

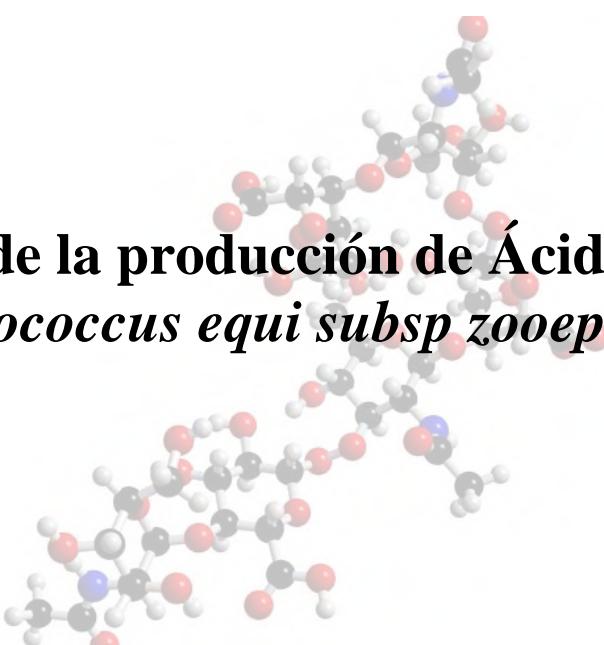


REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
Laboratorio de Biología y Medicina Experimental
(LABIOMEX)



Optimización de la producción de Ácido hialurónico por *Streptococcus equi subsp zooepidemicus*

www. la.ve



presentado por:

Br. Rafael De Jesús Urdaneta Peláez

Tutor:

Dr Jhon Freddy Cruz Gómez

Ante la ilustre Universidad de Los Andes como requisito para optar al título de:

Licenciado en Biología

Mérida-Venezuela

2022

B

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

www.bdigital.ula.ve

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Biología y Medicina experimental (LABIOMEX) de la facultad de Ciencias- departamento de Biología de La Universidad de Los Andes, bajo la tutoría del Dr Jhon Cruz.

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual C

DEDICATORIA

A mis padres, fuentes de inspiración que permitieron que este sueño, pudiera ser realizado. A mis angeles en el cielo, especialmente a mí siempre amado hermano José Rafael Urdaneta y a mi amigo del alma Alejandro Briceño.

www.bdigital.ulavc

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiarme siempre por el camino del bien y por todas sus bendiciones.

A mi Alma Mater, La Universidad de los Andes y a mi siempre amada Facultad de Ciencias.

A toda mi Familia por su incondicional apoyo, especialmente a mis Padres y hermanos.

A mi tutor el Dr Jhon Cruz y a mi Co-tutora la MSc. Militza Quintero (Mis padres académicos), por la confianza depositada en mí y en el trabajo, el logro nos pertenece a los tres.

A la Dra Adriana Cruz, por todo su apoyo.

A todos los Profesores de LABIOMEX: MSc. Marco Bastida (parte de mi jurado); MSc. Balbino Perdomo; MSc. Anny Lacruz; Dr. Luis Betancourt; MSc Reinaldo Guzmán y, un especial reconocimiento al MSc. William Quintero, sin ud y su siempre espíritu de apoyo Profe, no lo hubiese podido lograr.

A la Abogado Lilibeth Barreto, la mejor secretaria- abogado- asistente del laboratorio, quien siempre brindó su apoyo.

A mis Docente en la carrera, a cada uno de ellos debo lo que soy como Biólogo.

A mis amigos del Postgrado en Biología Molecular, especialmente a La Lcda Keila Rivas y al Lcdo Domingo Lugo por todo su apoyo en el laboratorio.

A mis compañeros de carrera, especialmente a mis queridos amigos: Danelys; Alejandra; Khaleel; Layla y Valentina, quienes estuvieron conmigo en las buenas y en las malas, eternamente agradecido.

A mis amados biólogos del grupo “Gorditos y bonitos”, sinónimo de hermandad y apoyo.

A mi mejor amiga Liss, por ser siempre mi razón de felicidad y mi motor de vida.

A Wilmer, por su confianza y apoyo en los momentos más difíciles, cuando ni yo creía en mí, tú me ayudaste y motivaste a seguir adelante, gracias por tanto.

A mis maestros y amigos de siempre, sería imposible nombrarlos a todos.

A la música, sin ti me hubiese perdido desde el principio.

A todo aquel que haya olvidado mencionar, pero que sabe que formó parte de esta aventura.

RESUMEN

El ácido hialurónico (HA), es un glucosaminoglucano natural; lineal; no ramificado y repetitivo, compuesto por disacáridos de β -1,3-N-acetil glucosamina y β -1,4- ácido glucurónico; es soluble en agua, forma cadenas estéricamente rígidas y no forma estructuras globulares compactas. Debido a sus características fisicoquímicas y dependiendo de su peso molecular, el HA juega un rol importante en diversos ámbitos gracias a la gran diversidad de funciones biológicas que posee; siendo dentro de la Medicina y la Cosmetología, en donde tiene una mayor importancia y demanda. Inicialmente la producción de HA era mediante el uso de animales. Sin embargo, debido a las implicaciones éticas del proceso, actualmente se realiza mediante producción biotecnológica, empleando principalmente bacterias del genero *Streptococcus*. En este trabajo especial de grado, se realizaron fermentaciones microbianas, haciendo uso de un biorreactor de 500 mL y empleando como medios de cultivo: Tioglicolato y BHI; en ambos medios se introdujeron algunas modificaciones en las formulaciones, siendo el medio tioglicolato con glutamina y idoacetamida, quien obtuvo la mayor producción de HA (1.17 g/L) bajo condiciones óptimas de cultivo (pH 7 ; T: 36°C y 300 r.p.m de agitación).

INDICE

1-INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Historia y descubrimiento del ácido hialurónico	1
1.2.- Estructura y propiedades fisicoquímicas.....	2
1.3.- Diversidad de funciones biológicas	2
1.4.- Aplicaciones del ácido hialurónico.....	3
1.5.- Síntesis de ácido hialurónico	4
1.6.- Hialuronano sintasa	5
1.7.- Operon has en <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	7
1.8.- Catabolismo de HA	7
1.9.- Producción biotecnológica de HA	8
1.10.- <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	9
2.- HIPOTESIS DEL TRABAJO	11
3.- OBJETIVOS	12
4.1- Antecedentes de la investigación.....	14
5.- MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	15
5.1.- Material biológico	15
5.2.- Medios de cultivo.....	15
5.4.- Equipos	16
5.5.- Reactivos	17
6.- METODOLOGÍA	18
6.1.- Medios de cultivo.....	18
6.2.- Inóculos de la cepa <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	18
6.3.- Liofilización	19
6.4.- Fermentaciones	19
6.5.- Crecimiento celular	19
6.6.- Producción de ácido hialurónico.....	20
6.7.- Gráficos.....	20
7.- PLAN DE TRABAJO Y CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	21
8.- TABLA DE PRESUPUESTOS	21
9.- RESULTADOS	22
9.1- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA CEPÀ	22
9.2.- MEJORAMIENTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO.....	25
9.3.- FERMENTACIONES DE 500mL EN MEDIO TIOGLICOLATO NO COMERCIAL	26

