



RHELVIS DE CAMPOS OLIVEIRA

**Estudo da produção de ácido hialurônico utilizando
peptonas de soja**

Campinas
2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE
MATERIAIS E BIOPROCESSOS**

RHELVIS DE CAMPOS OLIVEIRA

**Estudo da produção de ácido hialurônico utilizando
peptonas de soja**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para obtenção
do título de Mestre em Engenharia Química.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de
mestrado defendida pelo aluno Rhelvis de Campos Oliveira, e
orientado pela Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "M. H. Andrade Santana".

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Andrade Santana
Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Oliveira, Rhelvis de Campos, 1983-
OL4e Estudo da produção de ácido hialurônico utilizando peptonas de soja / Rhelvis
de Campos Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia Química.

1. Ácido hialurônico. 2. Fermentação. I. Santana, Maria Helena Andrade, 1951-.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of the hyaluronic acid production using soy peptones

Palavras-chave em inglês:

Hyaluronic acid

Fermentation

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Maria Helena Andrade Santana [Orientador]

Reinaldo Gaspar Bastos

Aline Mara Barbosa Pires

Data de defesa: 30-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de mestrado defendida por Rhelvis de Campos Oliveira e aprovada
em 30 de junho de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

MHAndrade

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

RGaspar

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

AMBpires

Profa. Dra. Aline Mara Barbosa Pires

Resumo

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear com diversas aplicações nas áreas médica e farmacêutica. A produção de ácido hialurônico por via fermentativa vem sendo muito estudada atualmente e modificações no meio de cultura tornaram - se uma das principais alternativas para se atingir um produto com altos níveis de rendimento e massa molar (MM).

A primeira etapa deste trabalho teve como objetivo estudar os efeitos de duas peptonas de soja, cuja principal diferença se encontra nas concentrações dos aminoácidos aspartato glutamina e glutamato (AGG), além das proporções de aminoácidos livres e totais. O microrganismo *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 foi cultivado por 24h em frascos agitados contendo uma concentração inicial de 25g L⁻¹ de glicose e razões Carbono:Nitrogênio (C:N) de 3,4:1, 4,1:1 e 5,5:1 para a peptona rica em AGG e 4,1:1, 4,9:1 e 6,3:1 para a peptona pobre em AGG. Os resultados mostraram que a maior produção de AH foi de 1,37g L⁻¹ à razão C:N de 4,1:1 para a peptona pobre em AGG, com MM média de 8,9x10³ Da e cerca de 50 % das frações de MM na casa de 10⁴ Da, enquanto que para a peptona rica em AGG esses valores foram de 0,70g L⁻¹ e 4,1:1 em termos de produção de AH e razão C:N respectivamente, com MM média de 1,19x10⁶ Da e cerca de 67 % das frações de MM na casa de 10⁵ Da. Na segunda parte deste trabalho foi feita uma comparação do comportamento cinético de fermentações realizadas com as duas peptonas de soja em ensaios com aeração forçada. Os modelos logísticos de Verhulst para o crescimento celular, um análogo ao modelo de Luedeking-Piret incorporando o modelo logístico de Verhulst para o consumo de glicose, Verhulst modificado e Luedeking-Piret para a produção de AH foram utilizados para estimar os parâmetros cinéticos. Os ajustes dos modelos apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,93. Os resultados mostraram que crescimento celular, consumo de glicose e produção de AH ocorreram durante as 24h de cultivo em meio de cultura contendo a peptona rica em AGG, enquanto que para a peptona pobre em AGG esse tempo reduziu para 10h. A quantidade produzida de AH foi semelhante para ambas as peptonas, entretanto, utilizando a peptona pobre em AGG, 60% da concentração final de AH veio da fase anterior à etapa de fermentação propriamente dita. Os parâmetros cinéticos apresentaram um coeficiente de manutenção

maior para o cultivo com a peptona pobre em AGG e maior consumo de glicose foi verificado no cultivo com a peptona rica em AGG, refletindo-se no rendimento $Y_{X/S}$, enquanto que o rendimento $Y_{P/X}$ foi semelhante nos cultivos com ambas as peptonas. Esses resultados mostram que as peptonas não são somente fontes de nitrogênio, mas desempenham papéis específicos no cultivo celular.

Abstract

Hyaluronic acid (HA) is a linear polysaccharide with many applications in the medical and pharmaceutical fields. The production of hyaluronic acid by fermentation pathway has been widely studied nowadays, and modifications made in the culture medium is one of the main alternatives to achieve a product with high levels of yield and molecular weight (MW).

The first step of this work was to study the effects of two soy peptones, whose main difference is the amino acids concentrations of aspartate, glutamine and glutamate (AGG), and the proportions of free and total amino acids. The microorganism *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 was grown over 24 hours in shake flasks containing initial glucose concentration of 25 g L⁻¹ and carbon: nitrogen (C: N) ratios of 3.4:1, 4.1:1 and 5.5:1 for rich AGG peptone and 4.1:1, 4.9:1 and 6.3:1 for poor AGG peptone. The results showed that the higher production of HA was 1.37g L⁻¹ with C:N ratio of 4.1:1 for poor AGG peptone with average MW of 8.9 x 10³ Da and about 50 % of the MW fraction in the range of 10⁴ Da, while rich AGG peptone showed values of 0.70 g L⁻¹ and 4.1:1 in terms of HA production and C:N ratio respectively, with average MW of 1.19 x 10⁶ Da and about 67% of the fractions of MW in the range of 10⁵ Da. In the second part of this work was made one comparison of the kinetic behavior of cultivations using both peptones in assays with forced aeration. The logistic models of Verhulst for cell growth, analogous to Luedeking-Piret model incorporating the logistic model of Verhulst for glucose consumption, Verhulst modified and Luedeking-Piret for the production of HA were used to estimate the kinetic parameters. The adjustments of the models had correlation coefficients greater than 0.93. The results showed that cell growth, glucose consumption and HA production occurred over the 24 hours of cultivation in culture medium with rich AGG peptone, while with poor AGG peptone this time reduced for 10h. The amount of HA produced was similar for both peptones, however, using poor AGG peptone 60% of the final HA concentration came from the previous stage of the fermentation. The kinetic parameters showed higher coefficient of maintenance for cultivation with poor AGG peptone and increased glucose consumption was observed in cultivation with rich AGG peptone, reflected in terms of Y_{X/S} yield, while the yield Y_{P/X} was similar in cultivations

with both peptones. These results show that peptones are not only sources of nitrogen but play specific roles in cell culture.

Sumário

Resumo	vii
Abstract.....	ix
Agradecimentos.....	xiii
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Figuras	xix
Nomenclatura.....	xxi
1. Introdução.....	1
2. Objetivo	4
3. Revisão Bibliográfica	5
3.1 Estruturas e Funções do AH	5
3.2 Fontes de Ácido Hialurônico	6
3.3 Comportamento do AH em solução.....	7
3.4 Produção Microbiana de AH	8
3.5 Condições Operacionais	11
3.5.1 Temperatura.....	11
3.5.2 Agitação e Aeração.....	11
3.5.3 Potencial Hidrogeniônico (pH).....	12
3.6 Meio de Cultura	12
3.6.1 Fontes de carbono e nitrogênio e suas funções.....	12
3.6.2 Razão carbono : nitrogênio.....	14
3.7 Modelos não estruturados	15
3.8 Metodologia de caracterização da fermentação	17
3.8.1 Velocidade específica máxima de crescimento celular	17

3.8.2 Fatores de rendimento	18
4. Referências	19
5. Resultados e Discussão.....	26
5.1 Soy-peptone composition effects on the carbon:nitrogen ratio, molecular weight and production of hyaluronic acid synthesized by <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	26
1. Introduction	27
2. Materials and methods	29
3. Results and discussion.....	33
4. Conclusions	39
5. References	39
5.2 Effects of soy peptone composition on the kinetics of hyaluronic acid production by <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	43
Introduction	44
Material and methods	47
Results and discussion.....	55
Conclusions	62
References	62
6. Conclusões finais	66
7. Sugestões para trabalhos futuros	66

Agradecimentos

Agradeço as pessoas que mencionarei aqui, que direta ou indiretamente fizeram parte desta conquista.

Em primeiro lugar aos meus pais, Goreti e Valdemir, por me ajudarem de todas as formas possíveis, sempre acreditando em mim e me instruindo sobre os verdadeiros valores da vida e aos meus irmãos Régis e Raíssa por fazerem parte de minha vida.

A minha namorada Dayse, que tanto amo, por sempre me motivar a perseguir “nossos” sonhos.

A professora Maria Helena Andrade Santana pela oportunidade, ajuda, paciência e ensinamentos que levarei para sempre comigo.

A pesquisadora Aline Mara Barbosa e ao professor Reinaldo Gaspar Bastos pelos apontamentos valiosos e de grande importância para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório Leandro Benedini, Felipe Ferrari, Fernanda Mota e Gilson Maia pela ajuda, sugestões e agradável convivência.

Aos meus amigos do exílio Alex, Ana, Rodrigo (Chefinho), Carlos, Jean, Murilo e Matheus pelos momentos de descontração.

Aos amigos da minha antiga república Danilo e Christiano (Zola) pelo companheirismo.

E por fim agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva a lugar nenhum.”

Frank A. Clark

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Concentração de ácido hialurônico em tecidos e fluidos (Laurent <i>et al.</i> , 1992).....	7
Table 1 - Concentrations of free and total amino acids and free:total ratios in the studied peptones.....	30
Table 2 - Parameters determined for fermentations using the amino acid profile of the rich AGG peptone in cultivations of <i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920 with three different C:N ratios under natural aeration for 24 h.....	34
Table 3 - Parameters determined for fermentations using the amino acid profile of the poor AGG peptone in cultivations of <i>S. zooepidemicus</i> ATCC 39920 with three different C:N ratios under natural aeration for 24 h.....	36
Table 1 - Free and total amino acids present in the peptones.....	48
Table 2 - Symbols used in equations (1 – 25).....	50
Table 3 - Kinetic parameters for cell growth (Eq. 9), glucose consumption (Eq. 21) and HA biosynthesis (Eqs. 11, 17) in batch cultivations with rich and poor AGG peptones.....	56

Listas de Figuras

Figura 1 - Estrutura molecular da unidade repetitiva dissacarídica do Ácido Hialurônico (Bansal <i>et.al.</i> , 2010).....	5
Figura 2 - Via biosintética para produção do ácido hialurônico por <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (adaptado de Liu <i>et al.</i> 2011).....	10
Fig. 1. Molecular weight distribution of HA as function of the C:N ratios for rich and poor AGG peptones. (■) 10^6 Da, (□) 10^5 Da, (▨) 10^4 Da, (■) 10^3 Da.....	37
Fig. 2. Effects of the C:N ratios on yields $Y_{P/X}$ and $Y_{Acetate/X}$ for the rich AGG peptone (a) and the poor AGG peptone (b) during cultivation of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920 with natural aeration and without pH control. (■) $Y_{P/X}$, (▨) $Y_{Acetate/X}$	38
Fig. 1 Cultivations of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920 at a C/N ratio of 4.1/1 for rich AGG peptone (a) and 4.9/1 for poor AGG peptone (b), at 2vvm with an agitation rate of 250 rpm over 24 h without pH control. Cell growth (■) and glucose consumption (▲) represent experimental data. Continuous lines represent the predicted profiles calculated from the estimated parameters.....	59
Fig. 2 Cultivations of <i>Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus</i> ATCC 39920 at a C/N ratio of 4.1/1 for rich AGG peptone (a) and 4.9/1 for poor AGG peptone (b), aeration at 2vvm and an agitation rate of 250 rpm over 24 h without pH control. HA biosynthesis (●) represent the experimental data. Continuous lines represent the predicted parameters by the Luedeking-Piret model, and traced lines represent the data predicted by the modified Verhulst model.....	61

Nomenclatura

ADP - Adenosina difosfato

AH - Ácido Hialurônico

ATCC - American Type Culture Collection

ATP - Adenosina trifosfato

BHI - Brain Heart Infusion

CoASH - Coenzima A

C : N – Razão carbono : nitrogênio

DO - Dissolved oxygen

F - Aminoácidos livres

T - Aminoácidos totais

F T⁻¹ - Razão aminoácidos livres : aminoácidos totais

HA - Hyaluronic Acid

H - Concentração de ácido hialurônico

Ho - Concentração de ácido hialurônico inicial

Hf - Concentração de ácido hialurônico final

HAS - Hialuronato sintase

HPLC - High performance liquid chromatography

H₂SO₄ - Ácido Sulfúrico

MW - Molecular weight

NaCl - Cloreto de sódio

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídio oxidada

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida

Poor AGG – Peptona de soja pobre em aspartato, glutamina e glutamato

Rich AGG – Peptona de soja rica em aspartato, glutamina e glutamato

pH - Potencial hidrogeniônico

RNA - Ácido ribonucléico

RPM - Rotações por minuto

So - Concentração inicial de glicose

S - Concentração de glucose

TPP - Total proteins and peptides

UDP - Uridina difosfato

UTP - Uridina trifosfato

X - Concentração de biomassa

X₀ - Concentração de biomassa inicial

X_f - Concentração de biomassa final

Y_{P/S} - Coeficiente de rendimento de HA em relação à glicose

Y_{P/X} - Coeficiente de rendimento de HA em relação à crescimento celular

Y_{Acetate/S} - Coeficiente de rendimento de acetato em relação à glicose

Y_{Lactate/S} - Coeficiente de rendimento de lactato em relação à glicose

Y_{Acetate/X} - Coeficiente de rendimento de acetato em relação à crescimento celular

Y_{X/S} - Coeficiente de rendimento de células em relação à glicose

vmx - Velocidade máxima de crescimento celular

vhm - Velocidade máxima de formação de produto

umx - Velocidade específica máxima de crescimento celular

umh - Velocidade específica máxima de formação de produto

ms - Coeficiente de manutenção celular

λx - Tempo de fase lag para crescimento celular

λp - Tempo de fase lag para formação de produto

1. Introdução

O ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo linear composto por unidades repetitivas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetil-glicosamina (GlcNAc), unidos por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4 (Chong *et al.*, 2005). Possui características físico-químicas e biológicas como alta retenção de água, viscoelasticidade e biocompatibilidade, possuindo amplas aplicações na medicina e farmacologia (Kim *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1989).

Esta substância está presente em tecidos de animais tais como peles e cartilagens, exercendo importantes funções como flexibilidade e proteção (Kim *et al.*, 1996). Em humanos, o AH pode ser encontrado no cordão umbilical, fluido sinovial e no humor vítreo (Laurent *et al.*, 1992).

O AH é empregado em produtos para a pele, tratamentos de osteoartrite, cirurgias oftalmológicas, cirurgias de suplementação, aplicações corretivas e cicatrização de feridas (McBride e Bard, 1979; Feinberg e Beebe, 1983; Forrester e Balazs, 1980).

Atualmente o AH comercial ainda é extraído a partir da crista de galinha, porém a sua produção por via fermentação bacteriana vem se desenvolvendo cada vez mais, com menores riscos de contaminação e custos de purificação (Chong *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008). Desde então, estratégias com o propósito de aumentar o rendimento e massa molar do AH produzido são estudadas (Armstrong *et al.*, 1997; Ellwood *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2006; Ogrodowski *et al.*, 2005; Pires e Santana, 2010 a).

Além disso, existe também uma preocupação com a origem da fonte de nitrogênio utilizada, já que a fonte animal pode trazer riscos de contaminação por vírus. Sendo assim, a utilização de fontes de nitrogênio de origem vegetal vem ganhando importância (Heenan *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2008).

A utilização da peptona de soja como fonte de nitrogênio para a produção de AH já foi descrita na literatura, porém, com poucos detalhes em relação às concentrações de aminoácidos livres e totais presentes nessas fontes (Lee *et al.*, 2009; Benedini e Santana, 2012). Detalhes como esses ganham importância a partir do momento que se sabe que o

transporte de peptídeos pode ser mais ou menos eficaz do que o transporte equimolar de aminoácidos livres. Guirard e Snell 1962 citam o exemplo do microrganismo *Lactobacillus brueckii*, onde a presença do peptídeo formado por histidina gerou melhores resultados em termos de crescimento do que a presença equimolar do aminoácido livre histidina.

Com relação a razão carbono:nitrogênio (C:N) e a produção microbiana de AH, alguns estudos apresentam razões C:N referentes às concentrações das fontes de carbono (ex. glicose) e nitrogênio (ex. extrato de levedura) em vez da concentração de carbono presente na fonte de carbono e da concentração de nitrogênio presente na fonte de nitrogênio (Chen *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2011). Dessa forma a reprodução de experimentos pode se tornar difícil, já que o perfil e concentrações de aminoácidos em uma determinada fonte pode mudar de um lote para o outro.

Sendo assim esse trabalho tem como objetivo estudar os efeitos de diferentes proporções de aminoácidos livres e totais presentes em duas peptonas de soja comerciais distintas para a produção microbiana de AH (*Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920), em ensaios com aeração natural e forçada. Uma delas é rica em aminoácidos livres (Rich AGG) e a outra pobre aminoácidos livres (Poor AGG) sendo que aplicaremos três diferentes razões C:N para cada peptona de soja. A concentração de carbono presente na glicose foi estimada em 40% e a concentração de carbono presente nas duas peptonas de soja foi encontrada através de análises de carbono total TOC-L (Shimadzu, Kyoto, Japan). O tempo de cultivo de todos os ensaios foi fixado de 24 horas, objetivando a comparação de resultados obtidos em estudos anteriores (Benedini, 2012; Pires, 2009; Macedo, 2006).

Os resultados serão analisados em termos de fatores de rendimento, crescimento celular, consumo de nitrogênio e glicose, concentração dos metabólitos (lactato, acetato, formato e etanol), pH, além de produção, massa molar média (MM) e distribuição da massa molar final do AH.

Para as fermentações com aeração forçada utilizaremos modelos matemáticos não estruturados. A utilização de modelos matemáticos não estruturados para o ajuste de perfis cinéticos de produção de AH é tema de poucos trabalhos publicados recentemente (Don e Shoparwe, 2010; Vázquez *et al.*, 2009; Vázquez e Murado, 2008; Huang *et al.*, 2007), sendo que nenhum deles descreve a aplicação desses modelos em situações com diferentes

proporções de aminoácidos livres e totais presentes no meio de cultura como descrito anteriormente.

