institute of Physics, University of Campinas) for the permission of the use of atomic force microscope.

REFERENCES

1. Garg, H. G.; Hales, C. A. Chemistry and biology of hyaluronan; Elsevier: Oxford, 2004; 415-455.
2. Scott, J. E.; Cummings, C.; Brass, A.; Chen, Y. *Biochem J* 1991, 274, 699-705.
3. Cowman, M. K.; Spagnoli, C.; Kudasheva, D.; Li, M.; Dyal, A.; Kanai, S.; Balazs, E. A. *Biophys J* 2005, 88, 590-602.
4. Krause, W. E.; Bellomo, E. G.; Colby, R. H. *Biomacromol* 2001, 2, 65-69.
5. Gómez-Alejandre, S.; Sánchez, E.; Abradelo, C.; Rey-Stolle, M. F.; Hernández-Fuentes, I. *Int J Biol Macromol* 2000, 27, 287-290.
6. Gatej, I.; Popa, M.; Rinaudo, M. *Biomacromol* 2005, 6, 61-67.
7. Cowman, M. K.; Li, M.; Dyal, A.; Kanai, S. In: *Hyaluronan*; Kennedy, J. J.; Phillips, G. O.; Williams, P. A., Eds. Woodhead Publishing, Cambridge, 2002; 109-116.
8. Hascall, V. C.; Laurent, T. C. In: *Science of hyaluronan today*; Hascall, V. C.; Yanagishita, M., Eds. Seikagaku Corp.: Tokyo, 1997. Available at: www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronanE.html.
9. Cowman, M. K.; Matsuoka, S. In: *Hyaluronan*; Kennedy, J. J.; Phillips, G. O.; Williams, P. A., Eds. Woodhead Publishing, Cambridge, 2002; 75-79.
10. Gribbon, P.; Heng, B. C.; Hardingham, T. E. *Biochem J* 2000, 350, 329-335.
11. Balazs, E. A.; Gibbs, D. A. In: *Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix*; Balazs, E. A., Ed. Academic Press: London, 1970; 1241-1253.
12. Armstrong, D. C.; Johns, M. R. *Appl Environ Microbiol* 1997, 63, 2759-2764.
13. Maltese, A.; Borzacchiello, A.; Mayol, L.; Bucolo, C.; Maugeri, F.; Nicolais, L.; Ambrosio, L. *Biomaterials* 2006, 27, 5134-5142.

14. Kelly, M. A.; Kurzweil, P. R.; Moskowitz, R. W. *Am J Orthop* 2004, 33, 15-22.
15. Kanchwala, S. K.; Holloway, L.; Bucky, L. P. *Ann Plast Surg* 2005, 55,30–35.
16. Esposito, E.; Menegatti, E.; Cortesi, R. *Int J Pharm* 2005, 288, 35–49.
17. Falcone, S. J.; Palmeri, D. M.; Berg., R. A. *J Biomed Mater Res* 2006, 76A, 721-728.
18. Chamberlain, E. K.; Rao, M. A. *Food Hydrocoll* 2000, 14, 163–171.
19. Hill, A.; Carrington, S. *Am Lab* 2006, 38, 22-24.
20. Ambrosio, L.; Borzacchiello, A.; Netti, P. A.; Nicolais, L. *J Macromol Sci, Pure Appl Chem* 1999, A36 (7,8), 91-1000.
21. Dische, Z. *J Biol Chem* 1946, 167, 189-198.
22. Balke, S.; Hamielec, A.; Leckair, B.; Pearce, S. *Ind Eng Chem Prod Res Dev* 1969, 8, 54-57.
23. Stoscheck, C. M. *Methods Enzymol* 1990,182, 50-68.
24. Rangaswamy, V.; Jain, D. *Biotechnol Lett* 2008, 30,493–496.
25. Macosko, C. W. *Rheology. Principles, Measurements and Applications*; VCH Publishers: New York, 1994.
26. Morris, E. R.; Cutler, A. N.; Ross-Murphy, S. B.; Rees, D. A.; Price, J. *Carbohydr Polym* 1981, 1, 5–21.
27. Mo, Y.; Takaya, T.; Nishinari, K.; Kubota, K.; Okamoto, A. *Biopolymers* 1999, 50, 23–34.
28. Steffe, J. F. *Rheological methods in food engineering*; Freeman Press: Michigan, 1996. .1-91
29. Rwei, S. P.; Chen, S. W.; Mao, C. F.; Fang, H. W. *Biochem Eng J* 2008, 40, 211–217.
30. Hember, M. W. N.; Morris, E. R. *Carbohydr Polym* 1995, 27, 23-36.
31. Bozzi, L.; Milas, M.; Rinaudo, M. *Int J Biol Macromol* 1996, 18, 83-91.
32. Xu, X.; Liu, W.; Zhang, L. *Food Hydrocoll* 2006, 20, 723–729.

33. Lopes Da Silva, J. A.; Rao, M. A. In: Food polysaccharides and their applications; Stephen, A. M.; Williams, P. A., Eds. 2nd ed. Marcel Dekker: New York, 2006.
34. Yoo, B.; Yoo, D.; Kim, Y. R.; Lim, S. T. Food Sci Biotechnol 2003, 12, 316-319.
35. Chronakis, I. S.; Kasapis, S. In: Food flavors: Generation, analysis and process influence; Charalambous, G., Ed. Elsevier: Amsterdam, 1995; 75–109.
36. Jacoboni, I.; Valdrè, U.; Mori, G.; Quaglino Jr., D.; Pasquali-Ronchetti, L. J. J Struct Biol 1999, 126, 52–58.