9.4.- FERMENTACIÓN DE 500 mL EN MEDIO TIOGLICOLATO COMERCIAL.....	31
9.5.- FERMENTACIONES DE 500mL EN MEDIO BHI (INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN).....	32
9.6.- CALCULOS OBTENIDOS A PARTIR DE LAS FERMENTACIONES.	35
10.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	39
10.1- CARACTERIZACIÓN FENOTIPICA DE LA CEPA	39
10.2- MEJORAS EN LAS CONDICIONES DE CULTIVO	39
10.3- FERMENTACIONES DE 500mL EN MEDIO TIOGLICOLATO NO COMERCIAL	40
10.4- FERMENTACIÓN DE 500mL EN MEDIO TIOGLICOLATO COMERCIAL.....	43
10.5.- FERMENTACIONES DE 500mL EN MEDIO BHI (INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN).....	43
11.- CONCLUSIONES.....	44
12.- RECOMENDACIONES.....	45
13.- BIBLIOGRAFÍA	46
14.- ANEXOS.....	49

www.bdigital.ula.ve

1-INTRODUCCIÓN

En 1934 los científicos Karl Mayer y Jhon Palmer, aislaron del humor vitreo de ojos vacunos, una sustancia hialoide, la cual denominaron ácido hialurónico (HA), esta sustancia tal y como reportan en su ensayo, podría tener algún uso en la industria terapéutica debido a la característica viscosa que posee (Mayer y Palmer 1934). El HA es un polisacárido lineal y natural compuesto por unidades repetidas de β -1,3-N-acetyl glucosamina y β -1,4- ácido glucurónico, que pueden llegar a alcanzar un peso molecular de hasta 6 millones de Da (Liu et al., 2011). El HA también conocido como Hialuronato, de entre todos los glucosaminoglicanos, es el único que se produce tanto en bacterias como en animales, especialmente en mamíferos (Prehem 1984). Las propiedades del HA, como lo son: retención de humedad, biocompatibilidad y la viscoelasticidad, le han permitido posicionarse en la industria médica, farmacéutica, y cosmetológica, ganando gran demanda y popularidad en la última década (Sze et al., 2016) y (Liu et al., 2011). A lo largo de la historia la obtención de HA, ha pasado del origen animal, a la industria biotecnológica empleando bacterias, principalmente aquellas del género *Streptococcus* pertenecientes al grupo C de Lancefield, siendo *Streptococcus zooepidemicus*, quien ha registrado un mayor rendimiento de producción tal y como lo indica (Cordon y Pérez, 2016).

1.1.- Historia y descubrimiento del ácido hialurónico

Karl Meyer y John Palmer publicaron en el *Journal of Biological Chemistry*, acerca de un polisacárido el cual poseía un peso molecular extremadamente alto, dicho polisacárido fue aislado del humor vitreo del ganado bovino y, al ser los primeros en describir a este polisacárido, le bautizaron como ácido hialurónico, cuyo nombre deriva de “Hialoide” (apariencia vidriosa) y de “ácido urónico”. (Mayer y Palmer, 1934). Sin embargo, en 1918 los científicos Levene y López, también lograron aislar un polisacárido nuevo para la época, a partir del cuerpo vitreo y de muestras de sangre del cordón umbilical, al cual llamaron “mucoitina-ácido sulfúrico”. Actualmente se sabe que dicho polisacárido aislado anteriormente, era HA junto a una mezcla de glucosaminoglicanos sulfatados. (Selyanin et al., 2015).

1.2.- Estructura y propiedades fisicoquímicas

El HA, es un glucosaminoglucano natural; lineal; no ramificado y repetitivo, compuesto por disacáridos de β -1,3-N-acetil glucosamina y β -1,4- ácido glucurónico (Ver **Figura 1**) (Liu et al., 2011). Cada unidad del disacárido posee un grupo carboxilo, cuatro grupos hidroxilos y un grupo acetamido. Al igual que el resto de los glucosaminoglucanos, el HA es soluble en agua, forma cadenas estéricamente rígidas y no forma estructuras globulares compactas. Cuando la molécula de HA es sometida a pH 7, los grupos carboxilos se disocian, adquiriendo las moléculas del polímero, cargas negativas densas (Selyanin et., 2015). Las diferencias más notables del HA con respecto a otros miembros de la familia de los glucosaminoglicanos (condroitina sulfato, sulfato de dermatina y sulfato de heparina), son: 1) El HA no posee uniones del tipo covalente a las proteínas; este interactúa de forma no covalente con los complejos a través de proteínas de enlace, y 2) tampoco posee grupos sulfatos como los demás glucosaminoglucanos (Chong, et al., 2005).

El HA se encuentra en la matriz extracelular, llegando a alcanzar un peso molecular de hasta 8×10^6 Da; esta propiedad depende del origen y del método mediante cual fue purificado (Cordon y Pérez, 2016).

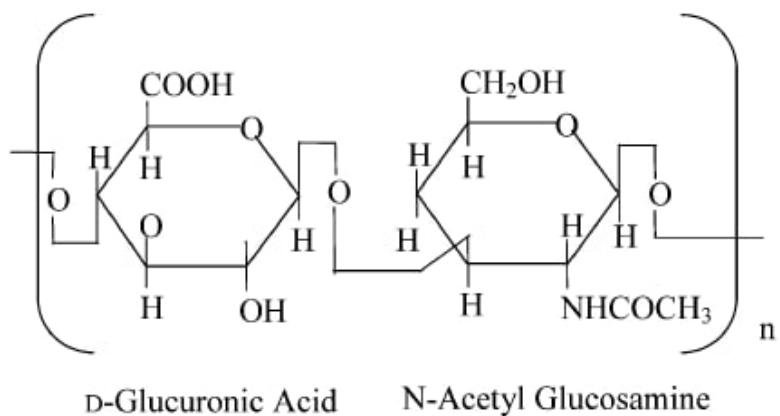


Figura 1. Unidades repetitivas de la estructura de HA. Extraída de (Chong et al.,2004).