Sendo assim, serão aplicados modelos logísticos não estruturados para o ajuste de perfis de crescimento celular, consumo de glicose e produção de AH, com a finalidade de avaliarmos o comportamento desses modelos em situações com diferentes concentrações de aminoácidos livres e totais presentes no meio de cultura. Os ensaios experimentais foram realizados com aeração forçada, sem controle de pH e razão C:N de 4,1:1 para a peptona rica em AGG e 4,9:1 para a peptona pobre em AGG. O tempo de cultivo dos ensaios com aeração natural e forçada foi de 24h, baseando-se em estudos anteriores que utilizavam o mesmo microrganismo (*Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920) (Macedo, 2006; Pires, 2010; Benedini, 2012).

Para o ajuste de perfis de crescimento celular e consumo de glicose foi utilizado o modelo de Verhulst e um modelo logístico incorporado à equação de Luedeking-Piret respectivamente. Para a produção de AH foi utilizado o modelo modificado de Verhulst e o modelo de Luedeking-Piret. Os modelos utilizados se ajustaram aos dados experimentais de crescimento celular, consumo de glicose e produção de AH com R^2 maior que 0,93 para ambas as peptonas utilizadas.

2. Objetivo

O presente trabalho tem por objetivo estudar os efeitos de diferentes concentrações de aminoácidos livres e totais sobre a produção microbiana de AH, sua distribuição de MM e produção de metabólitos, através do cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em ensaios com aeração natural e forçada, sem controle de pH e meio de cultura contendo glicose e peptona de soja.

Esse objetivo foi alcançado através das seguintes metas:

- Influência da concentração de aminoácidos livres e totais presentes na peptona de soja em fermentações com aeração natural.
- Influência da razão Carbono/Nitrogênio em fermentações com aeração natural.
- Delineamento do comportamento cinético com a utilização de modelos logísticos não estruturados em fermentações com aeração forçada.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Estruturas e Funções do AH

O ácido hialurônico (AH) pertence a um grupo de polissacarídeos similares denominados “polissacarídeos do tecido conjuntivo”, “mucopolissacarídeos” ou “glicosaminoglicanos”. Apresenta unidades repetitivas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetil-glicosamina (GlcNAc), unidos por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4 (Chong *et al.*, 2005).

A figura 1 exibe a unidade monomérica do AH.

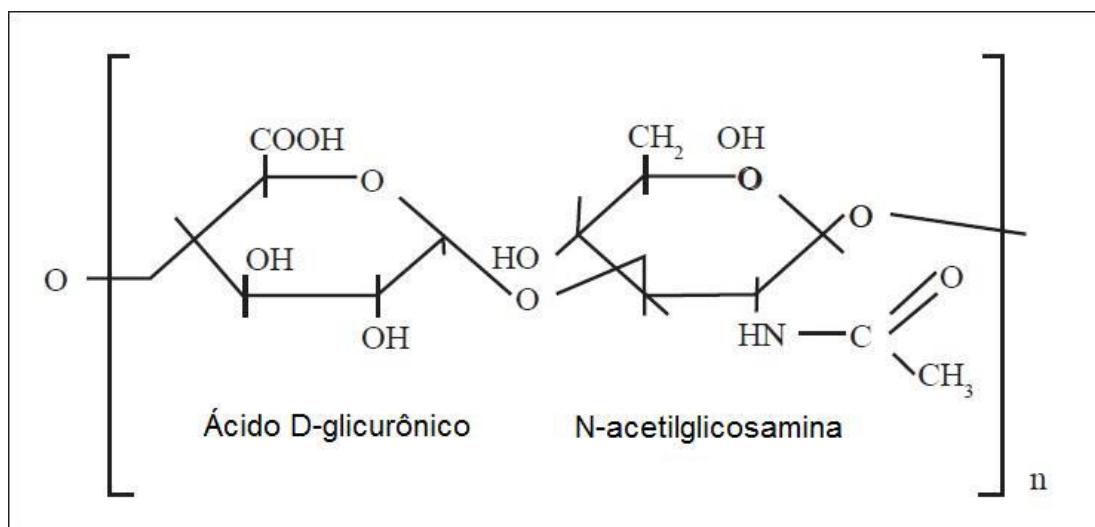


Figura 1 - Estrutura molecular da unidade repetitiva dissacarídica do ácido hialurônico (Bansal *et.al.*, 2010).

O AH pode conter em torno de 10.000 a 30.000 unidades dissacarídicas repetidas na molécula extraída de tecidos animais, e massa molar que varia de 10^3 a 10^7 Da. As aplicações do AH estão fortemente ligadas à sua massa molar. Alta massa molar ($MW > 2 \times 10^5$ Da) é aplicada em preenchimentos de pele, imunossupressores e antiinflamatórios (McBride e Bard, 1979; Feinberg e Beebe, 1983), massa molar média ($2 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ Da) é aplicada na cicatrização de feridas (Forrester e Balazs, 1980), enquanto que a massa molar baixa ($4 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3$ Da) possui propriedades anti-apoptóticas (Jiang *et al.*, 2005).

O ácido hialurônico funciona como uma estrutura de suporte no espaço extracelular em todo o organismo. Também está envolvido na migração, proliferação e diferenciação celular, hidratação de tecidos e alteração de suas propriedades físicas (Hascall *et al.*, 1997). Contribui para a manutenção do fluido sinovial e atua como lubrificante e absorvedor de impactos (Kim *et al.*, 1996).

3.2 Fontes de Ácido Hialurônico

O AH está presente em tecidos conjuntivos de mamíferos, preenchendo espaços intercelulares. Este mucopolissacarídeo está presente no fluido sinovial, pele, tendões, humor vítreo e cordão umbilical.

Constituindo o humor vítreo humano, a concentração de AH é em torno de 0,1 – 0,4 mg g⁻¹ em peso seco; cerca de 3-4 mg mL⁻¹ de AH está presente no fluido sinovial e cerca de 0,5 mg mL⁻¹ de AH presente nas matrizes celulares (Hascall e Laurent, 1997).

A matriz que há em volta dos queratinócitos, células diferenciadas do tecido epitelial, possui cerca de 4 mg mL⁻¹ de AH, tão alta quanto a concentração presente no cordão umbilical (Hascall e Laurent, 1997).

Porém, a maior quantidade de AH reside na pele, totalizando uma massa média de 7 - 8 g por adulto, metade da quantidade total encontrada em todo o corpo. Neste caso, o AH está presente tanto na derme quanto na epiderme (Erickson e Stern, 2003).

A tabela 1 apresenta as concentrações de AH presentes em diferentes tecidos e fluídos (humano e animal).

Tabela 1 - Concentração de ácido hialurônico em tecidos e fluidos (Laurent *et al.*, 1992).

Tecido ou Fluido	Concentração (mg L ⁻¹)
Crista de gallo	7500
Cordão umbilical humano	4100
Fluido sinovial humano	1420 - 3600
Cartilagem nasal bovina	1200
Humor vítreo	140 - 338
Pele humana	200
Cérebro de coelho	65
Músculo de coelho	27
Linfa torácica humana	8,5 – 1,8
Urina humana	0,1 – 0,5
Soro humano	0,01 – 0,1

Os processos de extração e purificação do AH proveniente de fonte animal consomem muito tempo e dinheiro, além de apresentar dificuldades de separação de moléculas com alta massa molar devido a formação de complexos proteoglicanos (Weigel *et al.*, 2004).

A produção de AH por via fermentativa é a principal alternativa para contornar as dificuldades citadas acima, pois proporciona maior controle do rendimento e de características do produto, como a massa molar.

3.3 Comportamento do AH em solução

Soluções concentradas de AH têm consistência gelatinosa, alta viscoelasticidade e alto grau de hidratação, podendo absorver até 100 vezes a sua massa em água (Kim *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1989).

Ligações por pontes de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos carboxila e N-acetil do AH, conferem ao polímero capacidade de retenção de água e dureza conformacional, limitando a sua flexibilidade (Lapčík *et al.*, 1998).

Em soluções diluídas os átomos axiais de hidrogênio do AH formam uma face apolar hidrofóbica e os átomos das cadeias equatoriais formam uma face polar hidrofílica,

criando uma estrutura de torção expandida em soluções fisiológicas (Hascall e Laurent, 1997).

A estrutura enovelada, ocupando grande domínio hidrodinâmico é resultado da alta massa molar da molécula, da rigidez local decorrente do tamanho das unidades monoméricas (anéis de açucares), do impedimento de rotação das ligações glicosídicas e das pontes de hidrogênio formadas (Day e Sheehan, 2001).

Por fim, as propriedades viscosas e elásticas do AH em solução dependem do comprimento da cadeia molecular, sua conformação e concentração.

3.4 Produção Microbiana de AH

A produção microbiana de AH foi desenvolvida com sucesso por Roseman *et.al.*, 1953. A primeira patente foi concedida em à Akasaka *et al.* (1989). Exigências nutricionais da cultura bacteriana e da otimização do processo fermentativo para a produção de AH foram desenvolvidos a partir disso.

O AH produzido por extração de tecidos animais ou por fermentação microbiana apresenta a mesma estrutura química do polímero encontrado nos humanos, podendo diferir apenas em relação à sua massa molar (Cooney *et al.*, 1999).

O ácido hialurônico é sintetizado na forma de cápsulas ao redor da célula e a enzima responsável por isso é a hialuronato sintase (Yamada e Kawasaki, 2005). O mecanismo de formação do AH e elongação de sua cadeia, foi estudado em sistemas enzimáticos livres de células, com mutações no gene da enzima hialuronato sintase, verificando alterações no comprimento de cadeia do AH (Pummill e DeAngelis, 2003; Rilla *et al.*, 2005).

O ácido D-glicurônico e a N-acetyl glicosamina são derivados da glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato respectivamente, portanto o esqueleto glicosil do ácido hialurônico vem da glicose (Dorfman *et al.*, 1955).

Na primeira reação a partir da glicose - 6 - fosfato, a enzima α - fosfoglicomutase converte glicose-6-fosfato em glicose - 1 - fosfato. UDP - glicose pirofosforilase catalisa a reação de UTP e glicose - 1 - fosfato para produzir o açúcar nucleotídeo UDP – glicose. Ácido UDP - glicurônico é obtido através da oxidação do grupo álcool primário da UDP - glicose através da enzima UDP - glicose desidrogenase (Chong *et al.*, 2005).

Na via originada da frutose – 6 – fosfato, a transferência do grupo amina da glutamina para a frutose-6-fosfato através da enzima amino transferase produz glicosamina - 6 - fosfato. A transferência do grupo acetil por uma acetil transferase forma N - acetil glicosamina - 6 - fosfato. O rearranjo do grupo fosfato por uma mutase gera N - acetil glicosamina - 1 - fosfato. A pirofosforilase adiciona UDP para obtenção de UDP – N – acetilglicosamina. Por fim, UTP gera doadores glicosil ativados que são polimerizados em AH pela enzima hialuronato sintase (Chong *et al.*, 2005).

A biossíntese do AH é dispendiosa para o micro-organismo com relação ao consumo de energia (Chong e Nielsen, 2003). Um total de 4 moles de ATP são consumidos para produzir 1 mol da unidade dissacarídica de AH, sendo 2 moles consumidos nas duas reações 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 UDP (Chong *et al.*, 2005).

Além de fornecer os precursores para a síntese de AH, glicose - 6 - fosfato e frutose - 6 – fosfato fornecem também constituintes estruturais da parede celular bacteriana como peptideoglicanos e ácidos teicóicos (Chong *et al.*, 2003). Portanto a produção de grandes quantidades de AH pelas células é dependente de níveis adequados de glicose, já que o AH é sintetizado na parede celular do micro-organismo (Widner *et.al.*, 2005).

A glicose é principalmente metabolizada em ácido láctico e ácido acético através reações redox do ácido pirúvico (Sedewitz *et al.*, 1984). Os produtos metabólicos (lactato, formato, acetato e etanol) são sintetizados a partir das enzimas lactato desidrogenase (LDH), piruvato formato liase (PFL), acetato quinase (AK) e álcool desidrogenase (ADH) (Chong e Nielsen, 2003).

A figura 2 exibe a via biosintética do AH a partir da glicose e aminoácidos.

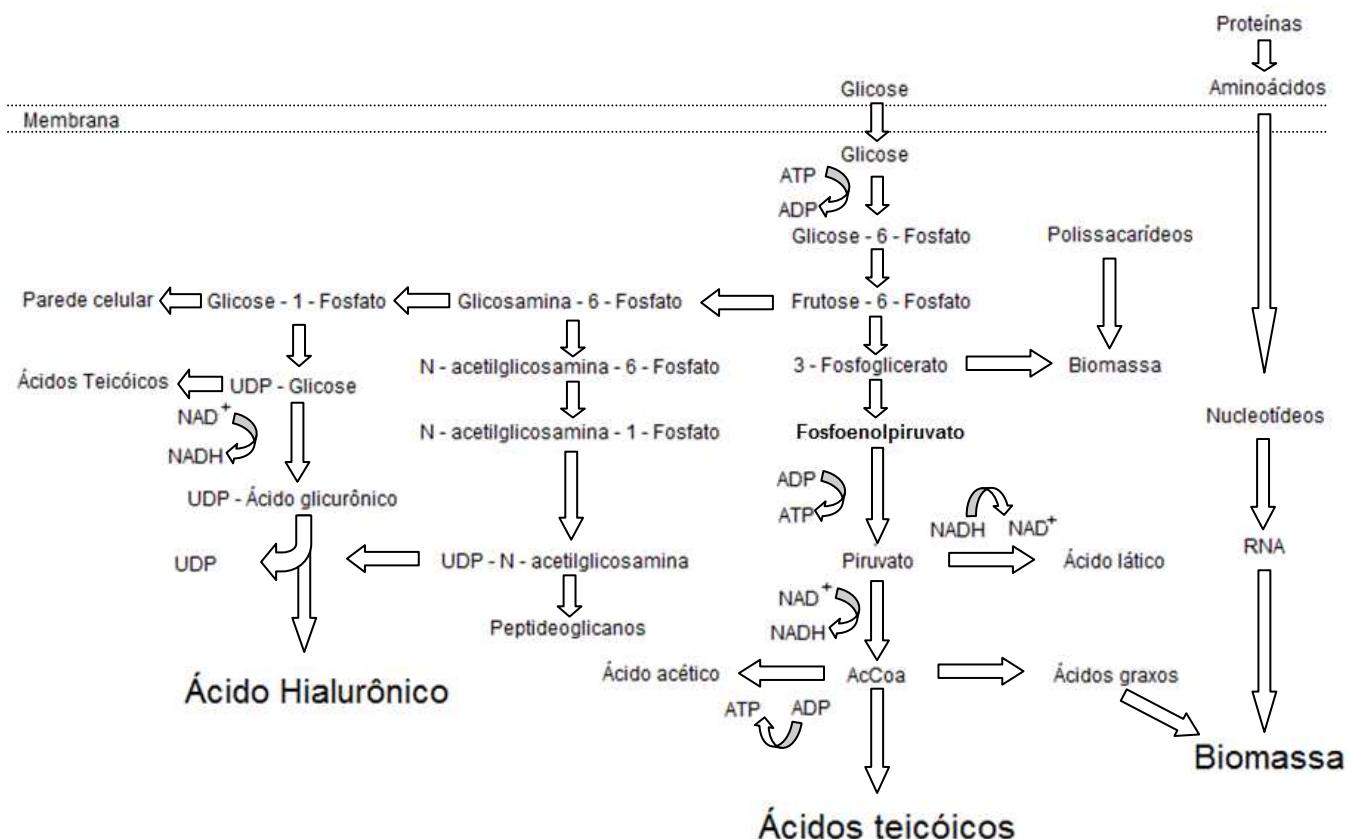


Figura 2 - Via biossintética para produção do ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* (adaptado de Liu *et al.* 2011).

Armstrong e Johns. (1997) observaram que a massa molar do AH produzido em fermentação possui uma relação negativa com a taxa de crescimento celular e que limitações de glicose causariam primeiramente a queda de produtividade de AH e posteriormente a redução da sua massa molar.

A parede celular de bactérias Gram positivas é construída a partir de um dos precursores da síntese do AH, sendo assim a produção de AH assim como a sua massa molar competem com crescimento celular por energia (Gao *et al.*, 2006). Condições operacionais podem ser empregadas com o intuito de aumentar o rendimento e a massa molar do AH obtido por via fermentativa.

3.5 Condições Operacionais

3.5.1 Temperatura

O controle da temperatura é um item muito importante para a manutenção de uma razão adequada entre crescimento celular e produção de AH. Em estudos com duas linhagens do micro-organismo *Streptococcus*, a temperatura ótima para o crescimento celular e formação de AH foi determinada em torno de 37°C, havendo redução da massa molar do AH em temperaturas inferiores (Kim *et al.*, 1996).

3.5.2 Agitação e Aeração

O AH pode ser produzido sob condições anaeróbicas e aeróbicas, sendo a última condição mais favorável para a obtenção de AH de maior massa molar (Johns *et al.*, 1994). Diversos trabalhos tratando dos efeitos da agitação já foram publicados assim como a sua importância para o controle da taxa de oxigênio dissolvido no sistema (Liu *et al.*, 2009; Johns *et al.*, 1994).

Huang *et al.* (2006) propos em seus estudos que o oxigênio auxilia na produção de AH, e que acima de 5 % de saturação de ar não é observado qualquer aumento na produção de AH.

Em relação à atuação do oxigênio na produção de AH, sugere-se que o AH funcione como uma proteção impermeável contra os efeitos tóxicos do oxigênio (Swann *et al.*, 1990). Sendo assim, condições aeróbias estimulariam a produção de AH através de um mecanismo de proteção (Kim *et al.*, 2007).

Em relação à agitação, foi comprovada a sua necessidade para melhorar a transferência de oxigênio dentro do meio fermentativo. Porém, a agitação vigorosa não atuaria diretamente na produção de AH e sim na morte celular por cisalhamento. Kim *et al.* (1996) observou que a produção de AH não foi afetada por mudanças na taxa de aeração, enquanto que o crescimento celular diminuiu com o aumento da taxa de agitação.