4.6. AVALIAÇÃO DE DERIVADOS AGROINDUSTRIAIS COMO COMPONENTES DO MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO MICROBIANA DE ÁCIDO HIALURÔNICO

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“BIORESOURCE TECHNOLOGY”

MICROBIAL PRODUCTION OF HYALURONIC ACID FROM AGRICULTURAL RESOURCE DERIVATES

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

Laboratory of Development of Biotechnological Processes
School of Chemical Engineering, P.O.Box 6066
University of Campinas-UNICAMP
13083-970, Campinas-SP, Brazil

ABSTRACT – Agricultural resources derivatives (ARD) such as hydrolysate soy protein concentrate (HSPC), whey protein concentrate (WPC), and cashew apple juice (CAJ) were studied for the production of hyaluronic acid (HA) by *Streptococcus zooepidemicus*. The supplementation of the media with corn steep liquor (CSL) was also evaluated. Synthetic medium containing glucose and yeast extract was used as a control. The ARD were promising for the production of HA. The CAJ produced the highest amount of HA (0.89 g.L^{-1}), similar to the control (0.86 g.L^{-1}), followed by the HSPC (0.17 g.L^{-1}) and WPC (0.10 g.L^{-1}). The CSL did not influence the production of HA when the HSPC and WPC were used. However, in the synthetic medium it duplicated the yield coefficient of the product related to glucose. The average molecular weight of the HA ranged from 10^3 to 10^4 Da for ARD and it was 10^7 Da for the synthetic medium.

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

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

1. INTRODUCTION

The hyaluronic acid (HA) is a linear polysaccharide with high molecular weight composed of disaccharides units of D-glucuronic acid (GlcUA) and N-acetylglucosamine (GlcNAc) joined alternately by β -1-3 and β -1-4 glycosidic bonds (Chong *et al.*, 2005). Due to its high viscoelasticity and ability of the polymer to retain large volumes of water, HA has significant applications in the cosmetic and medical industries (Armstrong and Johns, 1997). The final products containing HA present high aggregated value ranging from US \$ 2,000 to 60,000/kg in the above mentioned applications.

Traditionally, HA is produced by the extraction of animal tissues, mainly rooster combs. The microbial production of HA has become increasingly attractive for large-scale production due to the limited animal tissue sources, the risk of viral contamination and high costs on the recovery and purification, involved in the HA from animal sources. (Cooney *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2006). Furthermore, the production of HA by the fermentation process allows the optimization of the product yield and quality through genetic engineering and the control of the culture conditions (Armstrong and Johns, 1997).

The most frequent bacteria used in the industrial production of HA are Lancefield group A and C streptococci. These bacteria are nutritionally fastidious microorganisms which require complex nutrients due to their limited ability to synthesize specific amino acids and B-vitamins (Fitzpatrick and O'Keeffe, 2001; Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000). Additionally there is the nutritional requirement with respect to organic nitrogen, which also supplies a large proportion of carbon for the cellular biosynthesis (Armstrong *et al.*, 1997).

In general, the culture media used for the microbial production of HA contain glucose as a carbon source (Akasaka *et al.*, 1989; Armstrong *et al.*, 1997; Armstrong and Johns, 1997; Chong and Nielsen, 2003; Cooney *et al.*, 1999; Johns *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1996), appreciable amounts of complex nitrogen sources like yeast extract, peptones, casein hydrolysate, beyond growth factors such as magnesium and phosphates (Armstrong *et al.*, 1997).

The needs of a sustainable society and the political priorities have showed the use of renewable resources such as agricultural ones, which can be converted into bioenergy or valuable bioproducts (Angenent *et al.*, 2004). These aspects have encouraged the studies using alternative media for fermentation processes. Moreover, these agricultural resources have low cost and allow the production of valuable main components and supplements of culture media which are metabolized as carbon and energy sources, due to microbial ability (Thomsen, 2005).

Considering this context, the objective of this work was to evaluate main components or supplements of culture media obtained from agricultural resources derivatives (ARDs), for the microbial production of HA. The evaluated agricultural main components were the hydrolysate soy protein concentrate (HSPC), the whey protein concentrate (WPC) and the cashew apple juice (CAJ). The corn steep liquor (CSL) was also evaluated as a supplement. They were selected based on the amino acids requirements of the *Streptococcus zooepidemicus*, as described by Armstrong *et al.* (1997), as well as on the qualitative and quantitative variability of amino acids in the different sources (Cardinal and Hedrick, 1948; Kreider, 2004; Sgarbieri *et al.*, 1999).

2. MATERIAL AND METHODS

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

2.2. Culture Maintenance and Inoculum Preparation. The stock culture was maintained frozen in Brain Heart Infusion (BHI) broth containing 10% glycerol and glass beads. The inoculum was prepared in two steps: initially five glass beads were transferred to tubes containing 5 mL of the culture medium and incubated at 37°C for 24 hours. Later on, the medium from the tube was transferred to 125 mL Erlenmeyer flasks, containing 40 mL of the fresh culture medium, and incubated under reciprocal shaking at 150 rpm, 37°C, during 10 h. In all the cases, the same media were used in the two steps of the inoculum preparation and in the fermentations.

2.3. Culture Media

2.3.1. Synthetic medium. The composition of the synthetic medium used as a control was based on the composition proposed by Swann *et al.* (1990), presented in the Table 4.6.1.

Table 4.6.1 – Composition of the synthetic medium used as a control.

Component	Concentration (g.L ⁻¹ deionized water)
Glucose	45.0
Yeast extract	60.0
K ₂ SO ₄	1.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0
Na ₂ SO ₄ .12H ₂ O	0.2
CaCl ₂ .2H ₂ O	5.0*
FeSO ₄ .7H ₂ O	5.0*
MnSO ₄ .4H ₂ O	1.0*
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1.0*
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1*
H ₃ PO ₄	1.0 mL
pH 7.5	
* mg.L ⁻¹ deionized water	

2.3.2. ARDs media. The studied culture media based on ARDs were composed by HSPC, WPC or CAJ as main components and the CSL as a supplement, which were given as gifts by the following Brazilian industries: the WPC from Tangará *Dairy Industries* (Vila Velha, Espírito

Santo, Brazil), the soy flakes and the CSL from Caramuru Alimentos S.A. (São Simão, Goiás, Brazil), the cashew apple from CAJU GAIA (Itaueira Agropecuária S/A, Russas, Ceará, Brazil) at harvesting season.