1.3.- Diversidad de funciones biológicas

Las distintas funciones que puede cumplir el HA, dependerán directamente de su tamaño y peso molecular. El hialuronato de alto peso molecular (PM), conformado por polímeros de $5 \times 10^5 - 6 \times 10^6$ Da, cumplen un rol importante en el relleno del espacio entre tejidos con la finalidad de hidratarlos; también actúan como antiangiogénicos, inhibiendo la fagocitosis y; como inmunosupresores, el efecto inmunosupresor se deriva en gran parte de la capacidad que tiene el HA de alto PM para revestir la superficie de las células, cuyo revestimiento impide el acceso de ligandos a determinados receptores en la superficie. Las cadenas de hialuronato de tamaño intermedio entre 2×10^4 y 2×10^5 Da, están implicadas en la ovulación; en la embriogénesis y en la reparación de heridas. Los oligosacáridos compuestos con 15-50 unidades de disacáridos repetidos entre 6×10^3 y 2×10^4 Da, actúan como sustancias inflamatorias; inmunoestimuladoras y angiogénicas; mientras que, los oligómeros pequeños de hialuronato, actúan como antiapoptóticos e inductores de choque térmico de proteínas (Stern et al., 2006) (Boeriu et al., 2013). El hialuronato de bajo PM, actúa como un marcador tumoral que se detecta con gran facilidad, este hialuronato facilita y proporciona a las células tumorales, motilidad e invasión (Stern et al., 2006). HA es ampliamente encontrado como material encapsulado extracelular de los grupos A y C de Streptococcus de la clasificación de Lancefield, cuya función es proporcional a las bacterias un camuflaje contra el sistema inmunológico del huésped donde residan (Blank et al., 2008).

1.4.- Aplicaciones del ácido hialurónico

El HA posee una gran variedad de aplicaciones en distintos ámbitos tales como: la Medicina, la Farmacología y la Cosmetología. En la actualidad es un compuesto altamente utilizado, debido a sus diversas funciones biológicas. En el ámbito Biomédico, el HA se utiliza en diversos procesos como en el diagnóstico general y tratamiento en: La oncología; en donde al regular la producción de HA, se puede evitar la propagación del cáncer; Cardiología, en el tratamiento de infartos y accidentes cerebrovasculares; Cirugía; Neumonología; Oftalmología, en el tratamiento del síndrome del ojo seco; Ortopedia, en el tratamiento de la artritis; Ginecología, empleado como hidratante vaginal (Cordon y Pérez, 2016). En la Dermatología y Cosmetología, el HA permite la hidratación de la piel gracias a su propiedad de retención del agua. Además, proporciona firmeza y sedosidad a la misma, gracias a la lubricación que les brinda a las fibras de colágeno en ella (Ortega et al., 2015). En el caso de la Farmacología, juega un papel importante; conjugándolo con fármacos o empleándolo para la elaboración de capsulas de administración de los mismos (Kogan et al., 2007).

1.5.- Síntesis de ácido hialurónico

El HA es sintetizado por las enzimas hialuronano sintetasas (Has), las cuales son del tipo glucosiltransferasas (GT) (Stern et al., 2006). Estas enzimas se encuentran en vertebrados, bacterias y, algunos virus de algas. Por tanto, el HA se produce en distintos organismos; tales como *Streptococcus* y la mayoría de los animales (Scott y Heatly, 1999).

Los precursores activados UDP- ácido glucurónico y UDP-N- acetil glucosamina, son imprescindibles para la síntesis de HA; los cuales son empleados durante la síntesis de los polisacáridos. Las Has transfieren secuencialmente la cadena naciente de HA, gracias a la reacción de la glucosiltransferasa con los UDP derivados de la N-acetil-glucosamina y del ácido glucurónico, en ese estricto orden (ver **figura 2**). El ácido glucurónico se forma a partir de la glucosa y el N-acetil-glucosamina se forma a partir pirofosforilasa. Para que se pueda llevar a cabo el alargamiento de la cadena de HA, son necesarios residuos del disacárido; para ello las Has realizan una serie de funciones bioquímicas, tales como: unir los dos sustratos necesarios (UDP- ácido glucurónico y UDP- N- acetil-glucosamina); presentar dos actividades diferentes de la glucosiltransferasa; poder retener la cadena naciente en sitios específicos de unión a HA y; desplazar la cadena de HA dentro de la enzima, asegurando así nuevas rondas de síntesis del polímero. La enzima sintetiza y emplea los azúcares UDP directamente para la síntesis y ensamblaje de HA en el interior celular, mientras que la cadena, sale a través de la membrana plasmática al espacio extracelular (Tsepilov y Beloded, 2015).

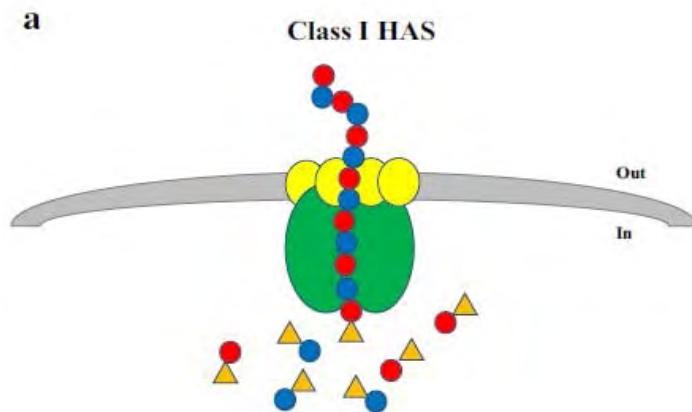


Figura 2. Representación esquemática de la síntesis y ensamblaje de HA por Has 1 mediante la adición intracelular de azúcares UDP (representados en círculos). Extraída de (Sze et al., 2016).

Durante mucho tiempo se asumió que las Has en *Streptococcus*, producía HA añadiendo nuevos residuos de carbohidratos a los extremos no reductores. Sin embargo, (Prehm, 1983) y (Asplund et al., 1998) en sus estudios con células de teratocarcinoma (teratoma) y, la línea celular de glioma humano, respectivamente; descartaron esa idea hallando resultados experimentales, que evidenciaban que los residuos se unían a los extremos reductores de HA (ver **figura 4**) (Tsepilov y Beloded, 2015).

1.6.- Hialuronano sintasa

Las Has; pertenecientes a la familia de las GT , se encargan de la síntesis y ensamblaje del HA a partir de los precursores UDP- de los azúcares ácido glucurónico y N- acetil glucosamina, los cuales se sintetizan en la ruta metabólica de la glucolisis, a partir de los intermediarios; glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato, respectivamente (ver **figura 3**) (Tsepilov y Beloded, 2015).

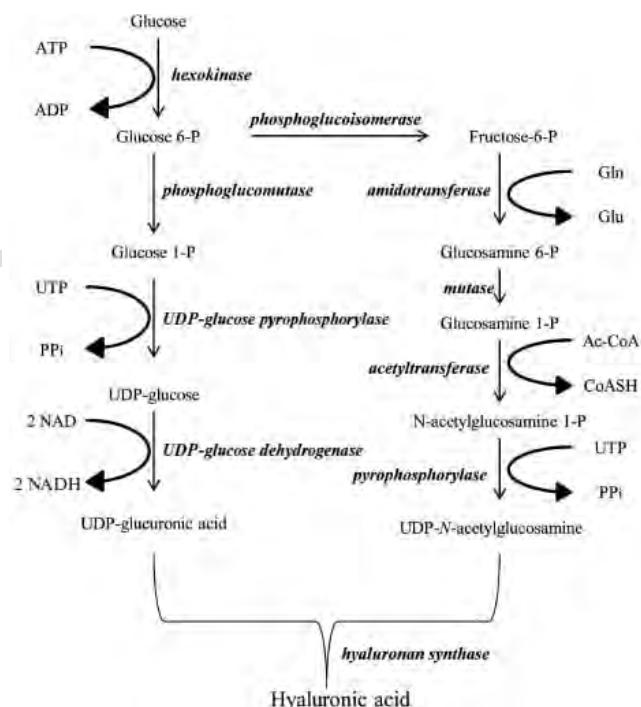


Figura 3. Ruta de biosíntesis del HA en bacterias y vertebrados. Extraída de (Tsepilov y Beloded, 2015).