Hasegawa *et al.* (1999) relatou uma elevação na produção de AH com o aumento da taxa de agitação, no entanto velocidades muito elevadas causaram morte celular e queda na produção de AH. Johns *et al.* (1994) provou que, em comparação com a cultura anaeróbia,

a oxigenação conduziu a um rendimento de energia superior e que, portanto, observa-se maior liberação de AH.

3.5.3 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Embora o pH exerça uma influência considerável na taxa de produção e rendimento do biopolímero (AH), foi observada pouca influência na sua massa molar (Pires e Santana., 2010 a).

Johns *et al.* (1994) observaram que o pH ideal para a produção de AH em cultivo em batelada foi de 6,7. Adicionalmente, Liu *et al.* (2008) utilizaram stress alcalino, com pH em torno de 8,5, no cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* WSH-24, resultando em aumento da produção de AH.

Resultados mostram que o controle do pH ao longo do cultivo apresentou maior crescimento celular e produtividade de AH (De Vuyst *et al.*, 1998; Grobben *et al.*, 1998; Gassem *et al.*, 1997). No entanto, no cultivo sem controle de pH uma inversão da direção da fonte de carbono para a síntese de AH à custa do crescimento celular foi observada (Pires e Santana, 2010 a).

3.6 Meio de Cultura

3.6.1 Fontes de carbono e nitrogênio e suas funções

Micro-organismos do gênero *Streptococcus* requerem uma grande diversidade de nutrientes para o seu desenvolvimento. A fonte de carbono normalmente é composta apenas por glicose ou em alguns casos junto com frutose (Casimiro *et al.*, 2009), diferentemente da fonte de nitrogênio que deve ser composta por uma grande variedade de aminoácidos, em concentrações suficientes para o micro-organismo crescer e realizar todas as suas funções (Armstrong *et al.*, 1997).

A glicose (fonte de carbono) é o substrato responsável por fornecer energia para o micro-organismo através de ATP, gerado por seu metabolismo e também pela formação das unidades precursoras do AH (ácido D-glicurônico e N-acetil-glicosamina). De acordo com Chong e Nielsen, (2003), limitações na quantidade de glicose no meio de cultura exibe alguns efeitos indesejáveis, como a redução da produção e massa molar do AH produzido.

Apesar da importância de fontes de carbono orgânicas para crescimento celular e formação de produto, é preciso garantir também o fornecimento de nitrogênio orgânico, elemento essencial à vida que pode ser encontrado em quase todas as moléculas orgânicas presentes em organismos vivos. De modo geral, os meios incluem extrato de levedura, peptonas ou hidrolisado de caseína como fonte de nitrogênio (Armstrong *et al.*, 1997).

Armstrong *et al.* (1997) selecionaram 12 aminoácidos considerados essenciais para o crescimento celular. A retirada de cada aminoácido essencial do meio de cultura gerou um decréscimo maior que 50% no crescimento celular em relação ao controle contendo todos os aminoácidos. Neste trabalho ficou comprovada a vantagem do meio complexo em relação ao meio quimicamente definido (MQD).

Ogrodowski *et al.* (2005) demonstraram que o efeito da concentração de extrato de leveduras (fonte de nitrogênio) no meio fermentativo é muito mais expressivo que o da glicose para a produção de AH.

Diferentes fontes de nitrogênio (aminoácidos livres e peptídeos) podem conduzir à resultados diferentes em termos de crescimento celular, uma vez que um meio de cultura rico em peptídeos pode apresentar resultados positivos ou negativos se comparado com o mesmo meio de cultura rico em aminoácidos livres (Guirard e Snell, 1962).

Peptonas não representam simplesmente uma fonte de nitrogênio orgânico, mas também uma fonte de aminoácidos ou peptídeos com funções específicas, de forma que apenas uma fração do total utilizado é realmente importante (Jesen e Hamer, 1993; Vasquez *et al.*, 2004). Sendo assim, a utilização de fontes como essas poderá reduzir custos de produção em larga escala.

De acordo com a definição de Green *et al.* (1977), peptonas são hidrolisados de proteínas solúveis em água não-coagulável pelo calor. As peptonas comerciais utilizadas em meios microbiológicos são principalmente derivadas da caseína, soja e carne.

Vázquez *et al.* (2009) reportou os efeitos do cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35426 com meio de cultura composto por peptonas marinhas (visceras de peixe) e extrato de levedura, utilizadas como fontes de nitrogênio para a produção microbiana de AH em ensaios com aeração forçada. O meio de cultura contendo peptonas marinhas e extrato de levedura resultou em maior massa molar de AH ($3,15 \times 10^6$ Da) se comparado com o meio de cultura contendo triptona e extrato de levedura ($1,54 \times 10^6$ Da) utilizado

como controle, porém nenhuma informação sobre o perfil de aminoácidos contidos no meio de cultura foi fornecida.

Além da preocupação com a quantidade de AH produzido, existe também uma grande preocupação com a qualidade do meio de cultura utilizado na obtenção do produto. Nos últimos 10 anos as indústrias farmacêuticas e de cosméticos têm optado pelo emprego de meios de cultura de origem vegetal por razões de segurança. Alguns estudos reportam os efeitos da utilização de peptona de soja como fonte de nitrogênio na cultura de micro-organismos (Heenan *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2008).

Lee *et al.* (2009) demonstraram os efeitos de dezesseis fontes de nitrogênio não animais no cultivo de *Streptococcus sp.* KL0188 para a produção de AH em ensaios com aeração natural e forçada. A peptona de soja apresentou os melhores resultados em termos de produção de AH ($1,46 \text{ g L}^{-1}$) em fermentações com aeração natural, porem o rendimento veio a cair nos ensaios com aeração forçada.

Benedini e Santana, (2012) comprovaram a eficiência da utilização da peptona de soja como única fonte de nitrogênio, desde a preparação do inóculo em placas de Petri até a fermentação propriamente dita. A razão glicose : nitrogênio utilizada nesse trabalho foi de 7,8:1 e os ensaios foram realizados com aeração natural e cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. Esses autores também mostraram que, além da alta produtividade a peptona de soja substituiu fontes de nitrogênio de origem animal como o BHI (*Brain and Heart Infusion*), extrato de leveduras e sangue de carneiro, trazendo vantagens como a redução do teor de TPP (proteínas e peptídeos totais) e a remoção de compostos de origem animal utilizados no inóculo, reduzindo os riscos de reações imunogênicas e efeitos colaterais causados pelo AH impuro.

3.6.2 Razão carbono : nitrogênio

A razão carbono : nitrogênio (C : N) é importante na biossíntese de AH, porque as estirpes de *Streptococcus zooepidemicus* são dependentes de nitrogênio para o crescimento celular, enquanto que o carbono é utilizado principalmente na geração de energia (Armstrong *et al.*, 1997).

Chen *et al.* (2009) encontraram uma razão C:N ideal de 2,0:1 para o cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 em ensaios com aeração forçada e controle de pH. O meio de cultura utilizado era composto por glicose (fonte de carbono) e extrato de levedura (fonte de nitrogênio). Lai *et al.* (2011) encontraram uma razão C:N ideal de 2,5:1, utilizando o mesmo micro-organismo, em meio de cultura composto por glicose e $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, extrato de levedura e triptona como fontes de nitrogênio, em fermentação com aeração forçada e controle de pH. Nesses dois últimos estudos as razões C:N calculadas eram referentes às concentrações das fontes de carbono e nitrogênio em vez da concentração de carbono presente na fonte de carbono e da concentração de nitrogênio total presente na fonte de nitrogênio. Isso dificultaria muito a reprodução dos experimentos já que a concentração de nitrogênio total em uma determinada fonte de nitrogênio pode mudar de um lote para o outro.

Pires e Santana, (2010 a) estudaram os efeitos metabólicos induzidos pela concentração inicial de glicose no cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 para a produção de AH. Os ensaios foram realizados com aeração natural e forçada utilizando uma razão glicose:nitrogênio próxima à 4,3:1 e sem controle de pH. Os melhores resultados em termos de rendimento de AH foram obtidos à uma concentração inicial de glicose de 25 g L⁻¹ e não foi constatada influência significativa da suplementação de íons minerais no meio de cultura.

3.7 Modelos não estruturados

Uma ferramenta indispensável para a otimização, controle e análise da produção é o desenvolvimento de modelos matematicamente robustos, formulados com parâmetros biológicos e estatisticamente consistentes. Dentre esses modelos estão os “estruturados”, que consideram reações metabólicas intracelulares e modelos mais simples, mas igualmente úteis e confiáveis em termos de realidade experimental, os denominados “não-estruturados”, que descrevem a produção de biomassa através de uma variável global (Vásquez e Murado, 2008).

Os modelos não estruturados constituem uma classe de modelos sem preocupação com a estrutura da população microbiana, sendo que a composição ou qualidade da biomassa não é levada em consideração. Estes modelos incluem observações fundamentais

do processo de crescimento celular e não contabilizam nenhuma reação intracelular (Borges, 2011).

Modelos não estruturados, mais comumente utilizados para a descrição de crescimento celular são derivados de equações logísticas (Mercier *et al.*, 1992; Parente e Hill, 1992). O modelo logístico independente da concentração de substrato é de fácil manuseio e adequado para o ajuste dos perfis de crescimento celular e formação de produto. Modelos logísticos são utilizados para descrever matematicamente fenômenos em que as variáveis inicialmente apresentam variações em um ritmo lento, depois o ritmo de variações se intensifica, voltando a reduzir-se em um determinado ponto de saturação como é o caso de um perfil de crescimento celular.

Considerando que a cinética de produção de biomassa é geralmente expressa por modelos baseados em Monod (Monod, 1942), o modelo logístico de Verhulst, (1838), criado para descrever o crescimento populacional humano, foi o primeiro a tratar do efeito da competição por nutrientes e consequente fase estacionária de crescimento, tornando-se então, útil para descrever o perfil de crescimento celular em bactérias.

Cooney *et al.* (1999) utilizaram modelos estruturados para prever os perfis de crescimento celular, consumo de glicose e biossíntese de AH e ácido láctico em cultivos com batelada alimentada. Os resultados de consumo de substrato e produção de AH se ajustaram bem aos dados experimentais, porém nenhum método de validação estatística foi apresentado.

Existem poucos trabalhos sobre a aplicação de modelos não estruturados para a produção microbiana de AH, porém os que existem demonstram resultados estatisticamente satisfatórios. Vásquez *et al.* (2009) utilizaram modelos logísticos para traçar perfis experimentais de crescimento celular e biossíntese de ácido láctico e AH. Os modelos propostos apresentaram precisão e robustez estatística. Peptonas de vísceras de peixe foram utilizadas como fonte de nitrogênio através do cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35426.

Don e Shoparwe (2010) utilizaram modelos matemáticos não estruturados para traçar perfis de crescimento celular, consumo de glicose e biossíntese de AH, através do cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920, com diferentes concentrações de

glicose inicial. Os dados do modelo se ajustaram aos dados experimentais de forma satisfatória em todas as concentrações de glicose utilizadas.

A partir dos argumentos citados acima, este trabalho tem o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes concentrações de aminoácidos livres e totais presentes em duas peptonas de soja comerciais distintas, utilizadas como fonte de nitrogênio para a produção microbiana de AH. Esses efeitos serão avaliados através de parâmetros como fatores de rendimento e massa molar, atribuídos a diferentes razões C/N em ensaios com aeração natural. Por fim, em ensaios com aeração forçada a aplicação de modelos não estruturados objetivando o estudo cinético das fermentações e avaliação dos modelos utilizados.

3.8 Metodologia de caracterização da fermentação

3.8.1 Velocidade específica máxima de crescimento celular

A velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{mx}) foi obtida através coeficiente angular da reta tangente ao ponto de inflexão da curva de crescimento celular, cuja sua definição é:

$$\mu_{mx} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$\int_{t_0}^t \mu_{mx} \cdot dt = \int_{X_0}^X \frac{dX}{X} \quad (2)$$

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_{mx} \cdot (t) \quad (3)$$

3.8.2 Fatores de rendimento

Os cálculos dos fatores de rendimento instantâneos, utilizados nos ensaios com aeração forçada, foram obtidos através dos coeficientes angulares das curvas que relacionam a formação de produto e crescimento celular para $Y_{P/X}$ e crescimento celular e consumo de glicose para $Y_{X/S}$, conforme as suas equações abaixo.

$$\frac{dP}{dX} = Y_{P/X} \quad (4)$$

$$\frac{dX}{dS} = Y_{X/S} \quad (5)$$

Os cálculos dos fatores de rendimento globais utilizados nos ensaios com aeração natural, foram realizados da seguinte forma:

$$Y_{P/S} = \Delta H / \Delta S \quad (6)$$

$$Y_{P/X} = \Delta H / \Delta X \quad (7)$$

$$Y_{X/S} = \Delta X / \Delta S \quad (8)$$

$$Y_{Acetato/S} = \Delta Acetato / \Delta S \quad (9)$$

$$Y_{Lactato/S} = \Delta Lactato / \Delta S \quad (10)$$

4. Referências

- ARMSTRONG, D. C., JOHNS, M. R. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*, Applied and Environmental Microbiology. v. 63, p. 2759–2764, Mar 1997.
- ARMSTRONG, D. C., COONEY, M. J., JOHNS, M. R. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. Microbiology and Biotechnology, v. 47, p. 309–312, Oct 1997.
- BANSAL, J., KEDIGE, S. D., ANAND, S. Hyaluronic acid: A promising mediator for periodontal regeneration. Indian Journal of Dental Research, v. 21(4), p. 575 – 578, Dec 2010.
- BENEDINI, L. J. Influência de peptonas vegetais no cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* para a produção de ácido hialurônico. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2012. 68 p. Dissertação (mestrado).
- BENEDINI, L. J., SANTANA, M. H. A. Efects of soy peptone on inoculums preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. State University of Campinas. Bioresource Technology. v.130, p. 798 – 800, Feb 2013.
- BORGES, E. R., Desenvolvimento de um processo biotecnológico para a produção de ácido succínico por *Actinobacillus succinogenes*. Rio de Janeiro: Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011. 62 p. Tese (Doutorado).
- 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 Journal of Chemical Engineering, v. 26. p. 428-432, Mar 2009.
- CHONG, B. F., BLANK, L. M., MCLAUGHLIN, R., NIELSEN, L. K. Microbial hyaluronic acid production. Microbiology and Biotechnology, v. 66, p. 341-351, Jan 2005.

- CHONG, B. F., NIELSEN, L. K. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Biotechnology*, v. 100, p. 33-41, Jan 2003.
- COONEY, M. J., GOH, L. T., LEE, P. L., JOHNS, M. R. Structured model-based analysis and control of the hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus*: physiological implications of glucose and complex-nitrogen limited growth. *Biotechnology Progress*, v. 15, p. 898-910, Sep 1999.
- DAY, A. J., SHEEHAN, J. K. Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Current Opinion in Structural Biology*. v. 11, p. 617–622. Sep 2001.
- DE VUYST, L., VANDERVEKEN, F., VAN DE VEM, S., DEGEEST, B. Production by isolations of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Microbiology*, v. 84, p. 1059-1068, Jun 1998.
- DON, M. M., SHOPARWE, N. F. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. *Biochemical Engineering Journal*. v. 49, p. 95–103, Mar 2010.
- DORFMAN, A., ROSEMAN, S., MOSES, F. E., LUDOWIEG, J., MAYEDA, M. The biosynthesis of hyaluronic acid by group a streptococcus: iii. origin of the n-acetylglucosamine moiety. *Journal of Biological Chemistry*. v. 212, p. 583-592. 1955.
- ERICKSON, M., STERN, R. “Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism,” *Biochemistry Research International*, v. 2012, 9 pages, 2012.
- FEINBERG, R. N., BEEBE, D. C. Hyaluronate in vasculogenesis. *Science*. v. 220, p. 1177–1179. Jun 1983.
- FORRESTER, J. V., BALAZS, E. A. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology*. v. 40, p. 435–446. Jul 1980
- GAO, H. J., DU, G. C., CHEN, L. Analysis of metabolic fluxes for hyaluronic acid (HA) production by *Streptococcus zooepidemicus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p. 399-408, Apr 2006.

- GASSEM, M. A., SCHIMIDT, K. A., FRANK, J. F. Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. Journal of Food Science, v. 62 p. 171-173. Jan 1997.
- GREEN, J. H., PASKELL, S. L., GOLDMINTZ, D. Fish peptones for microbial media developed from red hake and from fishery by-product. J. Food Protect, v. 40, p. 181–186, 1977.
- GROBBEN, G. J., CHI-JOE, I., KITZEN, V. A., BOELS, I. C., SIKKEMA, J., SMITH, M. R., DE-BONT, J. A. M. Enhancement of exopolysaccharide production bu *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. Appl Environ Microbiol. v. 64, p. 1333-1337, Jan 1998.
- HASCALL, V. C., LAURENT, T. C. Hyaluronan: Structure and physical properties <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>.Uppsala University, Medicinska vetenskapsområdet, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, 1997.
- HASEGAWA, S., NAGATSURU, M., SHIBUTANI, M., YAMAMOTO, S., HASEBE, S. Productivity of concentrated hyaluronic acid using a Maxblend® fermentor. Journal of Bioscience and Bioengineering. v. 88, p. 68–71, Oct 1999.
- HEENAN, C., ADAMS, M., HOSKEN, R., FLEET, G. Growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in vegetarian food products. Lebensm.Wiss. Technol., v. 35, p. 171-176. Mar 2002.
- HUANG, W. C., CHEN, S. J., CHEN, T. L. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic fermentation. Biochemical Engineering Journal, v. 32, p. 239-243, Dec 2006.
- HUANG, W. C., CHEN, S. J., CHEN, T. L. Modeling the microbial production of hyaluronic acid. Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, v. 38, p. 355-359, 2007.
- JAGANNATH, S., RAMACHANDRAN, K. B. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. Biochemical Engineering Journal, v. 48, p. 148-158. Jan 2010.

JENSEN, P.R., HAMMER, K. Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*, Environ. Microbiol, v. 59, p. 4363–4366, Dec 1993.