The main components of the medium were obtained from the ARDs, applying the following procedures: the HSPC was prepared with soy flakes through the acid extraction according to the methodology described by Johnson (1999); the HSPC was obtained by enzymatic hydrolysis using pepsin as described by Fan *et al.* (2005); the WPC was used with no previous treatment; the CAJ was extracted by the mechanical pressing of its pulp.

The total nitrogen of the main components and the supplement were determined by the Kjeldahl method (AOAC, 1995), and the glucose was quantified using a glucose oxidase commercial kit (LABORLAB Ltda, Guarulhos, São Paulo, Brazil). Aiming to have the glucose:nitrogen ratios similar to the synthetic medium one, the concentrations of the total nitrogen and glucose were adjusted in the various culture media, by addition of anhydrous glucose and yeast extract. The salts were added at the same concentrations to the various media, including the control, and afterwards the pH was adjusted to 7.5. Table 4.6.2 shows the qualitative compositions of the evaluated culture media.

2.4. Fermentation. The fermentations were carried out in batches, using 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of the evaluated medium, which were maintained under reciprocal shaking, 37°C, at 150rpm during 24 hours. The media were inoculated with 10% v/v. The fermentations were conducted in duplicate and the pH, cell mass, HA and glucose concentrations were determined for each flask at the initial and final times. The analyses were performed in triplicate.

Table 4.6.2 – Qualitative composition of the synthetic (1,2) and ARDs (3-8) media.

Medium	Carbon Source	Nitrogen Source	Supplementation
1	Glucose	Yeast extract	Salts
2	Glucose	Yeast extract	Salts and corn steep liquor (CSL)
3	Glucose	Whey protein concentrate (WPC)	Salts
4	Glucose	Whey protein concentrate (WPC)	Salts and corn steep liquor (CSL)
5	Glucose	Hydrolisate soy protein concentrate (HSPC)	Salts
6	Glucose	Hydrolisate soy protein concentrate (HSPC)	Salts and corn steep liquor (CSL)
7	Cashew apple juice (CAJ)	Yeast extract	Salts
8	Cashew apple juice (CAJ)	Yeast extract	Salts and corn steep liquor (CSL)

2.5. Analytical Methods

2.5.1. Cell growth. The cell growth was determined by cell dry weight according to the gravimetric method.

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

2.5.3. HA concentration Initially the fermented medium was centrifuged at 3200 rpm during 20 minutes. The cell free supernatant was treated with ethanol in a proportion 1.5:1 v/v ethanol: supernatant. The solution was cooled down, remaining at 4°C during 1 hour for the precipitation of HA. The precipitated HA was redissolved in a 0,15 mol.L⁻¹ sodium chloride solution. Three steps of precipitation and redissolution were performed to increase the yield of precipitated HA. The HA concentration was determined by the carbazol reagent (Dische, 1946).

2.5.4. HA molecular weight. The average molecular weight of HA was determined by size exclusion chromatography. It was used a Shimadzu chromatography system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), containing a (35 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P column guard (Phenomenex, Torrance, California, USA) mounted in series with a (300 x 7.8 mm) Polysep-GFC-P6000 column of the gel filtration (Phenomenex, Torrance, California, USA) and a refraction index detector. (Shimadzu RID-6A). The analysis conditions were: injected sample of 20 μL , sodium nitrate 0.1 mol.L^{-1} as the mobile phase, flow rate of 1.0 mL.min^{-1} and 25°C temperature, as suggested by the column manufacturer. The dextrane (American Polymer Standards, Mentor, Ohio, USA) with molecular weight ranging from 10^3 to 10^6 Da was used as a standard for the calibration curve as described by Balke *et al.* (1969).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Total nitrogen and glucose in the agricultural resources derivatives (ARDs)

The total nitrogen and glucose concentrations in the ARDs used as main components and supplement in the media as well as in the yeast extract used as a nitrogen source in the control medium, are showed in Table 4.6.3.

Based on the results of Table 4.6.3, the total nitrogen and glucose concentrations were adjusted to 45.0 g.L^{-1} glucose and 5.8 g.L^{-1} total nitrogen, in order to have similar ratios in the various media (7.8:1 glucose:nitrogen). The CSL was used only as a supplement (10% v/v), due to its low total nitrogen concentration (0.07% p/v). Moreover, the CSL also contains appreciable amounts of B-vitamin and valuable mineral nutrients such as calcium, magnesium, phosphorous, potassium and iron (Liggett and Koffler, 1948). The low total nitrogen content in the CAJ required an additional supplementation with yeast extract, to reach the glucose:nitrogen ratio.

Table 4.6.3 – Total nitrogen and glucose concentrations in the agricultural resources derivatives and in the yeast extract used in the culture media.

Agricultural Resources Derivates	Total Nitrogen (%)	Glucose (g.L ⁻¹)
Yeast extract*	10.11 ± 1.33	0.44 ± 0.01
Cashew apple juice (CAJ)**	0.04 ± 0.00	47.40 ± 0.74
Whey protein concentrate (WPC)*	11.91 ± 0.13	0.61 ± 0.00
Corn steep liquor (CSL)**	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.02
Hydrolysate soy protein concentrate (HSPC)**	0.58 ± 0.01	0.08 ± 0.01

* % (w/w); ** % (w/v).