Existen dos clases no relacionadas de Has: Has 1, conformada por los *Streptococcus* y vertebrados y, Has 2 en donde únicamente se encuentra *Pasterurella multocida*. La clase Has 1 encontrada en

Streptococcus, pertenece a la familia GT2 de las glucosiltransferasas, en donde se encuentran también, celulosa sintasa y quitina sintasa (Blank et al., 2008). Las dos clases de Has se encuentran separadas debido a que difieren en cuanto a sus secuencias de aminoácidos; las topologías de sus membranas; así como su modo de acción. Distintas teorías establecen que las dos clases de Has, son el resultado de una evolución convergente y no de un proceso de transferencia horizontal de genes. En **la figura 5**, se puede observar la secuencia nucleotídica de HasA de *Streptococcus equi. subsp zooepidemicus*.

Has como la mayoría de las GT, se encuentra integrada en la membrana. Sin embargo, posee también dominios citosólicos que participan activamente en la síntesis de los polímeros, los cuales se van transfiriendo a la cadena de los polímeros nacientes. En la familia GT2 de las GT, la cadena de polisacáridos naciente, se va translocando a través de la membrana plasmática, mediante uno o más dominios transmembrana de la GT (ver **figura 4**) (Baltazar, 2018).

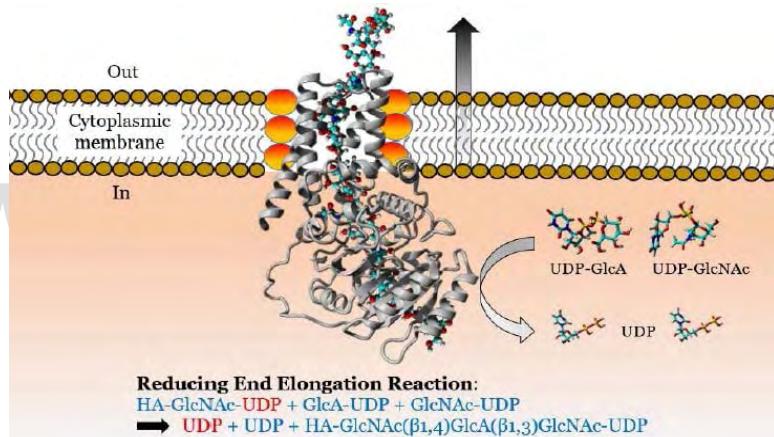


Figura 4. Polimerización de HA por HAS1. Extraída de (Baltazar, 2018).

10	20	30	40	50
MRTLKNLITV	VAFSIFWVLL	IYVNVLFGA	KGSLSIYGF	LIAYLLVMS
60	70	80	90	100
LSFFYKPFKG	RAGQYKVAII	IPSYNEDAES	LLETTLKSVQQ	QTYPLAEIYV
110	120	130	140	150
VDDGSADETG	IKRIEDYVRE	TGDLSSNVIV	HRSEKNQQGR	HAQAWAFERS
160	170	180	190	200
DADVFLTVDS	DTYIYVDALE	ELLKTFNDPT	VYAATGHILNV	RNRREVNLLLTR
210	220	230	240	250
LTDIYDNAF	GVERAAQSVT	GNILVCSGPL	SIYRREVVVP	NIDKYINQTF
260	270	280	290	300
LGIPVSIGDD	RCLTNYATDL	GKTVYQSTAK	CITDVPDRMS	TYLKQQNRWN
310	320	330	340	350
KSFFRESIIS	VKKIMNNPFV	ALW TILEVSM	FMMLVYSVVD	FFVGNVREFD
360	370	380	390	400
WLRVLAFLVVI	IFIVALCRNI	HYMLKHPLSF	LLSPFYGVLA	LFVLPQLKLY
410				
SLFTIRNADW	GTRKKLL			

Figura 5 . Secuencia nucleotídica de HasA de *Streptococcus equi. subsp zooepidemicus*. Extraída de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> , 2021.

1.7.- Operon has en *Streptococcus zooepidemicus*

Blank et al., 2008, hallaron en su investigación que, el operón Has de *Streptococcus equi subsp zooepidemicus*, tiene un tamaño aproximado de 6,9 Kb. De todos los operones que se han caracterizado, el de *S. zooepidemicus*, es el que contiene la mayor cantidad de genes, cinco en total (Ver **figura 6**). En orden el operón Has de *zooepidemicus*, contiene los siguientes genes: HasA (Sintetiza Hialuronano sintasa), HAsB (UDP- glucosa deshidrogenasa) HasC (Glucosa-1-fosfato uridiltransferasa), glmU (Un supuesto de N-acetil-glucosamina-1-fosfato uridiltransferasa) y Pgi (Un supuesto de glucosa-6-fosfato isomerasa). HAsB y HasC catalizan la síntesis del precursor del ácido UDP-glucurónico a partir de glucosa-1-fosfato, mientras que las enzimas Pgi y GlmU, se encargan de la síntesis de UDP-N-acetyl glucosamina a partir de Glucosa-6-fosfato, este es el segundo precursor del HA. Además, Blank et al., 2008. También hallaron aguas arriba un sitio de inicio de la transcripción de 50Pb, un promotor σ^{70} del tipo Pribnow Schaller box, de 6 Pb aguas arriba del inicio de la transcripción y, un operón de sorbitol bien conservada, aguas arriba de Pgi.

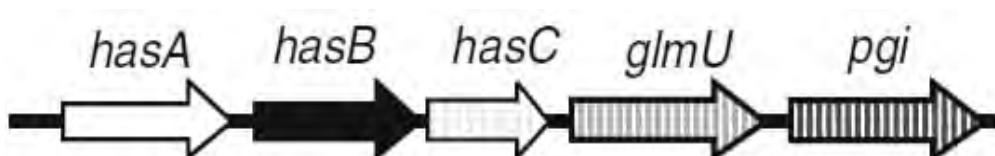


Figura 6. Operón HAs de *Streptococcus equi. subsp zooepidemicus*. Extraída y modificada de (Blank et al., 2008).

1.8.- Catabolismo de HA

La destrucción del HA se da gracias al efecto de las hialuronidas bacterianas (Hyals), también llamadas Hialuronano liasas, estas enzimas hidrolizan los enlaces β -N- acetilaminoglucósidos y simultáneamente deshidratan el residuo del ácido urónico, en el extremo no reductor de la molécula. La especificidad por el sustrato, depende del microorganismo productor (Selyanin et al., 2015).