JIANG, D., LIANG, J., FAN, J., YU, S., CHEN, S., LUO, Y., PRESTWICH, G. D., MASCARENHAS, M. M., GARG, H. G., QUINN, D. A., HOMER, R. J., GOLDSTEIN, D. R., BUCALA, R., LEE, P. J., MEDZHITOV, R., NOBLE, P. W. Regulation of lung injury and repair by toll-like receptors and hyaluronan. Nat. Med. v. 11, p. 1173–1179. Oct 2005.

JOHNS, M. R., GOH, L. T., OEGGERLI, A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. Biotechnology Letters, v. 16, p. 507-512, May 1994.

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

LAI. Z. W., RAHIM, R. A., ARIFF, A. B., MOHAMAD, R. Medium formulation and impeller design on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. African Journal of Microbiology Research, v. 5, p. 2114-2123. Aug 2011.

LAPCIK, L., DE SMEDT, S., DEMEESTER, J., CHABRECEK, P. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. Chemical reviews, v. 98, p. 2663-2684. November 1998.

LAURENT, T. C., FRASER, J. R. Hyaluronan. The FASEB Journal, v. 6, p. 2397-2404. Apr 1992.

LIU, J., XING, J., CHANG, T., MA, Z., LIU, H. 2005. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. Process Biochemistry, v. 40, p. 2757-2762.

- LIU, L., WANG, M., DU, G., CHEN, J. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Microbiology*, v. 46, p 383-388. Jan 2008.
- MACEDO, A. C. Estudo da produção de ácido hialurônico por fermentação de *Streptococcus zooepidemicus* em substrato de caju (*Anacardium occidentale L.*) Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. 195 p. Dissertação (mestrado).
- MCBRIDE, W. H., BARD, J. B. Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytosis. *J. Exp. Med*, v. 149, p. 507–515. Feb 1979.
- MERCIER, P., YERUSHALMI, L., ROULEAU, D., DOCHAIN, D. Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. *Journal of Chemical Technology and Bio-cultures*, v. 55, p. 111–121, 1992.
- MONOD, J. *Recherches sur la croissance des Cultures Bactériennes*. Hermann. Paris, 1942.
- OGRODOWSKI, C. S., HOKKA. C. O., SANTANA, M. H. A. Production of hyaluronic acid by *Streptococcus*. *Biochemistry and Biotechnology*. v. 122, p. 753-76. 2005.
- PARENTE, E., HILL, C. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 73, p. 290–298. Oct 1992.
- PATEL, H., MACKINTOSH, D., AYLING, R., NICHOLHAS, R., FIELDER, M. A. A novel medium devoid of ruminant peptone for high yield growth of *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Veterinary Microbiology*, v. 127, p. 309-314. Mar 2008.
- PIRES, A. M. B. Estudos metabólicos para otimização de condições nutricionais e de cultivo para produção microbiana de ácido hialurônico. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. 184 p. Tese (doutorado).

PIRES, A. M. B., SANTANA, M. H. A. Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.162. p. 1751–1761. Apr 2010 a.

PUMMILL, P. E., DEANGELIS, P. L. Alteration of polysaccharide size distribution of a vertebrate hyaluronan synthase by mutation. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 278, No. 22, p. 19808–19814, May 2003

RILLA. K., SIISKONEN. H., SPICER. A. P., HYTTINEN. J. M. T., TAMMI. M. I., TAMMI. R. H., 2005. Plasma membrane residence of hyaluronan synthase is coupled to its enzymatic activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 31890 – 31897.

ROSEMAN, S., MOSES, F. E., LUDOWIEG, L., DORFMAN, A. The biosynthesis of hyaluronic acid by group a streptococcus: i. utilization of 1-c14-glucose. *Journal of Biological Chemistry*, v. 203, p. 213-225, 1953.

MEDCHEM PRODUCTS, INC., WOBURN, MASS. David A. Swann, Bernard P.Sullivan, Gordon Jamieson, Kanneth R. Richardson, Tariach Singh. Biosynthesis of hyaluronic acid. United States Patent: 4,897,349, Jan 30, 1990.

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

SEDEWITZ, B., SCHLEIFER, K. H., GÖTZ, F. Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, v. 160, p. 462-465. Oct 1984.

SHISEIDO COMPANY LTD. Hidemichi Akasaka, Hisayuki Komasaki, Takayuki Arai. Fermentation method for producing hyaluronic acid. United States Patent n. 4,801,539, jan 31, 1989.

YAMADA, T., KAWASAKI, T. Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: New Approaches. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 99, p. 521-528 , Jul 2005.

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*. Environ. Microbiol. v.71, p.3747-3752, 2005.

WEIGEL. P.H. Bacterial hyaluronan synthases – update issue. May 2004; <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html>>.

VÁZQUEZ, J. A., CABO, M. L., GONZALEZ, MA. P., MURADO, M. A. The role of aminoacids in nisin and pediocin production by two lactic acid bacteria: A factorial study, Enzyme Microb. Technol. v. 34, p. 319–325. March 2004.

VÁZQUEZ, J. A., MURADO, M. A. Unstructured mathematical model for biomass, lactic acid and bacteriocin production by lactic acid bacteria in batch fermentation. Chem Technol Biotechnol. v. 83, p. 91–96, Jan 2008.

VÁZQUEZ, J. A., MONTEMAYOR, M.I., FRAGUAS, J., MURADO, M. A. High production of hyaluronic and lactic acids by *Streptococcus zooepidemicus* in fed-batch culture using commercial and marine peptones from fishing by-products. Biochemical Engineering Journal. v. 44, p.125-130, May 2009.

VERHULST, R. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. Correspondence Mathematique et Physique, v. 10, p. 113, 1938.

5. Resultados e Discussão

Esta parte do trabalho será apresentada na forma de artigos submetidos aos periódicos *Bioresource Technology* (item 5.1) e *Applied Microbiology and Biotechnology* (item 5.2).

5.1 Soy-peptone composition effects on the carbon:nitrogen ratio, molecular weight and production of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*

Oliveira, R.C. and Santana, M. H. A.*

University of Campinas, School of Chemical Engineering,
Av. Albert Einstein 500, 13083-852 Campinas-SP, Brazil

ABSTRACT – Hyaluronic acid (HA) is a natural biopolymer with a wide range of biological functions. Fermentation using non-animal sources in the culture medium has been a requirement for sustainable HA production. Thus, this work aimed to study the effects of two soy peptones on HA biosynthesis by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. The peptones had the same amino acid profile but had substantially different concentrations of the amino acids aspartate, glutamine and glutamate (AGG) as well as different free amino acid concentrations. Glucose (25 g L^{-1}) was used as the carbon source with C:N ratios of 3.4:1, 4.1:1 and 5.5:1 for the rich AGG peptone and 4.1:1, 4.9:1 and 6.3:1 for the poor AGG peptone. The results showed that AGG stimulated the elongation of chains and increased the yield of HA. Therefore, the composition of peptones is of primary importance to the C:N ratio for the production and molecular weight of HA.

Key words: hyaluronic acid, *Streptococcus zooepidemicus*, vegetable peptones, submerged fermentation, nitrogen sources

*Corresponding author- Email: mariahelena.santana@gmail.com, Tel.: +55 19 3521 3921, fax: +55 19 3521 3890

1. Introduction

Hyaluronic Acid (HA) is composed of D-glucuronic acid and N-acetyl glucosamine linked by β -1-3 and β -1-4 glycosidic bonds. HA is present in cartilage, vitreous humor, synovial fluid and dermis. Approximately 35% of human HA is found in the muscles and skeleton (Chong et al., 2005). The quality of HA is determined by its purity and molecular weight (MW), which generally ranges from 10^4 to 10^7 Da (Armstrong and Johns, 1997).

The biological functions of HA are dependent on its MW. High molecular weight molecules ($MW > 2 \times 10^5$ Da) have space filling, immunosuppressive and anti-inflammatory properties (McBride and Bard, 1979; Feinberg and Beebe, 1983); medium molecular weight molecules ($2 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ Da) are involved in ovulation and wound repair (Frost and Weigel, 1990; Forrester and Balazs, 1980); and small molecular weight molecules ($4 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3$ Da) are involved in complex cellular signaling cascades, are anti-apoptotic and also have other characteristics (Jiang et al., 2005).

Industrially produced HA is extracted from rooster combs or is produced by microbes. The latter route has the advantages of greater control over the production process and lower costs of purification (Chong et al., 2005; Liu et al., 2008). Bacteria from the *Streptococcus* genus synthesize a thick layer of HA around their cells as a protection mechanism (De Angelis, 1999). Therefore, environmental stress during cultivation has been used as a mechanism to increase HA production (Duan et al., 2009; Liu et al., 2008).

Studies have shown that HA synthesis is linked to cell growth, but both cell growth and HA synthesis compete for carbon during fermentation (Chong et al., 2005). The carbon:nitrogen (C:N) ratio is important in HA biosynthesis because *Streptococcus zooepidemicus* strains are dependent on nitrogen for cell growth, whereas carbon is mainly used for energy generation (Armstrong et al., 1997).

Chen et al. (2009) found a C:N ratio of 2.0:1 in the cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 under forced air and pH control with a medium composed of glucose and yeast extract. Lai et al. (2011) found a C:N ratio of 2.5:1 using the same microorganism with glucose and a mixture of $(NH_4)_2S_2O_8$, $(NH_4)_2PO_4$, yeast extract and tryptone as the carbon and nitrogen sources, respectively, in batch fermentation with forced air and pH control. Both of the resulting C:N ratios showed high HA yields. However, in

those studies, the concentrations of the carbon and nitrogen sources (e.g., glucose and yeast extract) were used as the C:N ratios instead of the actual C:N ratio contained in the sources, which makes the results difficult to compare because total nitrogen can be different from the nitrogen content of the sources.

Many studies have focused on the reduction of energy competition through nutrient limitations to increase the yield and molecular weight of HA (Armstrong et al., 1997; Ellwood et al., 1996; Zhang et al., 2006; Ogorodowski et al., 2005).

Pires et al. (2010a, 2010b) studied the metabolic effects of the initial glucose concentration (IGC) and the influence of mineral ions on the cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 for HA production. Cultivations were performed under natural and forced aeration, and the results indicated that a concentration of 25 g L⁻¹ (glucose) was the best initial glucose concentration, regardless of ion supplementation, with yeast extract (60 g L⁻¹) as the nitrogen source and a glucose:nitrogen ratio of approximately 4.3:1.

Regarding the amino acids in organic nitrogen sources, through the deletion of individual amino acids from the culture medium, Armstrong et al. (1997) identified 12 essential free amino acids (arginine, cysteine, glutamine, histidine, isoleucine, lysine, leucine, methionine, tyrosine, phenylalanine, tryptophan and valine) involved in *Streptococcus equi zooepidemicus* ATCC 35246 growth.

The different components of the nitrogen source (e.g., free amino acids and peptides) in the culture medium may cause different results in terms of transport efficiency because individual peptides may have a smaller or larger effect on cell growth than the same amount of free amino acids (Guirard and Snell, 1962).

Vázquez et al. (2009) used a culture medium formulated with marine peptones and yeast extract as organic nitrogen sources for the microbial production of HA in fed-batch cultivations by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35426. Shark peptone achieved the highest HA molecular weight (3.15×10^6 Da) compared to yeast extract and tryptone (1.54×10^6 Da), which were used as controls; however, no information about the amino acid profile of the peptones was provided.

The composition of the nitrogen source is an important parameter for a high growth rate; moreover, individual amino acids, peptides and proteins may also interfere with the purity of the final product. Thus, using nitrogen from plant sources is an alternative that has

recently become the subject of several studies because it reduces the risk of contamination. Some studies have demonstrated the use of soy peptone as a nitrogen source in the cultivation of microorganisms (Heenan et al., 2002; Liu et al., 2005; Patel et al., 2008).

Lee et al. (2009) studied the effects of sixteen non-animal nitrogen sources in the cultivation of *Streptococcus* sp. KL0188 for HA production with natural and forced aeration. Soy peptone showed the best results in terms of HA production (1.46 g L^{-1}) in fermentations under natural aeration. Benedini and Santana (2013) demonstrated the efficiency of soy peptone for HA biosynthesis in first seed culture in Petri dishes and in submerged fermentation in cultivations of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 with a glucose:nitrogen ratio of 7.8:1 under natural aeration and without pH control.

Limited information about the amino acid profiles of the nitrogen sources was provided in the abovementioned studies. Thus, in this work, we extended the previous findings by studying the effects of the amino acid profiles of two soy peptones used as nitrogen sources on the production of HA by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. Glucose (25 g L^{-1}) was used as the carbon source in cultivations under natural aeration with C:N ratios of 3.4:1, 4.1:1 and 5.5:1 for the rich AGG peptone and C:N ratios of 4.1:1, 4.9:1 and 6.3:1 for the poor AGG peptone. The results were analyzed in terms of cell growth, yield coefficients, production and molecular weight of HA, intermediate metabolites, nitrogen and glucose consumption and pH for each C:N ratio.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism

Streptococcus equi, subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 was kept frozen at -80°C in ampoules, with glycerol 10% as a cryoprotectant. The microorganism was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

2.2. Soy peptones

Two different soy peptones purchased from Organotechnie SAS (La Courneuve, France) and Sigma-Aldrich Co (Saint Louis, MO, USA) were used. Table (1) shows the total and free amino acid content of the soy peptones according to data supplied by the manufacturer.

Table 1

Concentrations of free and total amino acids and free:total ratios in the studied peptones.

Amino acid	Rich AGG			Poor AGG		
	Total ^a	Free ^a	F T ⁻¹ ^b	Total ^a	Free ^a	F T ⁻¹ ^b
Alanine	2.50	1.00	0.40	2.20	0.09	0.04
Arginine	3.40	1.30	0.38	3.50	0.33	0.09
Aspartate	5.20	0.50	0.10	-	0.07	-
Cysteine	-	0.10	-	0.50	-	-
Glutamine	0.70	0.20	0.29	-	0.03	-
Glutamate	12.60	4.40	0.35	-	0.15	-
Glycine	2.20	0.30	0.14	2.10	0.09	0.04
Histidine	0.70	0.20	0.29	1.30	0.05	0.04
Isoleucine	2.30	0.80	0.35	2.20	0.02	0.01
Leucine	3.40	1.70	0.50	3.80	0.30	0.08
Lysine	3.70	0.80	0.22	3.10	0.23	0.07
Methionine	-	0.30	-	0.50	0.09	0.18
Phenylalanine	2.20	1.10	0.50	2.50	0.12	0.04
Proline	2.30	0.20	0.09	2.50	0.01	0.00
Serine	1.25	0.55	0.44	2.50	0.11	0.04
Threonine	2.00	0.60	0.30	2.10	0.06	0.03
Tryptophan	-	0.30	-	-	0.06	-
Tyrosine	1.20	0.50	0.42	2.00	0.05	0.02
Valine	2.50	1.00	0.40	2.20	0.09	0.04

AGG – Aspartate, Glutamine and Glutamate amino acids

Rich AGG - Organotechnie SAS (La Courneuve, France) – Soy peptone E-110

Poor AGG - Sigma-Aldrich Co (Saint Louis, MO, USA) - Peptone Hy-Soy® T - P6463

F T⁻¹ - Free amino acids/Total amino acids

a - (g 100 g⁻¹), b - (g g⁻¹)

Both peptones had the same amino acid composition of free peptide or protein forms and of essential and non-essential amino acids for *S. zooepidemicus* ATCC 39920 growth and production of HA. The main difference between the peptones was the concentration of aspartate, glutamine and glutamate (AGG), which thus allowed the designations of rich and poor AGG.

2.3. Total nitrogen in peptones

The total protein and peptide (TPP) content of the peptones was determined by bicinchoninic acid assay (BCA; Pierce Chemical Company/Thermo Scientific, Rockford,

IL). Nitrogen Kjeldahl was calculated by dividing the TPP content by a factor of 6.25, as recommended by Ordinance No.360 from Anvisa. The poor AGG peptone was centrifuged twice until precipitation of the insoluble components before total nitrogen evaluations.

2.4. Total carbon in peptones

The total organic carbon (TOC) concentration was determined using a TOC-L (Shimadzu, Kyoto, Japan) analyzer with a catalytic oxidation method (Sugimura and Suzuki, 1988).

2.5. Inoculum

An ampoule containing the culture of *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* ATCC 39920 was thawed and streaked in Petri dishes containing soy peptone (67 g L^{-1}) and bacteriological agar (Benedini and Santana, 2013). The dishes were incubated at 37°C for 24 h; then for inoculum preparation, colonies were transferred to three Erlenmeyer flasks (50 mL) containing culture medium (10 mL) composed of glucose 25 g L^{-1} (40% carbon) and soy peptone containing 3.2, 5.8 and 10 g L^{-1} of nitrogen Kjeldhal, resulting in C:N ratios of 5.5:1, 4.1:1 and 3.4:1, respectively, for the rich AGG peptone and 6.3:1, 4.9:1 and 4.1:1, respectively, for the poor AGG peptone. These flasks were incubated under reciprocal shaking at 150 rpm and 37°C for 12 h.

2.6. Fermentation

The inoculum was transferred at 10% (v/v) to Erlenmeyer flasks (250 mL) maintaining the same concentrations of glucose and soy peptone as the inoculum. The flasks were incubated under reciprocal shaking at 150 rpm and 37°C for 24 h. Cell growth and HA, metabolites (lactate, acetate, formate and ethanol), nitrogen and glucose concentrations were determined for each flask at the initial and final times. The average molecular weight and pH of the HA were determined at the end of the fermentations.

2.7. HA separation and purification

The culture broth was centrifuged at 22400 g for 20 min. Ethanol was added to the supernatant at a ratio of 1.5:1 v:v (ethanol:supernatant). The solution was kept at 4°C for 1 h for HA precipitation by centrifugation. A solution of NaCl (0.15 mol L^{-1}) was added to the HA precipitate, and the process of precipitation with ethanol, refrigeration,

centrifugation and dissolution with NaCl was performed twice more. The TPP (total proteins and peptides) and HA content in the purified HA were analyzed.

2.8. Analytical methods

Cell growth: Cell growth was determined according to the gravimetric method; therefore, fermentation broths were centrifuged in tubes with known weights. After centrifugation, the supernatant was separated as described above in section 2.7, and the precipitated cell pellet was washed and centrifuged twice with deionized water. Finally, cells were dried and weighed according to the gravimetric method.