3.2. Comparative analysis of the fermentations

The results from the fermentations are presented in Tables 4.6.4 and 4.6.5 for the non-supplemented and supplemented CSL media, respectively. The data compare the performance of the fermentations in terms of cell growth, production of HA, HA:glucose yield coefficient and the average molecular weight of the HA produced.

Table 4.6.4 – Cell growth, HA production, HA:glucose yield coefficient and HA average molecular weight using non-supplemented ARDs media.

ARDs Media	Cell Growth (g.L ⁻¹)	HA Production (g.L ⁻¹)	Y _{HA/S} (g HA.g glucose ⁻¹)	HA average molecular weight (Da)
Synthetic (control)	0.77 ± 0.08	0.86 ± 0.06	0.10 ± 0.04	(3.77 ± 0.19)×10 ⁷
Whey protein concentrate (WPC)	41.63 ± 0.04	0.10 ± 0.00	0.01 ± 0.00	(2.20 ± 0.02)×10 ³
Hydrolysate soy protein concentrate (HSPC)	2.31 ± 0.29	0.17 ± 0.03	0.01 ± 0.00	(2.09 ± 0.03)×10 ³
Cashew apple juice (CAJ)	1.39 ± 0.10	0.89 ± 0.02	0.09 ± 0.01	(1.84 ± 0.13)×10 ⁴

Y_{HA/S} – HA:glucose yield coefficient.

Table 4.6.5 - Cell growth, HA production, HA:glucose yield coefficient and HA average molecular weight using the CSL supplemented ARDs media.

ARDs Media	Cell Growth (g.L ⁻¹)	HA Production (g.L ⁻¹)	Y _{HA/S} (g HA.g glucose ⁻¹)	HA average molecular weight (Da)
Synthetic (control)	0.73 ± 0.12	0.84 ± 0.07	0.24 ± 0.05	(3.98 ± 0.46) × 10 ⁷
Whey protein concentrate (WPC)	40.20 ± 0.00	0.13 ± 0.02	0.01 ± 0.00	(2.33 ± 0.04) × 10 ³
Hydrolysate soy protein concentrate (HSPC)	2.65 ± 0.10	0.17 ± 0.02	0.01 ± 0.01	(2.12 ± 0.02) × 10 ³
Cashew apple juice (CAJ)	0.33 ± 0.06	0.85 ± 0.05	0.05 ± 0.01	(1.92 ± 0.09) × 10 ⁴

Y_{HA/S} – HA:glucose yield coefficient.

Analyzing the data from Tables 4.6.4 and 4.6.5 we observe that the evaluated ARDs media increased the cell growth compared to the control medium, except for the CAJ supplemented with CSL, in which the cell growth (0.33 g.L⁻¹) was half of the control medium (0.73 g.L⁻¹). The highest cell mass values were obtained using the WPC media, which were about 50 times higher than the control medium.

The production of HA was close to the control for the CAJ medium only. The WPC and HSPC were also effective in the HA production however, lower concentrations were obtained compared to the control. In all the cases, the HA production was independent from the CSL supplementation, and the higher the cell growth the lower was the HA production. The last behavior is in accordance with the inverse relation between the growth rate and specific productivity of HA described by Armstrong (1997). The production of HA and cell mass synthesis really compete with the same energy sources from the culture medium. In the case of HA production from the CAJ medium, the higher production is not related to the supplementation

with yeast extract only. According to Amrane and Pringent (1994), the main contributions of the yeast extract to the HA production are the purine and pyrimidine bases and the B-vitamins which are essential to the streptococci cultivation. The CAJ also contains B-vitamins, mainly thiamin, riboflavin, niacin and folic acid (Sancho, 2006), which are beneficial to HA production. The B-vitamin content in cultivation medium seems to be an important requirement for the *Streptococcus zooepidemicus* growth and production of HA.

The HA: glucose yield coefficient ($Y_{P/S}$) obtained from the non-supplemented CSL medium CAJ was closer to the control media than the HSPC and WPC media (Table 4.6.4). The CSL supplementation duplicated the $Y_{P/S}$ of the control medium as well as reduced to the half the $Y_{P/S}$ from the CAJ medium, compared to the non-supplemented medium (Tables 4.6.4 and 4.6.5). The supplementation did not affect the $Y_{P/S}$ of the other evaluated media. Although the CSL supplementation had any influence on the HA produced amount, the effect on the $Y_{P/S}$ of the control medium is due to the increment of the nutrients provided by the supplementation, reducing the consumption of glucose. In the case of the CAJ medium, both the cell growth and $Y_{P/S}$ were strongly reduced. This behavior may be related to a disturbance of the electrolytic and osmotic equilibrium inside the cells, imparted by the excess of minerals in the medium. The equilibrium disturbance demands a higher glucose consumption in consequence of the higher energy requirement for the cell maintenance compared to non-disturbed cells.

The high concentrations of minerals such as calcium, sodium, manganese and zinc have been identified in CAJ (Soares *et al.*, 2004), yeast extract (Sgarbieri, 1999) and CSL (Kampen, 1997; Liggett e Koffler, 1948). Among the minerals, the calcium concentration in the CAJ juice supplemented with CSL is 5 times higher than the non-supplemented medium. Furthermore, that calcium concentration level is 69 times higher than the level recommended by Swann *et al.*

(1990) for the supplementation of our control media. Although specific studies on the influence of mineral nutrients on the *Streptococcus zooepidemicus*' growth and HA production are still scarce in the literature, the various biological functions of minerals in the cells, such as on the vitamin synthesis, the transport through the membranes and as enzyme cofactors in several reactions are well known (Kampen, 1997).