Las Hyals, son producidas por determinadas bacterias gram positivas del tipo patógenas, especialmente aquellas que producen infecciones cutáneas y en las superficies mucosas, como es el caso de algunos *Streptococcus* del grupo C de Lancefield. Estas bacterias patógenas producen elementos extracelulares, que tienen efectos dañinos sobre los tejidos. Las Hyals, actúan como endo-N-acetil-hexosaminidasas, eliminando a través del enlace β -1-4 del HA (Ver **figura 7**), a diferencia de otras Hyals, los productos de las Hyals bacterianas son disacáridos insaturados (Hynes y Walton, 2000).

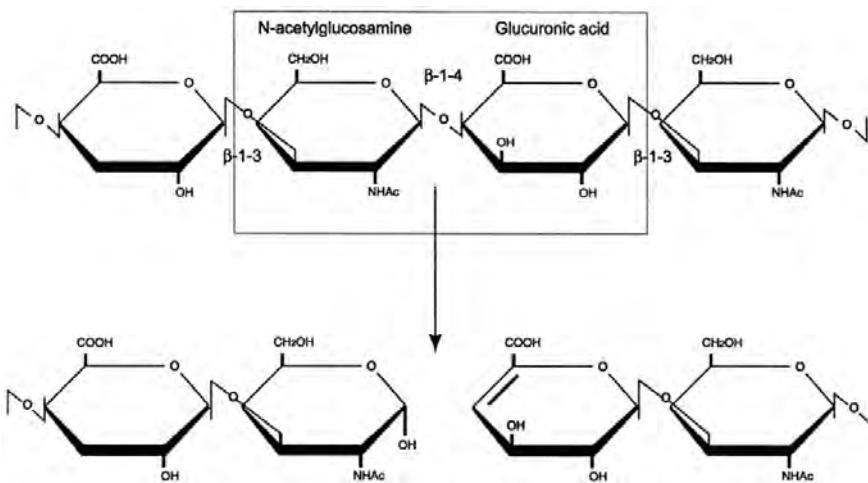


Figura 7. Estructura de HA y escisión del mismo por Hyals, el recuadro muestra el enlace en donde se realiza la ruptura. Extraída de (Hynes y Walton, 2000).

1.9.- Producción biotecnológica de HA

El primer registro de producción biotecnológica de HA mediante un microorganismo, fue por Shiseido en 1980 (Liu et al., 2011). La producción moderna de HA mediante microorganismos, se logra mediante determinadas bacterias gram positivas, específicamente algunos *Streptococcus sp* y *Pasteurella sp*. Estas bacterias poseen la capacidad de síntesis del HA a partir de una “capsula” extracelular de aproximadamente 1mm de espesor (Selyanin et al., 2015). La cepa más empleada en la producción de HA son los *Streptococcus* del grupo C, siendo *S.zooepidemicus* quien logra un mayor rendimiento de producción, con valores reportados de hasta 5-6 g/L en algunas cepas bajo condiciones adecuadas (Rangaswamy y Dharmendra, 2008) Sin embargo, *S.zooepidemicus* es muy sensible a ciertos parámetros como lo son: **altas viscosidades**; lo cual genera una mezcla deficiente con baja

oxigenación que reduce los niveles de producción, **una alta competencia entre síntesis de HA y crecimiento celular**; debido al uso común de precursores UDP; **Ácido láctico**, el cual es el subproducto principal de la fermentación de HA, cuando se acumula inhibe fuertemente tanto crecimiento como producción (Liu et al., 2011).

La producción microbiana de HA mediante fermentaciones, ha evolucionado a lo largos de los últimos años, buscando variaciones en la suplementación con azúcares, vitaminas, aminoácidos, sales, ácidos orgánicos, fosfatos y fuentes de nitrógeno (Sze et al., 2016), así como procesos de mutación de cepas, que reduzcan los factores que inhiben la síntesis de crecimiento y síntesis de HA, así como la patogenia de los microorganismos (Liu L et al., 2011), (Selyanin et al., 2015).

1.10.- *Streptococcus zooepidemicus*

Streptococcus zooepidemicus, es una subespecie de *Streptococcus equi*, perteneciente al grupo C de Lanfield, es un *Streptococcus* β hemolítico; catalasa negativo; gram positivo; anaeróbico facultativo; inmóvil; encapsulado; no esporulante y; que forma largos collares de cocos (Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo, 2018). Se encuentra principalmente en la flora bacteriana de caballos, específicamente en mucosas nasales (Cordon y Pérez, 2016).



Figura 8. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* bajo microscopio óptico, sin tinción. (Fotografía propia).

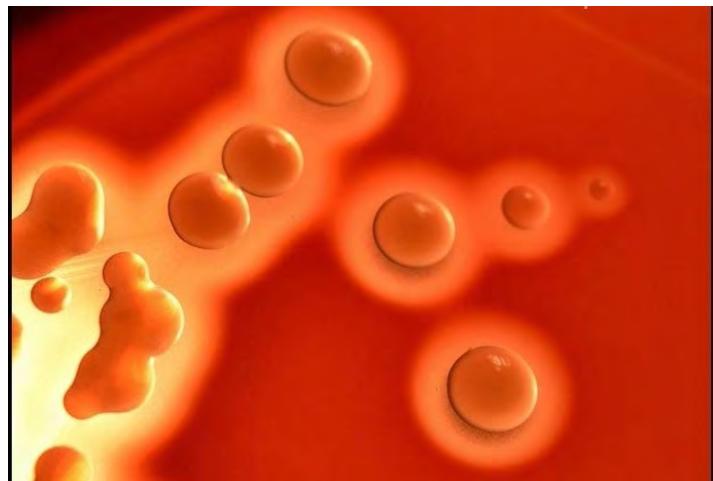


Figura 9. β -hemolisis en colonias de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Extraída de: Streptococcus zooepidemicus [Fotografía] (Han, 2021) Recuperado de: <http://www.bacteriainphotos.com/streptococcus%20zooepidemicus.html>.

www.bdigital.ula.ve

2.- HIPOTESIS DEL TRABAJO

El mejoramiento de las condiciones de cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* dará como resultado una mayor producción de ácido hialurónico.

Las modificaciones en la formulación de distintos medios de cultivo tendrán valores de producción más elevados de ácido hialurónico.

www.bdigital.ula.ve

3.- OBJETIVOS

Caracterizar fenotípicamente la cepa *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* como productora de ácido hialurónico para su posterior uso en procesos de fermentación a pequeña escala.

Mejorar las condiciones de cultivo de la cepa *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* para aumentar su producción de la molécula de ácido hialurónico.