HA concentration: The turbidimetric method was applied to determine the hyaluronic acid content (Chen and Wang, 2009). Sodium hyaluronate (HylumedTM) from Genzyme Corporation (Cambridge, MA, USA) was used as the standard.

Glucose concentration: A commercial glucose oxidase kit (Laborlab Ltda, Guarulhos, São Paulo, Brazil) was used to determine the glucose concentration.

Lactate, acetate, formate and ethanol concentrations: Samples of fermentation broth were filtered through membranes with a 0.2 µm pore size (Sartorius, Goettingen, Germany). The filtered samples (20 µL) were injected into an ion exchange HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) connected to an HPX-87H fast acid column Aminex (Bio-Rad,70 Hercules, CA., USA) with dimensions of 7.8 mm x 300 mm. The mobile phase was composed of H₂SO₄ (0.004 M) pumped at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹ (Chong and Nielsen, 2003). The temperature was maintained at 65 °C, and the peak profile was monitored with a Shimadzu RID-6A refractive index detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

HA molecular weight: The average molecular weight was determined by size exclusion chromatography using a Shimadzu chromatography system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) connected to a column guard (Polysep-GFC-P, 7.8 mm x 35 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) and a gel filtration column (Polysep-GFC-P6000, 7.8 mm x 300 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA).The peak profile was monitored with a Shimadzu RID-6A refractive index detector (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Samples of 20 µL were injected, and NaNO₃ (0.1 M) was used as a mobile phase at 1.0 mL min⁻¹ and 25° C.

Statistical analysis: Tukey's test was applied for the results shown in Tables 2 and 3, with a 5% probability ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Analysis of the peptones

Among the 12 essential amino acids identified by Armstrong et al. (1997) as essential for cell growth, the poor AGG peptone presents approximately 4 times less histidine, 40 times less isoleucine, 9 times less phenylalanine, 10 times less tyrosine, 11 times less valine and 7 times less glutamine in terms of free amino acids compared to the rich AGG peptone (Table 1). Organic nitrogen sources can also supply a significant proportion of the carbon required for cell growth (O'Regan et al. 1994); an analysis of the carbon in both peptones showed that organic nitrogen sources made up 14.35% of the carbon for the rich AGG peptone and 15.54% for the poor AGG peptone.

Studies have demonstrated the importance of amino acids in HA production; for example, exchanging one particular amino acid of streptococcal HA synthase may cause changes in the size distribution of the HA chain (Pummill and DeAngelis, 2003). Substrate starvation results in the exclusion of HA synthases from the plasma membrane and damages HA biosynthesis (Rilla et al., 2005). Glutamine is used in the synthesis of N-acetyl glucosamine, an HA precursor, and is also found in cell walls (Chong et al., 2005). Although some components contribute to cell growth and HA biosynthesis, competition for the transport of nutrients (free amino acids and peptides) is an important aspect of the different results (Guirard and Snell, 1962). The rich AGG peptone presents a higher FT^{-1} ratio than the poor AGG peptone (Table 1) for all amino acids (nonessentials and essentials).

3.2. Comparative analysis of the fermentations

The comparative analysis of the fermentations indicates that the profile of the amino acids in soy peptones plays an important role in the production and molecular weight of HA as well as in the cell growth and production of the intermediate metabolites.

An increase in biomass with a C:N ratio reduction in the culture medium was observed in cultivations with both peptones (Table 2 and Table 3). Nitrogen consumption

reflected the increase in biomass, which is typical of lactic bacteria whose biosynthetic processes require nitrogen sources (Chong et al., 2005).

Table (2) shows the results of the cultivations with the rich AGG peptone, in terms of cell growth, glucose and nitrogen consumption, production and MW distribution of HA, yield coefficients, intermediate metabolites and pH for each C:N ratio studied.

Table 2

Parameters determined for fermentations using the amino acid profile of the rich AGG peptone in cultivations of *S. zooepidemicus* ATCC 39920 with three different C:N ratios under natural aeration for 24 h.

Parameters	C:N		
	3.4:1	4.1:1	5.5:1
Xo (g L ⁻¹)	0.34 ± 0.00 ^a	0.29 ± 0.00 ^a	0.27 ± 0.00 ^a
Cell growth (g L ⁻¹)	4.50 ± 0.40 ^a	3.17 ± 0.33 ^b	2.22 ± 0.21 ^c
Glucose consumption (g L ⁻¹)	22.55 ± 0.20 ^a	16.80 ± 0.32 ^b	22.69 ± 0.13 ^a
Nitrogen consumption (g L ⁻¹)	1.68 ± 0.03 ^a	1.05 ± 0.09 ^b	0.61 ± 0.01 ^c
HA production (g L ⁻¹)	0.31 ± 0.00 ^a	0.70 ± 0.00 ^b	0.26 ± 0.00 ^c
Y _{P/S} (g g ⁻¹)	0.01 ± 0.00 ^a	0.04 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^a
Y _{P/X} (g g ⁻¹)	0.07 ± 0.00 ^a	0.22 ± 0.01 ^b	0.12 ± 0.00 ^a
Y _{X/S} (g g ⁻¹)	0.20 ± 0.00 ^a	0.20 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.00 ^b
Y _{Lactate/S} (g g ⁻¹)	0.53 ± 0.00 ^a	0.56 ± 0.02 ^b	0.16 ± 0.00 ^c
Y _{Acetate/S} (g g ⁻¹)	0.10 ± 0.00 ^a	0.12 ± 0.00 ^b	0.07 ± 0.00 ^c
Lactate (g L ⁻¹)	11.93 ± 0.03 ^a	9.31 ± 0.17 ^b	3.73 ± 0.08 ^c
Acetate (g L ⁻¹)	2.32 ± 0.01 ^a	1.93 ± 0.04 ^b	1.73 ± 0.03 ^c
Formate (g L ⁻¹)	-	-	-
Ethanol (g L ⁻¹)	-	-	-
TPP (g L ⁻¹)	-	0.58 ± 0.09 ^b	0.22 ± 0.06 ^b
TPP.HA ⁻¹ (g g ⁻¹)	-	0.83 ± 0.18 ^b	0.84 ± 0.04 ^b
HA average MW (x10 ⁶ Da)	1.16 ± 0.12 ^a	1.19 ± 0.11 ^a	1.04 ± 0.11 ^a
pH	5.05 ± 0.02 ^a	4.90 ± 0.02 ^b	5.06 ± 0.01 ^a

Xo – Initial biomass concentration; Cell growth-biomass produced in cultivation, HA production – Hyaluronic acid purified produced in cultivation; Y_{X/S} – Cell growth per glucose consumption; Y_{P/X} – HA production per cell growth; Y_{P/S} – HA production per glucose consumption; Y_{Lactate/S} – Lactate per glucose consumption; Y_{Acetate/S} – Acetate per glucose consumption; TPP – Total proteins and peptides in purified HA.

The same lower-case letters in the same parameter indicate no significant difference according to the Tukey test at 95% confidence.

C:N ratios: 3.4:1 (10.0 g L⁻¹ Carbon (glucose), 23.5 g L⁻¹ Carbon (peptone), 10.0 g L⁻¹ Nitrogen (peptone)), 4.1:1 (10.0 g L⁻¹ Carbon (glucose), 13.7 g L⁻¹ Carbon (peptone), 5.8 g L⁻¹ Nitrogen (peptone)); 5.5:1 (10.0 g L⁻¹ Carbon (glucose), 7.5 g L⁻¹ Carbon (peptone), 3.2 g L⁻¹ Nitrogen (peptone)).

Fermentations with the poor AGG peptone (Table 3) showed a different relation between nitrogen consumption and cell growth. This can be explained by the fact that

peptide amounts may vary between these two types of peptones, and the excess of an antagonistic amino acid can impair the absorption of an essential amino acid; in this case, the presence of peptides has a larger impact on nitrogen consumption and cell growth (Guirard and Snell, 1962).

The rich AGG peptone has a higher concentration of free essential amino acids than the poor AGG peptone (Table 1), which explains the different results obtained in terms of HA yield achieved with the same C:N ratio (4.1:1) for both peptones. Benedini and Santana (2013) obtained a similar concentration of HA (0.28 g L^{-1}) in their studies with a glucose:nitrogen ratio of 7.8:1 using conditions similar to those used in the current study with the C:N ratio of 5.5:1 (Table 2).

Different results in terms of glucose consumption were observed for both peptones; an increase in glucose consumption was observed for the rich AGG peptone (Table 2). In that case, carbon from the nitrogen source may have been replaced by carbon from glucose.

In terms of C:N ratios, an increase in cell growth was observed with the increase in the nitrogen concentration of the culture medium; thus, despite the increasing concentration of carbon from nitrogen sources, more carbon was used for cell biosynthesis. In the case of reduced concentrations of nitrogen, the increase in glucose consumption may be attributed to the lack of carbon from nitrogen sources, as observed by the C:N ratios of 5.5:1 for the rich AGG peptone (Table 2) and 6.3:1 for the poor AGG peptone (Table 3).

Table 3

Parameters determined for fermentations using the amino acid profile of the poor AGG peptone in cultivations of *S. zooepidemicus* ATCC 39920 with three different C:N ratios under natural aeration for 24 h.

Parameters	C:N		
	4.1:1	4.9:1	6.3:1
Xo (g L ⁻¹)	0.34 ± 0.02 ^a	0.28 ± 0.00 ^b	0.17 ± 0.00 ^c
Cell growth (g L ⁻¹)	2.79 ± 0.27 ^a	1.81 ± 0.22 ^b	1.10 ± 0.13 ^c
Glucose consumption (g L ⁻¹)	12.71 ± 0.77 ^a	7.66 ± 0.60 ^b	8.09 ± 0.73 ^c
Nitrogen consumption (g L ⁻¹)	0.76 ± 0.15 ^a	1.27 ± 0.27 ^b	0.52 ± 0.23 ^c
HA production (g L ⁻¹)	1.37 ± 0.06 ^a	0.61 ± 0.03 ^b	0.16 ± 0.00 ^c
Y _{P/S} (g g ⁻¹)	0.11 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.00 ^c
Y _{P/X} (g g ⁻¹)	0.49 ± 0.01 ^a	0.34 ± 0.00 ^b	0.13 ± 0.00 ^c
Y _{X/S} (g g ⁻¹)	0.22 ± 0.01 ^a	0.24 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.01 ^b
Y _{Lactate/S} (g g ⁻¹)	0.26 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.01 ^b
Y _{Acetate/S} (g g ⁻¹)	0.10 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.00 ^c
Lactate (g L ⁻¹)	3.25 ± 0.08 ^a	0.93 ± 0.02 ^b	1.17 ± 0.00 ^c
Acetate (g L ⁻¹)	1.23 ± 0.00 ^a	0.51 ± 0.00 ^b	0.15 ± 0.01 ^c
Formate (g L ⁻¹)	0.92 ± 0.03 ^a	-	0.60 ± 0.00 ^b
Ethanol (g L ⁻¹)	-	1.16 ± 0.01 ^a	0.65 ± 0.00 ^b
TPP (g L ⁻¹)	0.60 ± 0.02 ^a	0.28 ± 0.08 ^b	0.09 ± 0.00 ^c
TPP.HA ⁻¹ (g g ⁻¹)	0.40 ± 0.00 ^a	0.45 ± 0.01 ^a	0.79 ± 0.05 ^b
HA average MW (10 ⁴ Da)	0.89 ± 0.10 ^a	0.91 ± 0.12 ^a	1.30 ± 0.08 ^b
pH	5.03 ± 0.02 ^a	4.71 ± 0.01 ^b	4.47 ± 0.01 ^c

Xo – Initial biomass concentration; Cell growth-biomass produced in cultivation, HA production – Hyaluronic acid purified produced in cultivation; Y_{X/S} – Cell growth per glucose consumption; Y_{P/X} – HA production per cell growth; Y_{P/S} – HA production per glucose consumption; Y_{Lactate/S} – Lactate per glucose consumption; Y_{Acetate/S} – Acetate per glucose consumption; TPP – Total proteins and peptides in purified HA.

The same lower-case letters in the same parameter indicate no significant difference according to the Tukey test at 95% confidence.

C:N ratios: 4.1:1 (10.0 g L⁻¹ Carbon (glucose), 31.5 g L⁻¹ Carbon (peptone), 10.0 g L⁻¹ Nitrogen (peptone)), 4.9:1 (10.0 g L⁻¹ Carbon (glucose), 18.3 g L⁻¹ Carbon (peptone), 5.8 g L⁻¹ Nitrogen (peptone)); 6.3:1 (10.0 g L⁻¹ Carbon (glucose), 10.2 g L⁻¹ Carbon (peptone), 3.2 g L⁻¹ Nitrogen (peptone)).

The metabolites formate and ethanol were noted and may be related to the absence of some amino acids in the poor AGG peptone (Table 3). The anoxic conditions resulting from the greater cell aggregation in the presence of HA may be another reason for formate biosynthesis (Chong and Nilsen, 2003). The poor AGG peptone supplies more nitrogen and results in higher cell growth and greater HA production; however, the MW is reduced (Table 3).

The parameter TPP (total proteins and peptides) contained in the purified HA shows the advantages of soy peptones in terms of purity. For the C:N ratios of both peptones, the TPP gradually increased with the increase in the nitrogen content of the culture medium.

Reduced TPP.HA⁻¹ is observed in the poor AGG peptone (Table 3), and this may be related to the hyaluronan network, which leads to a diffusion of macromolecules such as peptides; thus, the higher HA molecular weight may retain a higher concentration of molecules, thereby hindering the purification process (Hascall and Laurent, 1997).

3.3. Molecular weight distribution

The amino acid profile of the peptones is the main factor used to determine the HA average molecular weight, and this difference is not as apparent in terms of C:N ratios, as this small difference may be connected to the lower pH (Table 2 and Table 3). Significant differences in terms of molecular weight distribution are shown in Fig. (1).

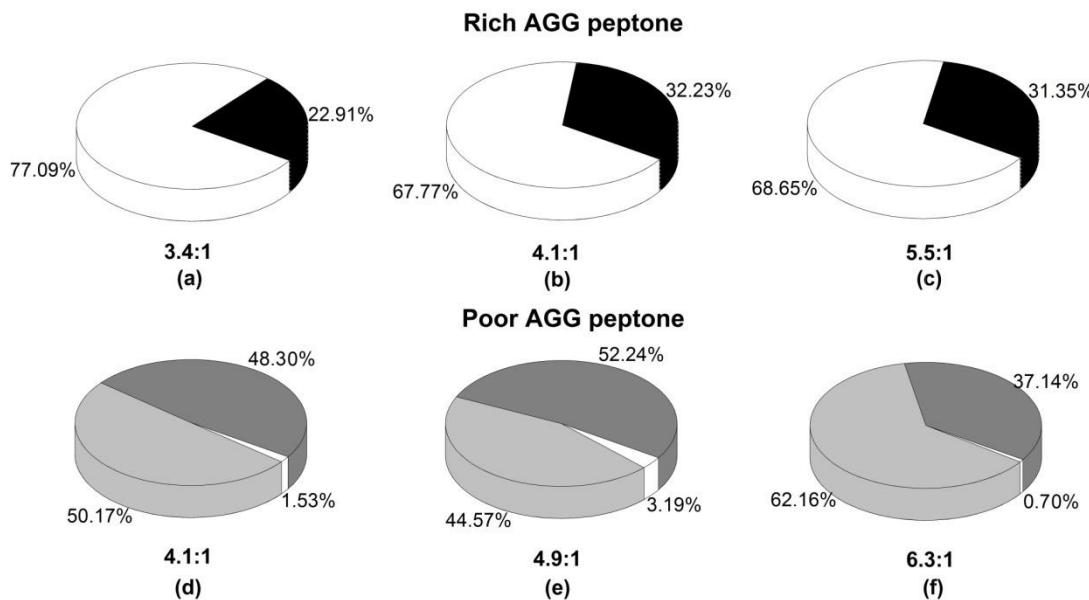


Fig. 1. Molecular weight distribution of HA as function of the C:N ratios for rich and poor AGG peptones. (■) 10^6 Da, (□) 10^5 Da, (▨) 10^4 Da, (■) 10^3 Da.

The profiles of the amino acids peptones, as well the C:N ratios, are important factors for determining HA production. Fig. (2) shows the behavior of HA and the acetate yields ($Y_{P/X}$ and $Y_{Acetate/X}$) relative to the C:N ratios of the peptones studied.

3.4. Analysis of the coefficients $Y_{P/X}$ and $Y_{\text{Acetate}/X}$

In Fig. (2a), the production of acetate does not appear to have an influence on HA yield ($Y_{P/X}$). The increase in the yield ($Y_{P/X}$) is more related to the precursors of HA (UDP-glucuronic (UDPG) and UDP-N-acetylglucosamine (UDPNAG)) than to ATP produced in the cultivation (Chong and Nielsen, 2003).

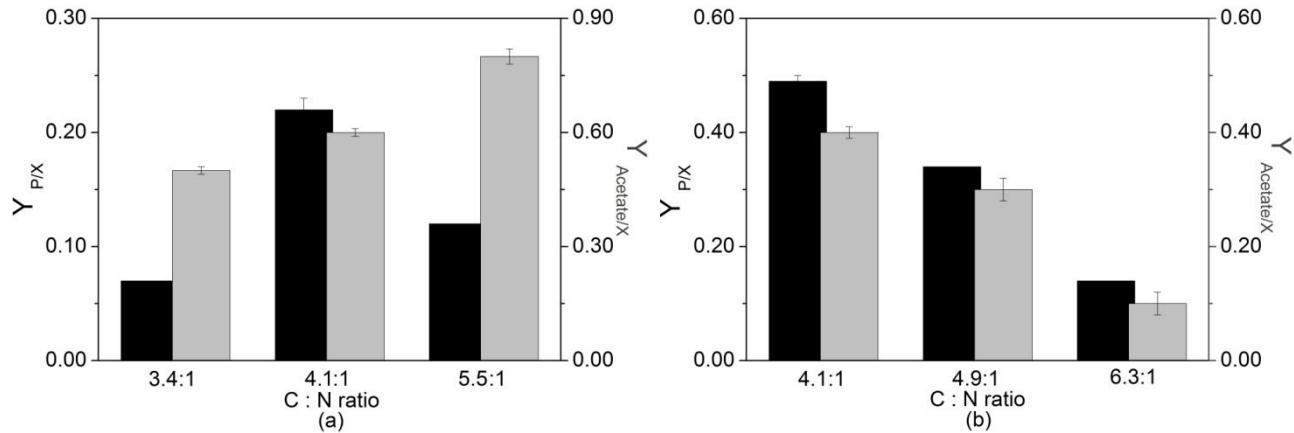


Fig. 2. Effects of the C:N ratios on yields $Y_{P/X}$ and $Y_{\text{Acetate}/X}$ for the rich AGG peptone (a) and the poor AGG peptone (b) during cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 with natural aeration and without pH control. (■) $Y_{P/X}$, (■) $Y_{\text{Acetate}/X}$.