Tables 4.6.4 and 4.6.5 also show that the CSL supplementation did not have influence on the average molecular weight of the HA produced. However, the average molecular weight of the HA produced from the ARDs media was four magnitude order lower ($10^3 - 10^4$ Da) than the control medium (10^7 Da). In the case of the CAJ medium, its C-vitamin content may be influencing the decrement of the average molecular weight due to HA depolymerization, as reported by Liu *et al.* (2009) for the ascorbate influence.

4. CONCLUSIONS

From the experimental results we conclude that the studied ARDs are promising media for the production of HA in the range of 10^3 a 10^4 Da average molecular weight. Among the ARDs, the highest HA production was obtained from the CAJ, in spite of its required supplementation with yeast extract. The WPC and HSPC media were the most effective for the production of biomass. The CSL supplementation did not influence the HA production from the various media. However, it had influence on the glucose consumption, duplicating the HA:glucose yield coefficient for the control medium and reducing it for the CAJ medium.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- Akasaka, H., Komasaki, H., Arai, T., 1989. Fermentation method for producing hyaluronic acid. United States Patent: 4,801,539.
- Amrane, A., Prigent, Y., 1994. Lactic acid production from lactose in batch culture: analysis of the data with the help of a mathematical model; relevance for nitrogen source and preculture assessment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40 (5), 644– 649.
- Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wrenn, B.A., Espinosa, R.D., 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* 22 (9), 477-485.
- AOAC - Association Of Official Agricultural Chemists., 1995. Official Methods of Analysis, 16.ed. Washington, D.C.
- Armstrong, D.C. The molecular weight properties of hyaluronic acid produced *Streptococcus zooepidemicus*. 1997. Queensland: University of Queensland, 1997. (PhD. Thesis). In: CHONG, B.F., BLANK, L.M., McLAUGHLIN, R., NIELSEN, L.K., 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 341-351.
- Armstrong, D.C., Cooney, M.J., Johns, M.R., 1997. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 309–312.
- Armstrong, D.C., Johns, M.R., 1997. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (7), 2759-2764.
- Balke, S., Hamielec, A., Leckair, B., Pearce, S., 1969. Gel permeation chromatography. calibration curve from polydisperse standards. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 8, 54-57.

- Cardinal, E.V., Hedrick, L.R., 1948. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. *J. Biol. Chem.* 172, 609-612.
- Chong, B.F., Blank, L.M., McLaughlin, R., Nielsen, L.K., 2005. Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 341-351.
- Chong, B.F., Nielsen, L.K., 2003. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Biotechnol.* 100, p. 33-41.
- Cooney, M.J., Goh, L.-T., Lee, P. L., Johns, M. R., 1999. Structured model-based analysis and control of the hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: physiological implications of glucose and complex-nitrogen-limited growth. *Biotechnol. Prog.* 15, p. 898-910.
- Dische, Z., 1946. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.* 167, 189-198.
- Fan, J., Saito, M., Yanyan, Z., Szesze, T., Wang, L., Tatsumi, E., Li, L., 2005. Gel-forming ability and radical-scavenging activity of soy protein hydrolysate treated with transglutaminase. *J. Food Sci.* 70 (1), C88-C92.
- Fitzpatrick, J.J., O'Keeffe, U., 2001. Influence of whey protein hydrolyzate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. *Process Biochem.* 37, 183-186.
- Gao, H.J., Du, G.C., Chen, J., 2006. Analysis of metabolic fluxes for hyaluronic acid (HA) production by *Streptococcus zooepidemicus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (4), 399-408.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hagerdal, B., 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 87– 107.
- Johns, M.R., Goh, L.T., Oeggerli, A., 1994. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biotechnol. Letters.* 16 (5), 507-512.

- Johnson, L.A. Process for producing improved soy protein concentrate from genetically-modified soybeans. United States Patent n. 5,936,069, 1999.
- Kampen, W.H. Nutritional Requirements in Fermentation Processes. In: Vogel, H.C. Todaro, C.L. Fermentation and Biochemical Engineering Handbook, 2 ed. Noyes Publication, Westwood, New Jersey, 1997.
- Kim, J., Yoo, S., Oh, D., Kweon, Y., Park, D., Lee, C., Gil, G., 1996. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. Enzyme Microb. Technol. 19, 440-445.
- Kreider, R.B. Whey proteins and seniors nutrition. Applications Monograph -Seniors Nutrition, p. 1-8, 2004.
- Ligget, R.W., Koffler, H., 1948. Corn steep liquor in microbiology. Bacteriol. Rev. 12, 297-311.
- Liu, L., Du, G., Chen, J., Zhu, Y., Wang, M., Sun, J., 2009. Microbial production of low molecular weight hyaluronic acid by adding hydrogen peroxide and ascorbate in batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. Biores. Technol. 100, 362-367.
- Sancho, S.O. Efeito do processamento sobre características de qualidade do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). 2006. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2006. (Dissertação de mestrado).
- Sgarbieri, V.C., Alvim, I.D., Vilela, E.S.D., Baldini, V.L.S., Bragagnolo, N., 1999. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. Braz. J. Food Technol. 2, 119-125.
- Soares, L.M.V., Shishido, K., Moraes, A.M.M., Moreira, V.A., 2004. Composição mineral de sucos concentrados de frutas brasileiras. Ciênc. Tecnol. Aliment. 24 (2), 202-206.

- Swann, D. A., Sullivan, B. P., Jamieson, G., Richardson, K. R., Singh, T., 1990. Biosynthesis of hyaluronic acid. United States Patent: 4,897,349.
- Thomsen, M.H., 2005. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 598-606.
- Zhang, F., Ding, X., Yang, L., Kong, Z., 2006. A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 168-172.

5. CONCLUSÕES

Do estudo realizado no presente trabalho, conclui-se que as condições ambientais otimizam a produção do HA por *Streptococcus zooepidemicus* e a sua massa molar. A descrição das alterações metabólicas decorrentes das perturbações ambientais permite um maior entendimento do metabolismo, fisiologia e mecanismos de regulação da célula.