Probar distintos medios de cultivo introduciendo algunas modificaciones en su formulación para estimular la mayor producción de ácido hialurónico por la cepa *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

www.bdigital.ula.ve

4.- JUSTIFICACIÓN

El ácido hialurónico tiene una gran cantidad de propiedades y funciones en los animales. En los humanos, especialmente juega un rol importante en el ámbito médico; en el diagnóstico y tratamiento de diversas alteraciones y patologías. Sin embargo, en los últimos años ha ganado popularidad en la estética y Cosmetología, debido a sus propiedades hidratantes en los tejidos y; efectos que parecen revertir el proceso de envejecimiento de la piel. Esto causa un gran impacto positivo en las personas que acuden a las distintas consultas para aplicarse un tratamiento con ácido hialurónico, bien sea estético o clínico, cuyos costos resultan muy elevados, debido al laborioso proceso de producción y purificación de la molécula.

La producción biotecnológica y optimización de HA a partir de microorganismos como *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, supondría un aumento en la producción industrial, lo cual podría significar una baja en los costos de las aplicaciones del producto. En Venezuela, actualmente no hay reportes ni trabajos publicados referentes a producción de HA a partir de *S. zooepidemicus*; por lo que este trabajo especial de grado, significaría una línea de investigación novedosa en el país. Lograr producir y purificar HA en el Laboratorio de Biología y Medicina experimental (LABIOMEX) de la Facultad de Ciencias de La Universidad de Los Andes, desde el punto de vista Biológico y Medico; sería una gran oportunidad para los pacientes que puedan necesitar de esta molécula, ya que los costos serían más accesibles que adquirir la molécula en el extranjero, debido a la gran crisis económica y conflictos internacionales, que atraviesa en la actualidad Venezuela.

El ácido hialurónico, es una molécula costosa y escasa, cualquier método que mejore las condiciones de cultivo y producción de la molécula y, por tanto, pueda bajar los costos del producto; supondría un beneficio para los pacientes que lo requieran. Este trabajo especial de grado, busca optimizar un medio de cultivo no comercial, donde exista una mayor producción de ácido hialurónico, que pueda ser comercializado a futuro.

4.1- Antecedentes de la investigación

Internacionales:

- 1) Stoolmiller y Dorfman (1969), quienes realizaron la investigación “The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Streptococcus”: Lograron estandarizar las variables de cultivo óptimas (pH y temperatura) para una mayor producción de HA.
- 2) Rangaswamy y Jain D (2007), quienes realizaron la investigación “An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*”. En esta investigación: cultivaron y fermentaron *S. zooepidemicus* con 50g de sacarosa por litro y 10g de caseína por litro. Obteniendo 5-6 g de ácido hialurónico/l después de 24-28 h de fermentación.
- 3) Im et al., (2009), quienes realizaron la investigación “Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach” : Suplementaron los medios de cultivos con distintas fuentes de carbono; nitrógeno; sales; aminoácidos y; ácidos grasos, comparando la producción de HA con diferentes formulaciones del medio de cultivo. Con una productividad de 6,94 g/l en una fermentación a escala piloto.
- 4) Jagadeeswara y Karunakaran (2013), quienes realizaron la investigación “Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain 3523-7” : desarrollaron un proceso de fermentación discontinua, en donde obtuvieron un alto rendimiento de producción de HA; con un rendimiento máximo de 2,3 g/L de HA en fermentador de 25L.

5.- MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

5.1.- Material biológico

- *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, cepa CVCM-529, disponible en la colección de bacterias de la Universidad Central de Venezuela.
- Sangre de donantes *Homo sapiens*.

5.2.- Medios de cultivo

- Tioglicolato comercial
- Tioglicolato no comercial
- Infusión cerebro- corazón (BHI)
- Agar base
- Agar base sangre.
-

5.3.- Materiales

- Material de vidrio: Fiolas, Cubetas de espectrofotómetro de vidrio y de cuarzo, tubos de ensayo, tubos de sangre tapa lila, viales, cilindros graduados, vasos de precipitado, varillas, capsulas de Petri.

- Material de plástico: Capsulas de Petri, jeringas, tubos de microcentrífuga, tubos falcon (de 15 y 50mL), puntas de micropipetas, filtros millipore de 0.22 μm , papel de filtro watman, agitador magnético, gradillas
- Material clínico: torniquete, algodón, gasas.
- Material metálico: espátulas, soportes, gradillas, camisas para centrifuga, Asas de cultivo.

5.4.- Equipos

- Agitador magnético.
- Autoclave.
- Balanza semi analítica.
- Biorreactor- equipo de fermentador de 0.5 L.
- Centrifuga y Microcentrifuga.
- Espectrofotómetro Ultrospec II.
- Estufas a 37 °C.
- Horno de microondas.
- Liofilizador.
- Mechero.

- Microscopio.
- Micropipetas.
- Neveras y congeladores.
- pH metro.
- Sonda de pH.
- Spectronic.

5.5.- Reactivos

Cloruro de sodio, Buffer fosfato 0.1 M pH 7, Peptona de caseína, extracto de levadura, cisteína, arginina, glutamina, glutámico, tioglicolato de sodio, glucosa, maltosa, sacarosa, reactivo CTM, gotas toptear, kit para la determinación enzimática de glucosa, de la empresa Bioscience, maltasa, vitaminas, etanol.

6.- METODOLOGÍA

6.1.- Medios de cultivo

Infusión cerebro corazón:

Se empleó infusión cerebro corazón para reactivar las bacterias que se encuentran congeladas en tioglicolato + glicerol al 10%, así como para fermentar.

Tioglicolato comercial:

Se utilizó tioglicolato comercial para preinocular las bacterias y luego fueron empleadas como inóculos para la fermentación.

tioglicolato no comercial: Se replicó el medio tioglicolato comercial para realizar las fermentaciones (ver preparación y formulación de medios en anexos); en este medio no comercial, se hicieron cambios en la formulación original: azúcares, proporción de azúcares, aminoácidos, agentes alquilantes..

Agar base: Se utilizó agar base junto con agar base- sangre para preparar las cajas de agar sangre, en donde se caracterizó la cepa y se empleó como fuente de bacterias para todas las experiencias.

6.2.- Inóculos de la cepa *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

El medio agar base con agar base sangre se esterilizó y se llevó posteriormente a una temperatura aproximada de 40°C y se mezcló con 5mL de sangre fresca. Se prepararon las capsulas de Petri estériles con el medio y se dejó solidificar. Las bacterias de *Streptococcus zooepidemicus* fueron replicadas en las cajas y se cultivaron a 37°C en una estufa durante toda la noche. Al día siguiente, se seleccionaron las colonias aisladas y se cultivaron en 15 mL de tioglicolato comercial a 37° toda una

noche. Finalmente, al otro día los cultivos fueron dirigidos a: caracterización morfológica en microscopio; preparación de nuevos preinóculos, inóculos, o sometidos a un proceso de liofilización.

6.3.- Liofilización

De las bacterias reactivadas, se tomó 1 alícuota de 1mL del cultivo en un tubo para microcentrífuga y se centrifugó por 5 minutos a una velocidad de 15000 rpm. Posteriormente, las bacterias fueron resuspendidas en 1 mL de leche descremada al 15%.