Otherwise, in the absence of free amino acids or a lower $F T^{-1}$ ratio, acetate production with concomitant production of ATP may have positively affected the yield of HA (Fig. 2b), and thus, the lack of essential amino acids may have influenced the HA synthase activity.

3.5. Analysis of the ratio of free and total amino acids

The performance of production in terms of yields and the MW of HA depends not only on the C:N ratio but also on the qualitative and quantitative profile of the amino acids.

A decrease in the ratio $F T^{-1}$ leads to a higher HA yield ($Y_{P/X}$), while an increase in the ratio $F T^{-1}$ leads to an increase in MW; thus, an appropriate balance between the peptides and free amino acids is required. Further studies are necessary to determine the appropriate amount of amino acids and peptides in the culture medium.

4. Conclusions

The composition of amino acids and the ratio between free and total amino acids determine the function of the nitrogen source in the metabolism of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 for the production of hyaluronic acid. These factors also determine the carbon:nitrogen ratio for the best production of hyaluronic acid. The rich AGG peptone stimulates cell growth and the production of HA with a higher molecular weight, whereas the poor AGG peptone stimulates the production of HA with a lower molecular weight. The C:N ratio for higher HA production is lower for the poor AGG peptone.

5. References

1. ARMSTRONG, D. C., JONHS. M. R., 1997. Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced *Streptococcus zooepidemicus*. Queensland: University of Queensland. Appl Environ Microb, v. 63, n. 7, p. 2759–2764.
2. ARMSTRONG, D. C., COONEY, M. J., JOHNS, M. R., 1997. Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. Appl Microbiol Biot, v. 47, n. 3, p. 309–312.
3. BENEDINI, L. J., SANTANA, M. H. A., 2013. Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. Bioresource Technol, v. 130, p. 798–800.
4. CHEN, S. J., CHEN, J. L., HUANG, W. C., CHEN, H. L., 2009. Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. Korean J Chem Eng, v. 26, n. 2, p. 428-432.
5. CHEN, Y. H., WANG, Q., 2009. Establishment of CTAB turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth. Carbohyd Polym, v. 78. p. 178–181.
6. CHONG, B. F., BLANK, L. M., MCLAUGHLIN, R., NIELSEN, L. K., 2005. Microbial hyaluronic acid production. Appl Microbiol Biot, v. 66, n. 4, p. 341-351.
7. CHONG, B. F., NIELSEN, L. K., 2003. Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. J Biotechnol, v. 100, n. 1, p. 33-41.

8. DEANGELIS, P. L., 1999. Hyaluronan synthases: Fascinating glycosyl transferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. *Cell Mol Life Sci*, v. 56, n. 7-8, p. 670–682.
9. DUAN, X. J., NIU, H. X., TAN, W. S., ZHANG, X., 2009. Mechanism analysis of effect of oxygen on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *J Microbiol Biotechn*, v. 19, n. 3, p. 299–306.
10. FEINBERG, R. N., BEEBE, D. C., 1983. Hyaluronate in vasculo genesis. *Science*, v. 220, n. 4602, p. 1177–1179.
11. FERMENTECH MEDICAL LIMITED, Geoffrey M. Dunn, Derek C. Ellwood, Charles Gervase T. Evans, Neil McInnes, Keith J. Smith, Richard G. Yeo. Production of hyaluronic acid.US5563051 A . Oct. 8, 1996.
12. FORRESTER, J. V., BALAZS, E. A., 1980. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology*. v. 40, n. 3, p. 435–446.
13. FROST, S. J., WEIGEL, P. H., 1990. Binding of hyaluronic acid to mammalian fibrinogens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. v. 1034, n. 1, p. 39–45.
14. GUIRARD, B. M., SNELL, E. E., 1962. Nutritional requirements of microorganisms. In: Gunsalus IC, Stanier RY (ed.). *The bacteria*, v. 4. Academic Press, p. 70-71.
15. HASCALL, V. C., LAURENT, T. C., 1997. Hyaluronan: Structure and physical properties <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>. Access: Jan. 10, 2014. Uppsala University, Medicinska vetenskapsområdet, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry and Microbiology.
16. HEENAN, C., ADAMS, M., HOSKEN, R., FLEET, G., 2002. Growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in vegetarian food products. *Food Sci Technol Leb*. v. 35, n. 2, p. 171-176.
17. JIANG, D., LIANG, J., FAN, J., YU, S., CHEN, S., LUO, Y., PRESTWICH, G. D., MASCARENHAS, M. M., GARG, H. G., QUINN, D. A., HOMER, R. J., GOLDSTEIN, D. R., BUCALA, R., LEE, P. J., MEDZHITOV, R., NOBLE, P. W., 2005. Regulation of lung injury and repair by toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med*. v. 11, n. 11, p. 1173–1179.

18. LAI, Z. W., RAHIM, R. A., ARIFF, A. B., MOHAMAD, R., 2011. Medium formulation and impeller design on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. Afr J Microbiol Res. v. 5, n. 15, p. 2114-2123.
19. LEE, G. Y., HA, S. J., JUNG, J. H., SEO, D. H., PARK, J. Y., KIM, S. R., PARK, N. W., KWEON, D. K., PARK, S. H., PARK, C. S., 2009. Effect of non-animal-derived nitrogen sources on the production of hyaluronic acid by *Streptococcus sp.* KL0188. J Korean Soc Appl Bi. v. 52, n. 3, p. 283-289.
20. LIU, J., XING, J., CHANG, T., MA, Z., LIU, H. 2005. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. Process Biochem, v. 40, n. 8, p. 2757-2762.
21. LIU, L., WANG, M., DU, G., CHEN, J., 2008. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. Lett Appl Microbiol.v.46, n. 3, p 383-388.
22. MCBRIDE, W. H., BARD, J. B., 1979. Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytolysis. J Exp Med, v. 149, n. 2, p. 507–515.
23. OGRODOWSKI, C. S., HOKKA, C. O., SANTANA, M. H. A., 2005. Production of hyaluronic acid by *Streptococcus*. Appl Biochem Biotech. v. 122, n. 1-3, p. 753-76.
24. O' REGAN, M., MARTINI, I., CRESCENZI, F., DE LUCA, C., LANSING, M., 1994. Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. Int J Biol Macromol. v. 16, n. 6, p. 283-286.
25. PATEL, H., MACKINTOSH, D., AYLING, R., NICHOLHAS, R., FIELDER, M. A., 2008. A novel medium devoid of ruminant peptone for high yield growth of *Mycoplasma ovipneumoniae*. Vet Microbiol. v. 127, n. 3, p. 309-314.
26. PIRES, A. M. B., SANTANA, M. H. A., 2010 a. Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. Appl Biochem Biotech. v.162, n. 6, p. 1751–1761.
27. PIRES, A. M. B., EGUCHI, S. Y., SANTANA, M. H. A., 2010 b. The influence of mineral ions on the microbial production and molecular weight of hyaluronic acid. Appl Biochem Biotech, v.162, n. 8, p. 2125-2135.

28. PUMMILL, P. E., DEANGELIS, P. L., 2003. Alteration of polysaccharide size distribution of a vertebrate hyaluronan synthase by mutation. *J Biol Chem*, v. 278, n. 22, p. 19808–19814.
29. RILLA, K., SIISKONEN. H., SPICER, A. P., HYTTINEN, J. M. T., TAMMI, M. I., TAMMI. R. H., 2005. Plasma membrane residence of hyaluronan synthase is coupled to its enzymatic activity. *J Biol Chem*. v. 280, n. 36, p. 31890 – 31897.
30. SUGIMURA, Y., SUZUKI, Y., 1988. A high-temperature catalytic oxidation method for the determination of non-volatile dissolved organic carbon in seawater by direct injection of a liquid sample. *Mar Chem*. v. 24, n. 2, p.105-131.
31. VAZQUEZ, J. A., MONTEMAYOR, M.I., FRAGUAS, J., MURADO, M. A., 2009. High production of hyaluronic and lactic acids by *Streptococcus zooepidemicus* in fed-batch culture using commercial and marine peptones from fishing by-products. *Biochem Eng J*, v. 44, n. 2, p.125–130.
32. ZHANG, J., DING, X., YANG, L., KONG, Z., 2006. A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01. *Appl Microbiol Biot*. v. 72, n. 1, p 168-172.

5.2 Effects of soy peptone composition on the kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*

Oliveira, R.C. and Santana, M. H. A.*

University of Campinas, School of Chemical Engineering,
Av. Albert Einstein 500, 13083-852 Campinas-SP, Brazil

ABSTRACT – Hyaluronic acid (HA) from microbial sources has been successfully used in pharmaceutical and medical applications. Recently, the suitability of peptones for microbial growth and HA production has resulted in the replacement of yeast extract and animal-derived nutrients by peptones. Although different peptones from various sources have been evaluated for HA production, no association between performance and composition has been observed. Here, we compare two soy peptones with different levels of aspartate, glutamine and glutamate (AGG). Carbon/nitrogen ratios of 4.1/1 for rich AGG peptone and 4.9/1 for poor AGG peptone were used in cultures with forced aeration. The logistic model, a typical model for lactic bacteria (Verhulst), was used to represent cell growth, and the Leudeking-Piret-like model was used to represent glucose consumption. The modified Verhulst and the logistic models incorporated Leudeking-Piret models were used for HA production. The models fitted the experimental data with correlation coefficients (R^2_{adj}) above 0.93 for both peptones. The kinetic parameters showed that despite differences of approximately 10% in the maintenance coefficient, $Y_{P/X}$, the yield, $Y_{X/S}$, was higher for poor AGG peptone than for rich AGG peptone. No lag time was observed for HA production with either peptone. These results suggest different mechanisms of substrate utilization for cell growth, maintenance and HA production. Therefore, peptones are not simply nitrogen sources but also play an important role in HA production.

Key words: hyaluronic acid, *Streptococcus zooepidemicus*, unstructured models, submerged fermentation, amino acids

*Corresponding author. Email: mariahelena.santana@gmail.com, Tel.: +55 19 3521 3921; fax: +55 19 3521 3890

Introduction

Hyaluronic Acid (HA) is a natural polysaccharide composed of D-glucuronic acid and N-acetyl glucosamine linked by β -1-3 and β -1-4 glycosidic bonds. Due to its physicochemical and biological properties, HA has been widely used in the cosmetic and medical industries as a lubricant as well as a viscous and viscoelastic fluid for healing (Kogan et al. 2007).

Strains of *Streptococcus* produce HA to protect against environmental stresses (Cleary and Larkin 1979). During cultivation, HA that is produced is extruded through the cell membrane, forming a thick layer around cells that diffuses into the medium (Cohen et al. 2003).

Since 1990, the production of microbial HA has been widely studied, with glucose and yeast extract as carbon and nitrogen sources, respectively. HA biosynthesis is associated with cell growth; however, HA biosynthesis and cell growth must compete for energy during fermentation (Gao et al. 2006). Therefore, many studies have focused on identifying operating conditions that decrease the energy consumed for cell growth, enhancing the production of HA at desired molecular weights (Armstrong et al. 1997; Ellwood et al. 1996; Chong et al. 2005; Ogrodowski et al. 2005; Zhang et al. 2006; Liu et al. 2008).

An optimal ratio between carbon and nitrogen sources is necessary to achieve high yields of HA. Pires and Santana (2010 a) studied the metabolic effects of initial glucose concentration (IGC) on cultivations of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 for HA production. Fermentations were performed under natural and forced aeration without pH control. Assays under forced aeration with a continuous air supply (2 vvm), agitation rate of 250 rpm and temperature concentration of 25 g L⁻¹ is the optimal initial glucose concentration for a glucose/nitrogen ratio of approximately 4.3/1 (glucose/yeast extract). Don and Shoparwe (2010) found that *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 tolerated up to 40 g L⁻¹ glucose; this glucose concentration resulted in the best HA yield ($Y_{P/X}$) without inhibiting cultivations with forced aeration and pH control. In these cultivations, glucose was the carbon source and yeast extract was the nitrogen source in the culture medium.

Recently, other carbon and nitrogen sources have been considered. Vázquez et al. (2010) used mussel processing wastewater as a carbon source and tuna peptone from viscera residue as a protein substrate for the production of HA and lactic acid by *S. zooepidemicus* in batch fermentation. Pires et al. (2010 b) reported the microbial production of HA from agricultural derivatives at a glucose/nitrogen ratio of 7.8/1. Of these agricultural derivatives, cashew apple juice was found to be a promising medium for the production of HA (0.89 g L^{-1}) with low molecular weight ($1.92 \times 10^4 \text{ Da}$).

Lee et al. (2009) studied the effects of sixteen non-animal nitrogen sources for the cultivation of *Streptococcus sp.* KL0188 for HA production under natural and forced aeration. Soy peptones showed the best results in terms of HA production (1.46 g L^{-1}) in fermentations under natural aeration. Benedini and Santana (2013) demonstrated the efficiency of soy peptone first with seed cultures in Petri plates and then in submerged fermentation with cultivations of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 under natural aeration for HA biosynthesis.

An important tool for evaluating and controlling production and cell growth is mathematical modeling (Vázquez and Murado 2008). Structured models based on intracellular physiological state can be used to describe dynamic cultivation conditions. Cooney et al. (1999) used a structured two-compartment to predict cell growth, glucose consumption and product formation in aerobic and anaerobic cultivations. Glucose, yeast extract and a mixture of inorganic salts were used as the culture medium for cultivations of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246. This model was able to satisfactorily fit the transient consumption of substrates and product biosynthesis.

Unstructured models, most commonly used to describe cell growth, are derived from logistic equations (Mercier et al. 1992; Parente and Hill 1992) and are crucial for understanding various phenomena in biotechnological processes. Logistic models independent of substrate concentration are easily managed and are suitable for fitting cell growth and product formation profiles.

Logistic equations were first proposed by Verhulst (1838) to describe the stages of population growth. Vázquez et al. (2009) considered a modified Verhulst model to fit the kinetic behavior of HA biosynthesis. Peptones from fish viscerates were used as the nitrogen source in cultivations of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35426 under forced

aeration, leading to high molecular weight HA. The model proposed for HA biosynthesis was accurate and statistically robust.

Huang et al. (2007) used the Leudeking-Piret model for HA biosynthesis by cultivating *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 in a culture medium containing glucose, yeast extract and inorganic salts. The model fit the experimental data of HA biosynthesis satisfactorily, accounting for the lag phase. Don and Shoparwe (2010) proposed the logistic equations of Verhulst for cell growth, with the logistic incorporating a Leudeking-Piret-like equation (Pirt 1965) for glucose consumption and the logistic Leudeking-Piret model with time delay for HA biosynthesis in cultivations of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. These models fit the experimental data satisfactorily for the various initial glucose concentrations studied.

Although promising results have been obtained with marine or vegetable peptones for HA production, the influence of peptone composition on performance has not been considered. As observed by Guirard and Snell (1962), different components of the nitrogen source (e.g., proteins, free amino acids and peptides) in the culture medium could produce distinct results in terms of transport efficiency, as cellular growth responses to proteins or individual peptides may be different compared to free amino acids. Additionally, peptones do not simply represent a source of organic nitrogen but are instead a source of amino acids or peptides with specific roles (Aasen et al. 2000; Jensen and Hammer 1993).

Vegetable peptones have advantages for medical applications, as they reduce the risk of adverse effects and require lower costs to purify compared to marine peptones. In this context, the main aim of this work is to compare the effects of peptone composition on the kinetics of HA production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 in batch cultivation. The two commercial soy peptones investigated in this work had different levels of aspartate, glutamine and glutamate (AGG) as well different percentages of free and bound amino acids.

The logistic model of Verhulst for cell growth, the modified Verhulst and the logistic-incorporated Leudeking-Piret models for HA production as well as the Leudeking-Piret-like equation for glucose consumption were used to estimate the relevant parameters that characterize the kinetic behavior of the microbial cultivation. The ordinary differential equations were solved by a subroutine implementing 4th order Runge-Kutta Fehlberg, an

algorithm written in Fortran - 77. Origin Pro® v.8 SRO (OriginLab Corp, USA) and a Levenberg-Marquardt (L-M) algorithm (Marquardt, 1963) were used to fit the experimental data in an iterative procedure that minimizes the residual sum of squares.

Material and methods

Microorganism

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920 was kept frozen at -80 °C in ampoules with glycerol 10% as a cryoprotectant. The microorganism was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

Inoculum

An ampoule containing a culture of *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* ATCC 39920 was thawed and streaked on Petri plates containing soy peptone (67 g L^{-1}) and bacteriological agar (Benedini and Santana 2013). The plates were incubated at 37 °C for 24 h. Colonies were first transferred to Erlenmeyer flasks containing 25 mL of culture medium and incubated for 12 h at 37 °C in a reciprocal shaker at 150 rpm, then transferred to Erlenmeyer flasks containing 250 mL culture medium and incubated similarly. The culture medium consisted of glucose (25 g L^{-1}) and soy peptone with 5.8 g L^{-1} of nitrogen (Kjeldahl).

Soy peptones

Soy peptones with different concentrations of free and total amino acids were used; peptone compositions are shown in Table (1). The main difference between the peptones are their concentrations of aspartate, glutamine and glutamate (AGG). The peptones were named “rich AGG” or “poor AGG” depending on their concentration of AGG amino acids.

Table 1 Free and total amino acids present in the peptones.