As conclusões abaixo referem-se aos aspectos específicos abordados neste trabalho:

1. Na faixa de concentração inicial de glicose estudada, a maior produção de HA ($1,21 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida no cultivo realizado em bioreator, com 25 g.L^{-1} glicose e sem controle do pH do meio ao longo do cultivo;

2. O controle do pH (7,0) do meio ao longo do cultivo aumentou a produtividade de células e HA mas não seus rendimentos em relação à glicose.

3. A análise de fluxos metabólicos demonstrou que o aumento do fluxo através da hialuronato sintase está mais relacionado à disponibilidade dos açúcares precursores que ao estado energético e potencial redutor das células.

4. As propriedades reológicas do polímero com baixo teor de proteína ($0,44 \text{ mg.g}^{-1}$) e alta massa molar ($4.0 \times 10^6 \text{ Da}$) confirmam a alta densidade de emaranhamento das cadeias poliméricas.

5. A qualidade do polímero produzido pode ser modulada pela suplementação do meio complexo com íons minerais.

6. A utilização de meios alternativos contendo derivados agroindustriais demonstrou que maiores concentrações de HA foram produzidas em meios contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio orgânico.

Assim, para maior produtividade de HA, o cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* deve ser realizado com controle de pH, empregando-se extrato de levedura como fonte de nitrogênio orgânico. A definição dos íons minerais a serem empregados na suplementação do meio depende da massa molar desejada para o polímero. Para o cultivo com controle de pH, concentrações iniciais de glicose maiores que 25 g.L^{-1} podem ser empregadas.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Estudo detalhado das respostas das células de *Streptococcus zooepidemicus* a “stress” ácido, antes e durante o cultivo;
2. Estudo de condições de “stress” de menor custo como o “stress” salino;
3. Estudo da suplementação do meio com água de maceração de milho em cultivos realizados em biorreator;
4. Estudo da superexpressão das enzimas envolvidas na síntese dos precursores UDP-ácido glicurônico e N-acetilglicosamina;
5. Estudo do efeito do pH do meio de cultivo na precipitação com etanol;
6. Estudo de cultivos realizados com substratos marcados com ^{13}C .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBE, K., TAKAHASHI, S., YAMADA, T. Involvement of oxygen-sensitive pyruvate-formate-lyase in mixed acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. *J. Bacteriol.*, v.152, p.175-182, 1982.
- ADAM, N., GHOSH, P. Hyaluronan molecular weight and polydispersity in some commercial intra-articular injectable preparations and in synovial. *Inflammation Res.*, 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.
- AKASAKA, H.; SUSUMU, S.; YANAGI, M.; FUKUSHIMA, S.; MITSUI, T.. *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, v.22, p.35-42, 1988.
- ARMSTRONG, D.C. *The molecular weight properties of hyaluronic acid produced Streptococcus zooepidemicus*. Queensland: University of Queensland, 1997. (PhD. Thesis).
- ARMSTRONG, D.C., COONEY, M.J., JOHNS. M.R. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.47, p.309-312, 1997.
- ARMSTRONG, D.C., JOHNS. M.R. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, v.63, n.7, p.2759-2764, 1997.
- BALAZS, E.A., LAURENT, T.C. Viscosity function of hyaluronic acid as a polyelectrolyte. *J. Polym. Sci.*, v.6, p.665-667, 1951.
- 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.
- BLANK, L.M., MCLAUGHLIN, R.L., NIELSEN, L.K. Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. *Biotechnol. Bioeng.*, v.90, n.6, p.685-693, 2005.

- BONARIUS, H.P.J., SCHMID, G., TRAMPER, J. Flux analysis of underdetermined metabolic networks: the quest for the missing constraints. *Trends in Biotechnol.*, v.15, p.308-314, 1997.
- BROWN, K. K., RUIZ, L. C., RINJ, I. *Ultrapure hyaluronic acid and method of making it*. United States Patent n. 4,782,046, 1988.
- BURY, D., JELEN, P., KIMURA, K. Whey protein concentrate as a nutrient supplement for lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.*, v.8, n.2, p.149-151, 1998.
- CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; SGARBIERI, V.C. Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. *J. Sci. Food Agric.*, v.80, p.341-351, 2000.
- CARDINAL, E.V., HEDRICK, L.R., 1948. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. *J. Biol. Chem.*, v.172, p.609-612.
- CHAN, R.W.; GRAY, S.D.; TITZE, L.R. The importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics. *Otolaryngology Head Neck Surgery*, v. 124, p.607-614, 2001.
- CHEN, S.J., CHEN, J.L., HUANG, W.C., CHEN, H.L. Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. *Korean J. Chem. Eng.* v.26, n.2, p.428-432, 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. *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*. *J. Biotechnol.*, v.100, p.33-41, 2003.
- CHRONAKIS, I.S.; KASAPIS, S. Food applications of biopolymers – theory and practice. In: CHARALAMBOUS, G. (Ed.) *Food flavors: generation, analysis and process influence*. Elsevier Science Publ. B.V., Amsterdam, The Netherlands (1995), pp. 75-108.

CLELAND, R.L. Iic polysaccharides. II. Comparison of polyelectrolyte behavior of hyaluronate with that of carboxymethyl cellulose. *Biopolymers*, v. 6, n.11, p.1519-1529, 1968.

COONEY, M.J., GOH, L.-T., LEE, P. L., JOHNS, M. R. Structured model-based analysis and control of the hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: physiological implications of glucose and complex-nitrogen-limited growth. *Biotechnol. Prog.*, v.15, p.898-910, 1999.

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

DEANGELIS, P.L. Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases. *Glycobiology*, v. 12, n. 1, p. 9R-16R, 2002.