Las bacterias resuspendidas en la solución de leche descremada al 15% se trasvasaron a viales de vidrio para liofilización. Finalmente, los viales se llevaron al liofilizador y se sometieron por 18 horas continuas al proceso de liofilización.

6.4.- Fermentaciones

Se realizaron fermentaciones de 500mL en medio tioglicolato no comercial, hasta alcanzar la fase estacionaria. El medio tioglicolato no comercial fue suplementado con diversos azúcares: glucosa, maltosa, así como glucosa-maltosa (diauxia). También, se suplementó con distintos aminoácidos, con la finalidad de poder determinar crecimiento celular, consumo de azúcares y la más optima producción de ácido hialurónico.

Se realizó una fermentación con medio BHI y otra con medio tioglicolato comercial, con la finalidad de comparar el rendimiento de la fermentación, entre los tres medios.

Todas las fermentaciones fueron realizadas con pH 7 a 37°C y con 300 rpm de agitación, estos parámetros constantes permiten mejorar las condiciones que generan una mayor producción de HA

6.5.- Crecimiento celular

A medida que avanzó el proceso de la fermentación, se tomaron alícuotas de 3mL cada 30 minutos y fueron sometidas a lectura de su densidad óptica (D.O) haciendo uso de un Spectronic; los valores de D.O fueron transformados mediante una curva de calibración a peso seco (mg/mL) (ver anexos) y se

graficaron vs el tiempo de la fermentación y producción de HA. Cada una de las muestras fueron conservadas en viales de vidrio, rotuladas con el número de tiempo en la cual fueron tomadas.

6.6.- Producción de ácido hialurónico

Para poder determinar los gramos por litro obtenidos en el proceso de fermentación bacteriana, cada alícuota tomada cada 30 minutos se centrifugó y se empleó el sobrenadante aplicando en un tubo de microcentrífuga 1mL de sobrenadante y 1mL de etanol absoluto al 99% y se llevaron a la nevera durante toda la noche. Al día siguiente se les aplicó el protocolo de cuantificación de HA según (Diferrante (1996) y (Quelastia et al., 2014), en el cual; las muestras conservadas toda la noche, se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en 100 μ L de NaCl al 2%, posteriormente se añadió 100 μ L del reactivo CTM + 20 μ L de Buffer fosfato 0.1 M a pH 7. Las muestras fueron incubadas a una temperatura de 37°C durante 10 minutos y luego se leyó las D.O a 600nm haciendo uso de un espectrofotómetro Ultrospec II.

A partir de las D.O obtenidas para cada una de las muestras, haciendo uso de la pendiente de la curva de calibración del HA (ver anexos), se obtuvieron los g/L obtenidos, los cuales se graficaron vs peso seco y consumo de azúcares.

6.7.- Gráficos

Se realizaron los gráficos de peso seco vs consumo de azúcar y vs el tiempo, para lograr observar el crecimiento de los *Streptococcus* en los diferentes medios de cultivos empleados para las fermentaciones.

Se realizaron los gráficos de peso seco vs producción de HA y vs el tiempo, para lograr observar el comportamiento de la producción a medida que avanzaba las fermentaciones.

7.- PLAN DE TRABAJO Y CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	2021			2022		
	Meses					
Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	
Reactivación de la cepa	X					
Caracterización de la cepa	X					
Liofilización de las cepa	X					
Curvas de calibración	X					
Ensayo de fermentaciones	X					
Fermentaciones	X	X	X	X		
Procesamiento de datos- TEG 1			X	X		
Redacción final TEG 2			X	X	X	X

8.- TABLA DE PRESUPUESTOS

Producto	Precio en USD- Dolares \$
Reactivos	400
Material de laboratorio	150
Material de oficina	50
Mantenimiento de equipos	1000
TOTAL	1600\$

9.- RESULTADOS

En esta investigación se propuso la optimización de la producción de HA por *Streptococcus equi subsp zooepidemicus*. Para poder lograr el objetivo general, primero se caracterizó la cepa obtenida de la colección de la Universidad central De Venezuela (UCV), con la finalidad de determinar su capacidad productora de la molécula de ácido hialurónico. Una vez caracterizada, se realizaron fermentaciones en medio litro en tres medios de cultivo (ver metodología) , comparando el rendimiento en cuanto a la producción de HA en cada uno de ellos. Los resultados se presentan a continuación.

9.1- CARACTERIZACIÓN FENOTIPICA DE LA CEPA

9.1.1.- Reconstitución de la cepa:

La cepa obtenida de la colección de la UCV, la cual se encontraba conservada en congelador, fue reconstituida en 10mL de medio BHI y dejada overnight a 37°C en estufa, mismo protocolo seguido para los preinoculos preparados para cada fermentación (En Medio BHI y tioglicolato), los reconstituidos y los preinoculos, presentaron un medio de cultivo claro con gran crecimiento y floculación de la bacteria, obteniéndose mayor crecimiento y floculación en medio BHI, en la Figura 10 se puede observar el comportamiento de la cepa.

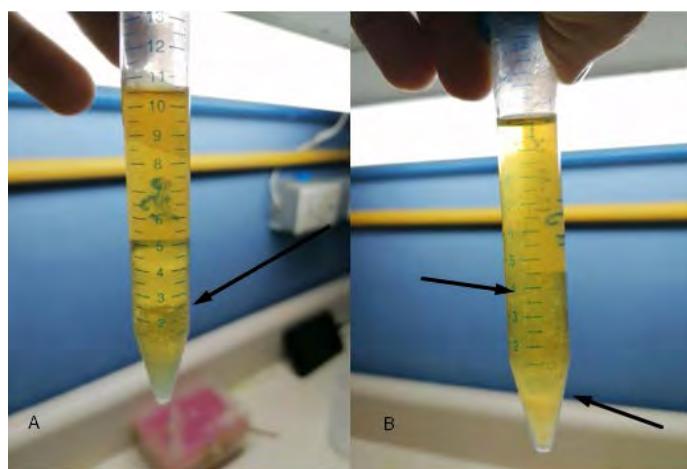


Figura 10. Cultivos preinoculos de *Streptococcus equi subsp zooepidemicus* en: A (BHI) y B (Tioglicolato). Las flechas indican la presencia de flóculos.

9.1.2.- Caracterización en cajas de agar sangre:

De los preinóculos se tomó una alícuota para sembrar por método de agotamiento en 2 cajas de agar sangre, las cuales se cultivaron en estufa overnight a 36°C, obteniéndose una hemólisis con halos grandes respecto a la colonia, la cual presentó un pequeño círculo de color blanco brillante; el fenotipo de la cepa en la caja de agar-sangre se puede observar en la **figura 11**.



Figura 11. Caracterización de la cepa de *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* en caja de agar sangre (las flechas indican las colonias y los halos de hemólisis).

9.1.3.- Caracterización morfológica bajo observación al microscopio

De las cajas de agar sangre, haciendo uso de un asa para microbiología, se tomó una muestra de las colonias aisladas y se observó bajo el microscopio de luz de la marca Niko serie eclipse, usando un objetivo x40 y con observación directa, cadenas largas típicas de *Streptococcus*: encapsuladas, no móviles, no esporulantes, (ver **Figura 12**).