Amino acid	Rich AGG			Poor AGG		
	Total ^a	Free ^a	F T ⁻¹ ^b	Total ^a	Free ^a	F T ⁻¹ ^b
Alanine	2.50	1.00	0.40	2.20	0.09	0.04
Arginine	3.40	1.30	0.38	3.50	0.33	0.09
Aspartate	5.20	0.50	0.10	-	0.07	-
Cysteine	-	0.10	-	0.50	-	-
Glutamine	0.70	0.20	0.29	-	0.03	-
Glutamate	12.60	4.40	0.35	-	0.15	-
Glycine	2.20	0.30	0.14	2.10	0.09	0.04
Histidine	0.70	0.20	0.29	1.30	0.05	0.04
Isoleucine	2.30	0.80	0.35	2.20	0.02	0.01
Leucine	3.40	1.70	0.50	3.80	0.30	0.08
Lysine	3.70	0.80	0.22	3.10	0.23	0.07
Methionine	-	0.30	-	0.50	0.09	0.18
Phenylalanine	2.20	1.10	0.50	2.50	0.12	0.04
Proline	2.30	0.20	0.09	2.50	0.01	0.00
Serine	1.25	0.55	0.44	2.50	0.11	0.04
Threonine	2.00	0.60	0.30	2.10	0.06	0.03
Tryptophan	-	0.30	-	-	0.06	-
Tyrosine	1.20	0.50	0.42	2.00	0.05	0.02
Valine	2.50	1.00	0.40	2.20	0.09	0.04

AGG – Aspartate, Glutamine and Glutamate amino acids

Rich AGG - Organotechnie SAS (La Courneuve, France) – Soy peptone E-110

Poor AGG - Sigma-Aldrich Co (Saint Louis, MO, USA) - Peptone Hy-Soy® T - P6463

F T⁻¹- Free amino acids: Total amino acids ratioa - (g 100 g⁻¹), b - (g g⁻¹)

Total nitrogen

Total protein and peptide (TPP) content was determined using the bicin-choninic acid method (BCA, Pierce/Thermo Scientific, Rockford, IL) (data not shown). Nitrogen (Kjeldahl) was calculated by dividing the TPP content by 6.25 as recommended by Ordinance No.360 (Anvisa).

Total carbon in the peptones

Total organic carbon (TOC) concentration was determined using a TOC-L (Shimadzu, Kyoto, Japan) analyzer with a catalytic oxidation method (Sugimura and Suzuki 1988).

Fermentation

An inoculum was transferred at 10% (v/v) to a fermentation system BioFlo III 3 L (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ, USA) with 2.5 L of culture medium. The fermentor was run for 24 h. Temperature and agitation rate were maintained at 37 °C and 250 rpm, respectively, with continuous air supply at 2 vvm and no pH control. Cell growth, HA and glucose concentrations were determined in samples withdrawn at two-hour intervals. Analyses were performed in triplicate.

HA Separation and Purification

The culture broth was centrifuged at 22400 ×g for 20 min. The cell-free broth was treated with ethanol 1.5:1 v/v (ethanol/supernatant). The solution was refrigerated at 4 °C for 1 h to precipitate HA. The precipitated HA was dissolved in a 0.15 mol L⁻¹ NaCl solution. This process of precipitation and dissolution was repeated twice.

Analytical Methods

Cell growth: Cell growth was determined using a gravimetric method. The culture broth was centrifuged in tubes previously dried at 60 °C and weighed. After centrifugation, the supernatant was discarded, and the cell pellet was washed and centrifuged twice with deionized water. Finally, the cells were dried at 60 °C and weighed.

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

HA concentration: A turbidimetric method (Chen et al. 2009) was used to determine HA content after purification. Sodium hyaluronate (Hylumed™) from Genzyme Corporation (Cambridge, MA, USA) was used as a standard.

Table (2) outlines the variables and parameters used in the model equations.

Table 2 Symbols used in equations (1 – 25).

H -	Hyaluronic acid concentration	(g L ⁻¹)
Ho -	Initial hyaluronic acid concentration	(g L ⁻¹)
Hf -	Final hyaluronic acid concentration	(g L ⁻¹)
S -	Glucose concentration	(g L ⁻¹)
So -	Initial glucose concentration	(g L ⁻¹)
X -	Cell concentration	(g L ⁻¹)
Xo -	Initial cell concentration	(g L ⁻¹)
Xf -	Final cell concentration	(g L ⁻¹)
vmx -	Maximum cell growth rate	(g L ⁻¹ h ⁻¹)
vhm -	Maximum hyaluronic acid biosynthesis rate	(g L ⁻¹ h ⁻¹)
μmx -	Specific maximum cell growth rate	(h ⁻¹)
μmh -	Specific maximum hyaluronic acid biosynthesis rate	(h ⁻¹)
ms -	Maintenance coefficient for cell growth	(g g ⁻¹ h ⁻¹)
λx -	Cell growth lag phase	(h)
λh -	Hyaluronic acid biosynthesis lag phase	(h)
Y_{XS} -	Yield of biomass per glucose consumed	(g g ⁻¹)
Y_{PX} -	Yield of hyaluronic acid per biomass	(g g ⁻¹)

Mathematical models

The logistic model first reported by Verhulst (1838) describes the stages of population growth and has been used by many to model the growth of lactic acid bacteria (Mercier et al. 1992; Parente and Ricciardi 1994; Vásquez and Murado 2008).

Eq. (1) allows kinetic calculations of the cell growth profile.

$$\frac{dX}{dt} = \mu mx \cdot X \cdot \left(\frac{Xf - X}{Xf} \right) \quad (1)$$

Integrating Eq. (1) between (Xo)→(Xf) and (0)→(t) results in:

$$X = \frac{Xf}{1 + \exp(c - \mu mx \cdot t)} \quad c = \ln \left(\frac{Xf}{Xo} - 1 \right) \quad (2)$$

The maximum cell growth rate (v_{mx}) is the slope of the line tangent to the inflection point (ti). Thus, by equating zero with the second derivative of Eq. (1) and by equating (t) with the inflection point (ti), Eq. (4) can be obtained.

$$\frac{d^2X}{dt^2} = 0 \xrightarrow{t=ti} -(1 + e^{c - \mu_{mx} \cdot ti}) + 2 \cdot (1 + e^{c - \mu_{mx} \cdot ti}) = 0 \quad (3)$$

$$\frac{d^2X}{dt^2} = 0 \xrightarrow{t=ti} ti = \frac{c}{\mu_{mx}} \quad (4)$$

The maximum cell growth rate (v_{mx}) can be calculated with Eq. (5).

$$v_{mx} = \left(\frac{dX}{dt} \right)_{ti} = \frac{X_f \cdot \mu_{mx} \cdot e^{c - \mu_{mx} \cdot ti}}{(1 + e^{c - \mu_{mx} \cdot ti})^2} = \frac{X_f \cdot \mu_{mx} \cdot e^{\frac{c - \mu_{mx} \cdot ti}{\mu_{mx}}}}{(1 + e^{\frac{c - \mu_{mx} \cdot ti}{\mu_{mx}}})^2} = \frac{X_f \cdot \mu_{mx}}{4} \quad (5)$$

An expression for the lag phase of cell growth (λ_x) can be defined as the intersection of the tangent to the inflection point (ti) with the abscissa (Vásquez and Murado 2008).

When (t) is equal to (ti) in Eq. (6) and the tangent equation (Eq. 7) is null, (t) = (λ_x), allowing (λ_x) to be calculated with Eq. (8).

$$X(ti) = X \Big|_{t=ti} = \frac{X_f}{1 + \exp(c - \mu_{mx} \cdot (c / \mu_{mx}))} = \frac{X_f}{1 + e^0} = \frac{X_f}{2} \quad (6)$$

$$X(t) = X(ti) + \left(\frac{dx}{dt} \right)_{t=ti} \cdot (t - ti) = \frac{X_f}{2} + v_{mx} \cdot (t - ti) = 0 \quad (7)$$

$$\lambda_x = \frac{v_{mx} \cdot ti - \frac{X_f}{2}}{v_{mx}} = \frac{\frac{X_f \cdot \mu_{mx}}{4} \cdot \frac{c}{\mu_{mx}} - \frac{X_f}{2}}{\frac{X_f \cdot \mu_{mx}}{4}} = \frac{c - 2}{\mu_{mx}} \quad (8)$$

Finally, inserting Eq. (5) and Eq. (8) into Eq. (2) allows the kinetic profile of cell concentration (X) to be calculated with Eq. (9):

$$X = \frac{X_f}{1 + \exp\left[2 + \frac{4 \cdot \nu m x}{X_f} \cdot (\lambda x - t)\right]} \quad (9)$$

If the parameters (μm), (X) and (λx) are redefined in a modified Verhulst model, the profile of HA biosynthesis can be described by Eq. (10) and Eq. (11) (Vásquez and Murado 2008).

$$\frac{dH}{dt} = \mu m h \cdot H \cdot \left(\frac{H_f - H_o}{H_f} \right) \quad (10)$$

$$H = \frac{H_f}{1 + \exp\left[2 + \frac{4 \cdot \nu m h}{H_f} \cdot (\lambda h - t)\right]} \quad (11)$$

HA biosynthesis can also be described by a Luedeking-Piret model (Huang et al. 2007).

$$\frac{dH}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (12)$$

$$\alpha = Y_{P/X}; \beta = 0$$

The expression in Eq. (12) has been used to predict product biosynthesis profiles for many types of cultivations (Mulchandani et al. 1988; Klimek et al. 1980; Vásquez and Murado 2008; Don and Shoparwe 2010). Eq. (12) allows product formation to be classified as growth associated ($\alpha \neq 0; \beta = 0$), non growth associated ($\alpha = 0; \beta \neq 0$) or mixed growth associated ($\alpha \neq 0; \beta \neq 0$). HA biosynthesis is growth associated, making the yield ($Y_{P/X}$) an appropriate parameter for the empirical constant (α) (Don and Shoparwe 2010).

$$\frac{dH}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} \quad (13)$$

$$\int_{Ho}^H dH = Y_{P/X} \int_{Xo}^X dx \quad (14)$$

$$(H - Ho) = Y_{P/X} (X - Xo) \quad (15)$$

$$H = Y_{P/X} (X - Xo) + Ho \quad (16)$$

Replacing Eq. (9) in Eq. (16) yields the HA production equation:

$$H = Y_{P/X} \left[\frac{Xf}{1 + \exp \left[2 + \frac{4 \cdot v m x}{Xf} \cdot (\lambda x - t) \right]} \right] - Y_{P/X} Xo + Ho \quad (17)$$

Glucose consumption can be calculated by incorporating the logistic model into a Leudeking–Piret-like equation (Don and Shoparwe 2010) as shown in Eq. (18).

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Yx/s} \cdot \frac{dX}{dt} + ms \cdot X \quad (18)$$

Integration of Eq. (18) leads to:

$$-\int_{So}^S dS = -\frac{1}{Yx/s} \cdot \int_{Xo}^X dX + \int_0^t ms \cdot X \cdot dt \quad (19)$$

$$S = So - \frac{1}{Yx/s} \cdot (X - Xo) - ms \int_0^t X \cdot dt \quad (20)$$

By incorporating Eq. (9) into Eq. (20) and integrating from $(0) \rightarrow (t)$, we can obtain an equation for glucose consumption (Eq. 21).

$$\begin{aligned} S &= So - \frac{1}{Yx/s} \cdot \left[\frac{Xf}{1 + \exp\left(2 + \frac{4 \cdot vmx}{Xf}(\lambda x - t)\right)} - Xo \right] \\ &\quad - \frac{ms \cdot Xf^2}{4 \cdot vmx} \cdot \ln \cdot \left[\frac{Xo \cdot \exp\left(\frac{4 \cdot vmx}{Xf} - 1\right) + Xf}{Xf} \right] \end{aligned} \quad (21)$$

Initial estimations and solving

Initial estimations of kinetic parameters were obtained first using Eqs. (22), (23), (24) and (25), (Doran 1995). Eq. (9) was used to describe cell growth, Eq. (11) and Eq. (17) used to describe HA biosynthesis and Eq. (21) used to describe glucose consumption. OriginPro® v.8 SRO (OriginLab Corp, USA) and a Levenberg-Marquardt (L-M) algorithm (Marquardt 1963) were used to fit these parameters using an iterative procedure to minimize the residual sum of squares.

$$\frac{dP}{dX} = Y_{p/X} \quad (22)$$

$$\frac{dX}{dS} = Y_{x/S} \quad (23)$$

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (24)$$

$$\mu_H = \frac{1}{X} \cdot \frac{dH}{dt} \quad (25)$$

Results and discussion

Table (3) shows the kinetic parameters for cell growth, glucose consumption and HA biosynthesis in cultivations of *S. zooepidemicus* ATCC 39920 with rich and poor AGG soy peptones.

Table 3 Kinetic parameters for cell growth (Eq. 9), glucose consumption (Eq. 21) and HA biosynthesis (Eqs. 11, 17) in batch cultivations with rich and poor AGG peptones.

Kinetic Parameters			
Glucose consumption		Rich AGG	Poor AGG
ms -	(g g ⁻¹ h ⁻¹)	0.03	0.06
$Y_{X/S}$ -	(g g ⁻¹)	0.20	0.41
R^2adj -		0.941	0.956
Cell growth			
X_o -	(g L ⁻¹)	0.47	0.43
X_f -	(g L ⁻¹)	4.86	3.38
μ_{mx} -	(h ⁻¹)	0.18	0.41
v_{mx} -	(g L ⁻¹ h ⁻¹)	0.22	0.34
λ_x -	(h)	1.27	0.00
R^2adj -		0.951	0.980
HA biosynthesis		Modified Verhulst	
H_o -	(g L ⁻¹)	0.06	0.35
H_f -	(g L ⁻¹)	0.43	0.68
μ_{mh} -	(h ⁻¹)	0.21	0.17
v_{mh} -	(g L ⁻¹ h ⁻¹)	0.02	0.03
R^2adj -		0.966	0.981
Luedeking-Piret			
$Y_{P/X}$ -	(g g ⁻¹)	0.09	0.10
R^2adj -		0.951	0.933

Experimental Parameters: Rich AGG - $S_0 = 25.00$, $H_o = 0.06$, $H_f = 0.43$, $X_o = 0.35$, $X_f = 4.86$, $\mu_{mx} = 0.23$, $\mu_{mh} = 0.02$, $Y_{X/S} = 0.18$, $Y_{P/X} = 0.09$. Poor AGG - $S_0 = 25.00$, $H_o = 0.35$, $H_f = 0.68$, $X_o = 0.26$, $X_f = 3.38$, $\mu_{mx} = 0.36$, $\mu_{mh} = 0.03$, $Y_{X/S} = 0.24$, $Y_{P/X} = 0.10$.

Models used – Verhulst (cell growth), Luedeking and Piret-like equation (glucose consumption), modified Verhulst and Luedeking-Piret (Hyaluronic acid biosynthesis).

Cell growth and glucose consumption

As shown in Table (3), the use of the parameter (v_{mx}) in mathematical models is more robust and less sensitive to experimental errors (Vázquez and Murado 2008). Differences in maximum specific cell growth rates (μ_{mx}) are consequences of the greater exponential phase slope of cell growth in culture medium containing poor AGG peptone (Fig. 1b). A lag phase (λ_x) was not identified for cultivations with poor AGG peptone, while medium with rich AGG resulted in a lag phase of 1.27 h (Table 3).

These differences reflect the role of AGG amino acids on cell growth as well as the efficiency of transmembrane transport of free or peptide amino acids as described by Guirard and Snell (1962).

The main difference in the kinetic parameters was in the yield of cell growth on glucose ($Y_{X/S}$), with lower glucose consumption in cultivations with poor AGG peptone (Table 3). This difference may be explained by the fact that poor AGG peptone contains more carbon (15.54%) than rich AGG peptone (14.35%). Based on the fact that organic nitrogen sources can supply a significant proportion of the carbon for cell growth (O'Regan et al. 1994), increased carbon uptake from glucose is necessary to replace the lack of nitrogen source-derived carbon in rich AGG peptone.

A higher maintenance coefficient (m_s) was observed with culture medium containing poor AGG peptone. Overall maintenance decreases with decreasing specific cell growth rate (μ) and decreasing specific death rate (Van Bodegom 2007), a trend that is in agreement with the results obtained with culture medium containing rich AGG peptone (Table 3). Sinclair and Kristiansen (1987) reported that the maintenance coefficient (m_s) can range from 0.02 to 4.00 g⁻¹ h⁻¹ depending on the environmental conditions and rate of cell growth.

The fits of experimental cell growth and glucose consumption profiles had high correlation coefficients (R^2_{adj}) with values above of 0.94 for both peptones (Table 3).

HA biosynthesis

The kinetic behavior of cell growth and glucose consumption was reflected in HA biosynthesis. Table (3) shows that the amount of HA produced was similar for both peptones when the initial product produced prior to the actual fermentation step was

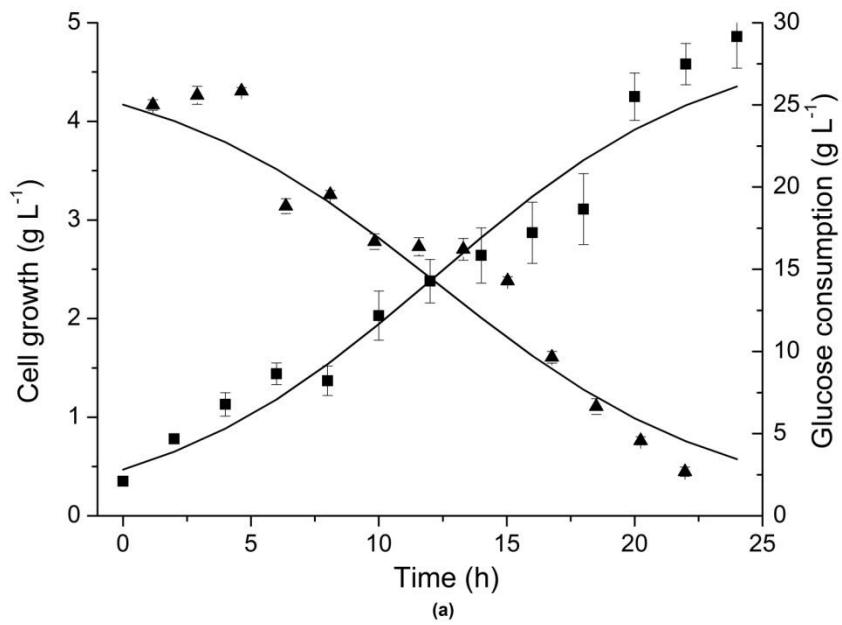
considered. The experimental data showed no lag time for HA biosynthesis, and time lag (λ_h) was not calculated by the modified Verhulst model.