DUAN, X.J., NIU, H.X., TAN, W.S., ZHANG, X. Mechanism analysis of effect of oxygen on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v.19, n.3, p.299-306, 2009.

EDMOND, M.E.; FOSTER, A.V. Diabetic foot ulcers. *British Med Journal*, v.332, p.407-410, 2006.

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

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

ESPOSITO, E.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R. Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. *Int. J. Pharm.*, v. 288, p.35-49, 2005.

FACKLAM, R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.15, n.4, p.613-630, 2002.

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

GAO, H.J., DU, G.C. and CHEN, J. (2006) Analysis of metabolic fluxes for hyaluronic acid (HA) production by *Streptococcus zooepidemicus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* v.22, n.4, p.399-408.

GOMBERT, A.K., NIELSEN, J. Mathematical modelling of metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* v.11, p.180–186, 2000.

GOMBERT, A.K., SANTOS, M.M., CHRISTENSEN, B., NIELSEN, J. Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *J. Bacteriol.*, v.183, n.4, p.1441-1451, 2001.

GONÇALVES, V.M.; ZANGIROLANI, T.C.; GIORDANO, R.L.C.; RAW, L; TANIZAKI, M.M.; GIORDANO, R.C. Optimization of medium and cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.59, p.713-717, 2002.

GREENBERG D.D., STOKER A., KANE S., COCKRELL M., COOK J.L. Biochemical effects of two different hyaluronic acid products in a co-culture model of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.*, v.14, p.814–822, 2006.

GURNY, R.; IBRAHIM, H.; AEBI, A.; BURI, P.; WILSON, C.G.; WASHINGTON, N.; EDMAN, P.; CAMBER, O.J. *Control. Release*, v.6, p.367, 1987.

HARDINGHAM, T. Solution properties of hyaluronan. In: GARG, H.G.; HALES, C.A. (Eds) *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2004. p.1-19.

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>>.

HOLMS, W.H. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr. Top. Cell. Regul.*, v. 28, p. 69-105, 1986.

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

HUANG, W.C., CHEN, S.J. and CHEN, T.L. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v.32, p.239-243, 2006.

IQBAL, Z.; MIDGLEY, J.M.; WATSON, D.G.; KARDITSAS, S.D.; DUTTON, G.N.; WILSON, W. Determination of molecular weight of hic acid in bovine vitreous humour ad Healon® by high performance gel permeation chromatography and its depolymerization with ascorbic acid. *Pharm. World Sce*, v.19, n.5, p.246-250, 1997.

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

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.49, p.209-224, 1983.

KENDALL, F.E., HEIDELBERGER, M., DAWSON, M. H. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic *Streptococcus*. *J. Biol. Chem.*, v.118, p.61-69, 1937.

KIM, J., YOO, S., OH, D., KWEON, Y., PARK, D., LEE, C., GIL, G. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme Microb. Technol.*, v.19, p.440-445, 1996.

KREIDER, R.B. Whey proteins and seniors nutrition. *Applications Monograph -Seniors Nutrition*, p. 1-8, 2004.

KOGAN, G.; SOLTES, L.; STERN, R.; GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol. Lett.*, v.29, p.17-25, 2007.

- JUHLIN, L. Hyaluronan in skin. *J. Int. Med. Res.*, v.242, p.61-66, 1997.
- LANCEFIELD, R.C. A serological differentiation of human and other groups of streptococci. *J. Exp. Med.*, v.59, p.141-158, 1933.
- LAPCIK JR., L.; LAPCIK, L.; DE SMEDT, S.; DEMEESTE, J.; CHABRECEK, P. Hyaluronan: preparation, structure, properties and applications. *Chem. Rev.*, v.98, n.8, p.2663-2684, 1998.
- LAURENT, T.C. "The tree": hyaluronan research in the 20th century. Disponível em: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA23/HA23.pdf>>.
- LIGGET, R.W.; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. *J. Bacteriol.*, v.12, p.297-311, 1948.
- MALTESE, A.; BORZACCHIELLO, A.; MAYOL, L.; BUCOLO, C.; MAUGERI, F.; NICOLAS, L.; AMBROSIO, L. Novel polysaccharides-based viscoelastic formulations for ophthalmic surgery: rheological characterization. *Biomaterials*, v.27, p.5134-5142, 2006.
- MAUSOLF, A. Das hyaluronat synthetisierende system bei Streptokokken. Reihe: Wissenschaftliche Forschungsbeiträge Biologie/Biochemie/Chemie 20. Intemann, Gauting bei München, Germany, 1988. In: ARMSTRONG, D.C., JOHNS. M.R. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, v.63, n.7, p.2759-2764, 1997.
- MORIMOTO, K.; YAMAGUCHI, H.; IWAKURA, Y.; MORISAKA, K.; OHASHI, Y.; NAKAI, Y. *Pharm. Res.*, v. 8, p.471, 1991.
- MOSELEY, R.; WALKER, M.; WADDINGTON, R.J.; CHEN, W.Y.J. Comparison of the antioxidant properties of wound dressing materials – carboxymethylcellulose, hyaluronan benzyl ester and hyaluronan, towards polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. *Biomaterials*, v.24, p.1549-1557, 2003.
- NARINS, R.S.; BRANDT, F.; LEYDEN, J.; LORENC, Z.P.; RUBIN, M.; SMITH, S. A randomized, double-blind, multi-center comparison of the efficacy and tolerability of Restylane versus Zyplast for the correction of nasolabial folds. *Derm. Surg.*, v. 29, p.588-595, 2003.

NIELSEN, J., VILLADSEN, J., LIDÉN, G. *Bioreaction Engineering Principles*. 2nd ed. Plenum Publishers: New York, 2003.

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.

NORO, N.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.64, p.199-205, 2004.