The yield of HA concentration per cell growth ($Y_{P/X}$) estimated by the logistic-incorporated Leudeking-Piret-like model was similar for both peptones. The modified Verhulst model produced a better fit for HA biosynthesis, with R^2 adj values of 0.966 and 0.981 for rich and poor AGG peptone, respectively (Table 3).

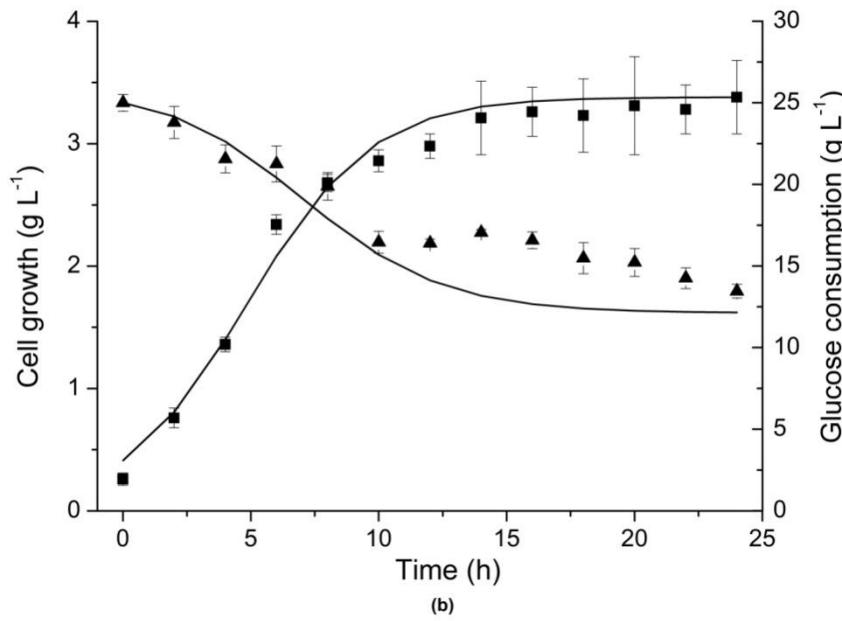
Kinetic profiles

Figs. (1) and (2) summarize the behavior of cell growth, glucose consumption and HA biosynthesis using profiles calculated from the estimated kinetic parameters for both peptones.

Fig. (1a) shows a continual decrease in glucose, with glucose concentrations reaching 1.37 g L⁻¹ after 24 hours of cultivation in rich AGG peptone (Fig. 2a). Low levels of glucose could prevent increases in the yield $Y_{P/X}$. According to Chong et al. (2005), when conditions become severe in the absence of glucose, HA production declines first, followed by a decline in HA molecular weight.



(a)



(b)

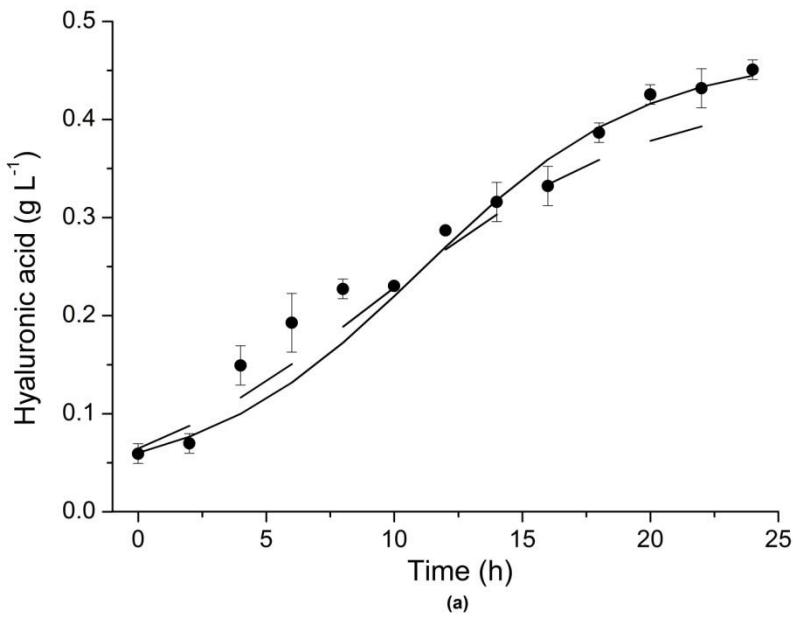
Fig. 1 Cultivations of *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 at a C/N ratio of 4.1/1 for rich AGG peptone (a) and 4.9/1 for poor AGG peptone (b), at 2vvm with an agitation rate of 250 rpm over 24 h without pH control. Cell growth (■) and glucose consumption (▲) represent experimental data. Continuous lines represent the predicted profiles calculated from the estimated parameters

The profiles of HA biosynthesis (Figs. 2a and 2b) indicate that the models fit the experimental data well.

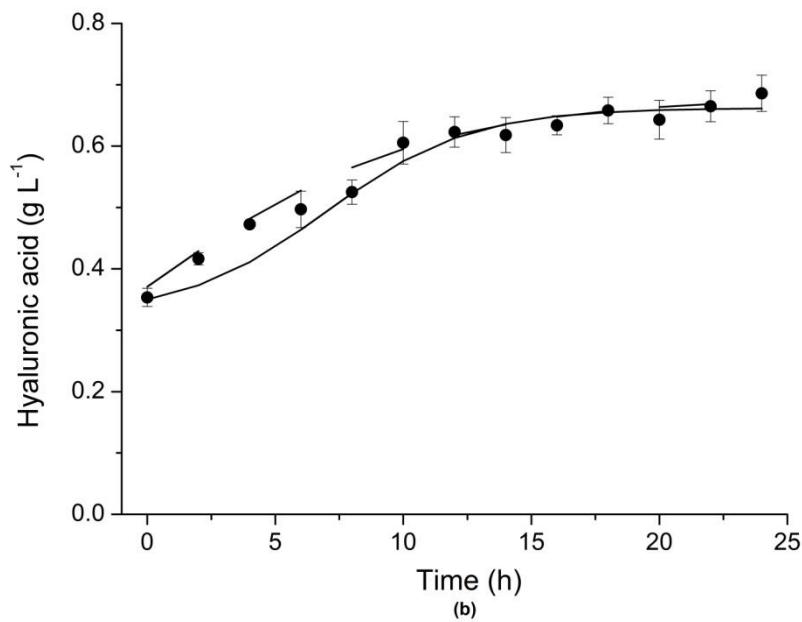
In parallel with cell growth (Fig. 1a), HA was produced over the 24 h of cultivation with rich AGG peptone (Fig. 2a), while cell growth and HA biosynthesis stopped after approximately 10 h of cultivation with poor AGG peptone. The higher expenditure of substrate for maintenance (Table 3), product inhibition or the stress caused by excess oxygen in addition to the low concentration of AGG amino acids may have caused the behavior observed with poor AGG peptone.

In both cases, the kinetic behavior of peptones must be explored further by quantifying lactic acid and acetic acid intermediaries as well as HA molecular weight to better understand the mechanisms involved in HA biosynthesis. In addition, the influence of amino acids in their free or peptide forms must also be investigated.

Comparing our results with soy peptone to those obtained by Pires and Santana (2010 a) for the cultivation of the same strain of *Streptococcus zoepidemicus* with similar initial glucose and nitrogen concentrations but with yeast extract, we find that the yield $Y_{P/X}$ is approximately 16 times higher for the latter case. Therefore, yeast extract and soy peptones are not simply sources of nitrogen, but they have specific interactions with cells such that composition plays an important role in the production of HA.



(a)



(b)

Fig. 2 Cultivations of *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* ATCC 39920 at a C/N ratio of 4.1/1 for rich AGG peptone (a) and 4.9/1 for poor AGG peptone (b), aeration at 2vvm and an agitation rate of 250 rpm over 24 h without pH control. HA biosynthesis (●) represent the experimental data. Continuous lines represent the predicted parameters by the Luedeking-Piret model, and traced lines represent the data predicted by the modified Verhulst model

Conclusions

The AGG composition of soy peptones produced significant differences in the kinetics of cell growth, glucose consumption and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. Cell growth and HA production occurred over 24 h for rich AGG peptone, while both cell growth and product formation were suppressed after approximately 10 h for poor AGG peptone. The Verhust and Leudeking-Piret-like models represented well the experimental data of cell growth and glucose consumption for rich and poor AGG peptones, The Luedeking-Piret and modified Verhulst models also fit the experimental data for HA biosynthesis properly for both peptones.

References

- AASEN, I. M., MØRETRØ, KATLA, T., AXELSSON, L., STORRØ, I., (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl Microbiol Biot.* v. 53, n. 2, p.159–166. doi: 10.1007/s002530050003
- ARMSTRONG, D. C., COONEY, M. J., JOHNS, M. R., (1997). Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Appl Microbiol Biot.* v. 47, n. 3, p. 309–312. doi: 10.1007/s002530050932
- BENEDINI, L. J., SANTANA, M. H. A., (2013). Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. *Bioresource Technol.* v. 130, p. 798–800. doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.161
- CHEN., Y. H., WANG, Q., (2009). Establishment of CTAB turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth. *Carbohydr Polym.* v. 78. n. 1, p. 178–181. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.04.037
- CHONG, B. F., BLANK, L. M., MCLAUGHLIN, R., NIELSEN, L. K., (2005). Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biot.* v. 66, n. 4, p. 341-351. doi: 10.1007/s00253-004-1774-4
- CLEARY, P. P., LARKIN, A., (1979). Hyaluronic acid capsule: strategy for oxygen resistance in group A streptococci. *J Bacteriol.* v. 140, n. 3, p. 1090 - 1097.

- COHEN, M., KLEIN, E., GEIGER, B., ADDADI, L., (2003). Organization and adhesive properties of the hyaluronan pericellular coat of chondrocytes and epithelial cells. *Biophys J.* v. 85, n. 3, p. 1996-2005. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74627-X
- 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 Progr.* v. 15, n. 5, p. 898-910. doi: 10.1021/bp990078n
- DON, M. M., SHOPARWE, N. F., (2010). Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. *Biochem Eng J.* v. 49, n. 1, p. 95–103. doi: 10.1016/j.bej.2009.12.001
- DORAN, P. M., (1995). Bioprocess Engineering Principles. Elsevier Science & Technology. Sydney, Australia. pp. 275 - 287.
- FERMENTECH MEDICAL LIMITED, Geoffrey M. Dunn, Derek C. Ellwood, Charles Gervase T. Evans, Neil McInnes, Keith J. Smith, Richard G. Yeo. Production of hyaluronic acid. US5563051 A . Oct. 8, 1996.
- GAO, H. J., DU, G. C., CHEN, I., (2006). Analysis of metabolic fluxes for hyaluronic acid (HA) production by *Streptococcus zooepidemicus*. *World J Microb Biot.* v.22, n. 4, p. 399-408. doi: 10.1007/s11274-005-9047-7
- GUIRARD, B. M., SNELL, E. E., (1962). Nutritional requirements of microorganisms. In: Gunsalus IC, Stanier RY (ed.). The bacteria, v. 4. Academic Press, pp. 70-71.
- HUANG, W. C., CHEN, S. J., CHEN, T. L., (2007). Modeling the microbial production of hyaluronic acid. *J Chin Inst Chem Eng.* v. 38, n. 3, p. 355-359. doi: 10.1016/j.jcice.2007.02.004
- JENSEN, P. R., HAMMER, K., (1993). Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*, *Appl Environ Microb.* v. 59, n. 12, p. 4363–4366. doi: 0099-2240/93/124363-04\$02.00/0
- KLIMEK, J., OLLIS, D., (1980). Extracellular microbial polysaccharides: kinetics of *Pseudomonas* sp., *Azotobacter vinelandi*, and *Aureobasidium pullulans* batch fermentations, *Biotechnol Bioeng.* v.22, n. 11, p. 2321–2342. doi: 10.1002/bit.260221109

- KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R., GEMEINER, P. (2007). Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*, v. 29, n. 1, p. 17-25. doi: 10.1007/s10529-006-9219-z
- LEE, G. Y., HA, S. J., JUNG, J. H., SEO, D. H., PARK, J. Y., KIM, S. R., PARK, N. W., KWEON, D. K., PARK, S. H., PARK, C. S., (2009). Effect of non-animal-derived nitrogen sources on the production of hyaluronic acid by *Streptococcus sp.* KL0188. *J Korean Soc Appl Bi.* v. 53, n. 3, p. 283-289. doi: 10.3839/jksabc.2009.050
- LIU, L., WANG, M., DU, G., CHEN, J., (2008). Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Lett Appl Microbiol.* v.46, n. 3, p 383-388. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02325.x
- MARQUARDT, D. W., (1963). An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameter. *Siam J. Appl. Math.* v.11, n. 2, p.431–441. doi: 10.1137/0111030
- MERCIER, P., YERUSHALMI, L., ROULEAU, D., DOCHAIN, D., (1992). Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. *J Chem Tech Biotechnol.* v. 55, n. 2, p. 111–121. doi: 10.1002/jctb.280550204
- MULCHANDANI, A., LUONG, J. H., LEDUY, A., (1988). Batch kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis. *Biotechnol Bioeng.* v. 32. N. 5, p. 639–646. doi: 10.1002/bit.260320508
- OGRODOWSKI. C. S., HOKKA. C. O., SANTANA. M. H. A., (2005). Production of hyaluronic acid by *Streptococcus*. *Appl Biochem Biotech.* v. 122, n. 1-3, p. 753-76. doi: 10.1385/ABAB:122:1-3:0753
- O' REGAN, M., MARTINI, I., CRESCENZI, F., DE LUCA, C., LANSING, M., (1994). Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *Int J Biol Macromol.* v. 16, n. 6, p. 283-286. doi: 10.1016/0141-8130(94)90056-6
- PARENTE, E., HILL, C., (1992). A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol.* v.73. n. 4, p. 290–298. doi: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04980.x
- PARENTE, E., RICCIARDI, A., (1994). Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Lett Appl Microbiol.* v. 19, n. 1, p. 12–15. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1994.tb00891.x

- PIRES, A. M. B., SANTANA, M. H. A., (2010 a). Metabolic effects of the initial glucose concentration on microbial production of hyaluronic acid. *Appl Biochem Biotechnol.* v.162. n. 6, p. 1751–1761. doi: 10.1007/s12010-010-8956-6
- PIRES, A. M. B., MACEDO, A. C., EGUCHI, S. Y., SANTANA, M. H. A., (2010 b). Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource Technol.* v. 101. n. 16, p. 6506–6509. doi: 10.1016/j.biortech.2010.03.074
- PIRT, S. J., (1965). The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 163, p. 224–231.
- SINCLAIR, C. G., KRISTIANSEN, B., (1987). *Fermentation Kinetics and Modeling*, Open University Press, Milton Keynes, p. 156.
- SUGIMURA, Y., SUZUKI, Y., 1988. A high-temperature catalytic oxidation method for the determination of non-volatile dissolved organic carbon in seawater by direct injection of a liquid sample. *Mar Chem.* v. 24, n. 2, p.105-131. doi: 10.1016/0304-4203(88)90043-6
- VAN BODEGOM, P., (2007). Microbial maintenance: a critical review on its quantification. *Microbial Ecol.* v. 53, n. 4, p. 513-523. doi: 10.1007/s00248-006-9049-5
- VAZQUEZ, J. A., MONTEMAYOR, M. I., FRAGUAS, J., MURADO, M. A., (2009). High production of hyaluronic and lactic acids by *Streptococcus zooepidemicus* in fed-batch culture using commercial and marine peptones from fishing by-products. *Biochem Eng J.* v.44, n. 2, p. 125 - 130. doi: 10.1016/j.bej.2008.11.007
- VAZQUEZ, J. A., MURADO, M. A., 2008. Unstructured mathematical model for biomass, lactic acid and bacteriocin production by lactic acid bacteria in batch fermentation. *J Chem Technol Biot.* v. 83, n. 1, p. 91 – 96. doi: 10.1002/jctb.1789
- VERHULST, R., (1838). Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Corr Math Phys*, v. 10, p. 113-121. (NAID): 10021163653
- ZHANG, J., DING, X., YANG, L., KONG, Z., (2006). A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01. *Appl Microbiol Biot*, v. 72, n. 1, p 168-172. doi: 10.1007/s00253-005-0253-x

6. Conclusões finais

A composição de aminoácidos nas peptonas e a proporção de aminoácidos livres influencia o crescimento celular, consumo de glicose e produção e massa molar do AH. As peptonas não funcionam somente como fonte de nitrogênio, mas possuem funções específicas no cultivo do *Streptococcus zooepidemicus*.

A presença de maiores quantidades de aspartato, glutamina e glutamato, assim como a presença de maior quantidade de aminoácidos livres elevou a massa molar de AH na peptona rica em AGG, enquanto que a menor concentração de AGG e a ausência de aminoácidos livres elevou a produção de AH na peptona pobre em AGG.

A peptona rica em AGG produziu maior crescimento celular e consumo de glicose do que a peptona pobre em AGG. O consumo de nitrogênio foi semelhante para ambas as peptonas.

Os parâmetros cinéticos determinados através dos modelos de Verhulst e Luedeking-Piret se ajustaram aos dados experimentais para crescimento celular, consumo de glicose e produção de AH.

7. Sugestões para trabalhos futuros

- Um estudo mais detalhado da concentração dos aminoácidos AGG e da proporção de aminoácidos livres e totais, com a finalidade de otimizar a sua proporção nas peptonas.
- Estudo das condições de aeração e agitação para a produção microbiana de AH.
- Determinação da influência do oxigênio e do pH nos parâmetros cinéticos.
- Determinação do comportamento cinético dos intermediários e da massa molar do AH em cultivos com aeração forçada.