OGRODOWSKI, C.S. *Produção de ácido hialurônico por Streptococcus: estudo da fermentação de caracterização do produto*. 2006. 103p. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006. (Tese de Doutorado).

OGRODOWSKI, C.S.; HOKKA, C.O.; SANTANA, M.H.A. Influência da relação C/N e da adição de lisozima no rendimento e propriedades do ácido hialurônico produzido por fermentação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 25., 2004, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: AIDIS, 2004. p. 1-8, 1.

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

PAPOUTSAKIS, E.T., MEYER, C.L. Equations and calculations of product yields and preferred pathways for butanediol and mixed-acid fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, v.27, p.50-66, 1985.

PETROVÁ, P.; KOCA, J.; IMBERTY, A. Molecular dynamics simulations of solvated UDP-glucose in interaction with Mg^{2+} cations. *Eur. J. Biochem.*, v.268, p.5365-5374, 2001.

PREHM, P. Hyaluronan. In: VANDAMME, E.J.; DE BAETS, S.; STEINBUCHER, A. *Biopolymers: biology, chemistry, biotechnology, applications*. v.5. Polysaccharides I. Polysaccharides from prokaryotes. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. p. 379-404.

- REED, C.E.; LI, X.; REED, W.F. The effects of pH on hyaluronate as observed by light scattering. *Biopolymers*, v.28, n.11, p.1981-2000, 1989.
- RICHARD, A.; MARGARITIS, A. Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng*, v.82, n.3, p.299-305, 2003.
- 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.
- SCHLEIFER, K.H. Gram-positive cocci. In: SEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARP, M.E.; HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, v. 2. Baltimore: The Williams & Wilkins. 1986. p.999-10002.
- SCHMIDT, K.H.; GUNTHER, E.; COURTNEY, H.S. Expression of both M protein and hyaluronic acid capsule by group A streptococcal strains results in a high virulence for chicken embryos. *Med. Microbiol. Immunol.*, v.184, p.169-173, 1996.
- SCHRAMM, G. *A practical approach to rheology and rheometry*. Germany, 1994.
- SGARBIERI, V.C., ALVIM, I.D., VILELA, E.S.D., BALDINI, V.L.S., BRAGAGNOLO, N. Pilot plant production of yeast (*Saccharomyces* sp.) derivatives for use as ingredients in food formulations. *Braz. J. Food Technol.*, v.2, n.1,2, p.119-125, 1999
- SHOOTMULLER, H. Die artunterscheidung der fur den menschen pathogen Streptokokken durch blutagar. *Munchener Medizinische Wochenschrift.*, v.50, p.849-853, 1903.
- SHU X.Z., LIU Y., PALUMBOI F.S., LUO Y., PRESTWICH G.D. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*, v.25, p.1339-1348, 2004.
- SHULER, M.L.; KARGI, F. *Bioprocess engineering: basic concepts*. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 553 p.
- SCOTT, J.E.; CUMMINGS, C.; BRASS, A.; CHEN, Y. Secondary and tertiary structures in aqueous solution: a C-13 NMR study. *PNA S.*, 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.

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

STANGOHL, S. *Methods and means for the production of hyaluronic acid*. United States Patent n. 6,537,795, 2003.

STEPHANOPOULOS, G.N., ARISTIDOU, A.A., NIELSEN, J., 1998. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. Academic Press, San Diego.

STERN, R., 2003. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 13 (12), 105R-115R.

STOOLMILLER, A.C.; DORFMAN, A. The biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus*. *J. Biol. Chem.*, v.244, p. 236-246, 1969.

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

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

TERZHAGI, B.T.; SANDINE, W.E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, v. 29, n. 6, p. 807-813, 1975.

THOMPSON, R.W., GILBREATH, R.L., BIELK, F. Alteration of porcine skin acid mucopolysaccharides in zinc deficiency. *J. Nutr.*, v.105, n.2, p.154-160, 1975.

THONARD, J. C., MIGLIORE, S. A., BLUSTEIN, R. Isolation of hyaluronic acid from broth cultures of *Streptococci*. *J. Biol. Chem.*, v.239, p.726-728, 1963.

TLAPAK-SIMMONS, V.L., BARON, C.A., WEIGEL, P.H., 2004. Characterization of the purified hyaluronan synthase from *Streptococcus equisimilis*. *Biochemistry* 43, 9234-9242.

VALLINO, J.J., STEPHANOPOULOS, G. Flux determination in cellular bioreaction networks: application to lysine fermentations. In: SIKDAR, S.K., BIER, M., TODD, P. (Eds) *Frontiers in bioprocessing*. Boca Raton, CRC Press, 1990. p. 205-219.

VARMA, A., PALSSON, B.O. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Biotechnology*, v. 12, p. 994-998, 1994.

VOGEL, H.C.; TODARO, C.L. *Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design, and equipment*. 2. ed. New Jersey: Noyes Publications, 1997. 801 p.

WESSELS, M.R.; MOSES, A.; GOLDBERG, J.B.; DICESARE, T.J. Hyaluronan acid capsule is a virulence factor for mucoid group A strptococci. *PNAS*, v.88, p.8317-8321, 1991.

WHITE, D. *The physiology and biochemistry of prokaryotes*. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2000. 548 p.

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

WINTER, W.T.; ARNOTT, S. Hyaluronic acid: the role of divalent cations in conformation and packing. *J. Mol. Biol.*, v.117, n.3, p.761-784, 1977

WOOLCOCK, J.B. The capsule of *Streptococcus equi*. *J. Gen. Microbiol.*, v.85, p.372-375, 1974.

YUN, Y.H.; GOETZ, D.J.; YELLEN, P.; CHEN, W. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. *Biomaterials*, v.25, p.147-157, 2004.

ZISU, B.; SHAH, N.P. Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *J. Dairy Sci.*, v.86, n.11, p.3405-3415, 2003.