Figura 12. *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* observados bajos microscopio de luz.

9.1.4.- Liofilización de la cepa

Una vez caracterizada la cepa de *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus*, se procedió a su conservación en leche descremada al 10%, haciendo uso de un liofilizador de la marca VirTis adVantage, el cual mediante criodesecación permitió conservar la cepa para su almacenamiento en el tiempo y para su posterior uso en la preparación de inóculos.



Figura 13. Montaje del liofilizador (A) y lote de bacterias liofilizadas (B)

9.2.- MEJORAMIENTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO

En este apartado se muestran los resultados obtenidos de los ensayos realizados, para mejorar las condiciones de cultivo y que posteriormente fueron empleados para las fermentaciones en medio litro.

Los ensayos realizados en medio tioglicolato para mejorar las condiciones de cultivo como son: pH, temperatura y agitación, se muestran junto al crecimiento celular expresado en peso seco y la producción de HA para cada parámetro en la **tabla 1**. Encontrándose que bajo las condiciones de: pH 7, 37°C y 300 r.p.m, se obtuvo el mayor crecimiento y producción de HA, seleccionándose estas condiciones para las fermentaciones realizadas en biorreactor de 500mL, debido a su rendimiento en cuanto crecimiento y producción de ácido hialurónico.

Se realizó un segundo ensayo en medio BHI, añadiendo el aminoácido glutamina y el agente alquilante Iodocetamida, para determinar el crecimiento celular y la producción de HA en condiciones de estrés; mostrándose un valor máximo de peso seco de 0.8152 mg/mL y una producción de HA de 0.68 g/L. Este ensayo se realizó durante 24 horas en estufa a 37°C, sin control de pH ni de agitación. Estas condiciones no fueron empleadas en las fermentaciones al no tener un buen rendimiento (ver conclusiones).

Tabla 1. Parámetros obtenidos de los ensayos para mejorar las condiciones de cultivo y posteriores fermentaciones

pH	Temperatura	Agitación	peso seco (mg/mL)	Producción HA (g/L)
-	37°C	300 r.p.m	0.18	0.33
-	37°C	-	0.10	0.19
6	37°C	300 r.p.m	0.38	0.34
6	37°C	-	0.28	0.32
7	37°C	300 r.p.m	0.52	0.41
7	37°C	-	0.44	0.38
8	37°C	300 r.p.m	0.26	0.32
8	37°C	-	0.25	0.32

9.3.- FERMENTACIONES DE 500mL EN MEDIO TIOGLICOLATO NO COMERCIAL

En este apartado se muestran los resultados de las fermentaciones realizadas con las condiciones fisicoquímicas optimas determinadas en el apartado anterior y, probando tres medios de cultivo; introduciendo algunas modificaciones en el medio tioglicolato no comercial (ver metodología). Los valores obtenidos de máxima producción de HA y peso seco se observan en la **Figura 24**

Glucosa y maltosa como fuente de carbono

Fermentación 1: Se llevó a cabo con 1.5g de glucosa y 1.23g de maltosa por litro para observar el crecimiento y producción de HA, tomando cada 30 minutos una muestra para su posterior determinación de HA (ver metodología). En la **figura 14** se muestra el número de células totales mg/mL (peso seco) con respecto al tiempo de fermentación y producción de HA en cada hora; así como el consumo de glucosa. obteniéndose un máximo de 0.33 g/L de ácido hialurónico en la hora 1, antes de la diauxia; también se observa el consumo de glucosa a medida que avanza la fermentación (no se tiene el consumo de maltosa), se puede ver en este gráfico que en la tercera hora de fermentación se agotó la glucosa. Sin embargo, el punto de inflexión correspondiente a la diauxia no es tan marcado, este punto de inflexión se encuentra entre la hora 2.5 y 3 de la fermentación.

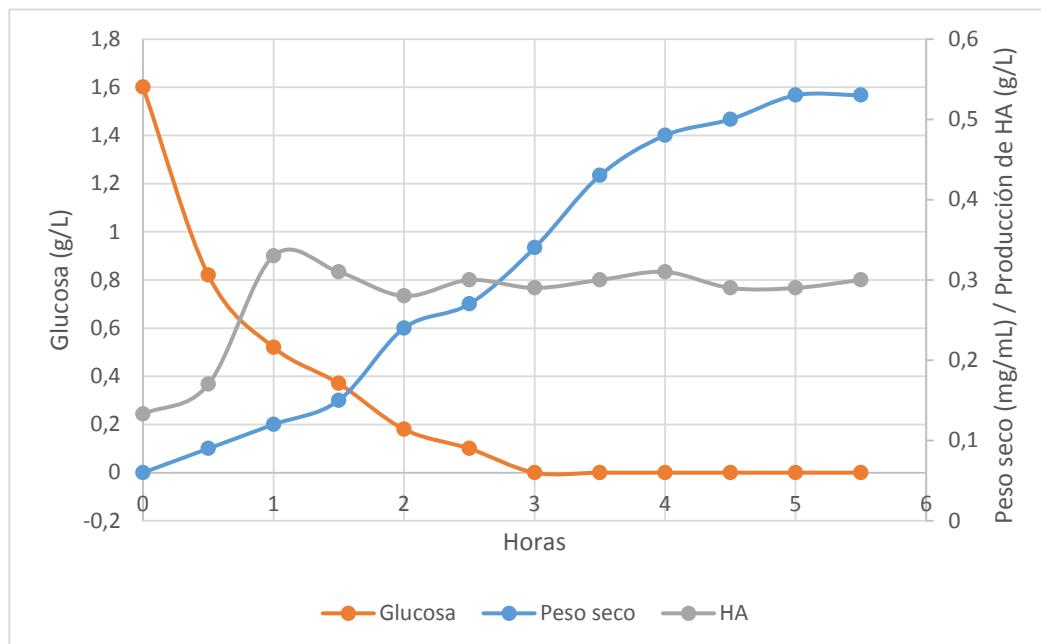


Figura 14. Gramos de células totales (peso seco) vs producción de HA vs consumo de glucosa

Fermentación 2: Se llevó a cabo aumentando la concentración de azúcares: 5 g de glucosa y 2 g de maltosa por litro. En la **figura 15** se muestra el peso seco con respecto al tiempo de fermentación y producción de HA en cada hora, obteniéndose un máximo de 0.35 g/L de ácido hialurónico antes de la diauxia; en la figura también se observa el consumo de glucosa y maltosa a medida que avanza la fermentación; se puede ver en este gráfico que, en la quinta hora de fermentación, hay un mayor consumo de glucosa y está decae rápidamente e inicia el consumo de maltosa, este punto corresponde a la diauxia. El punto de inflexión correspondiente a la diauxia se encuentra entre la hora 5 y 5.5 de la fermentación, una vez se consume la maltosa se alcanza la fase estacionaria.

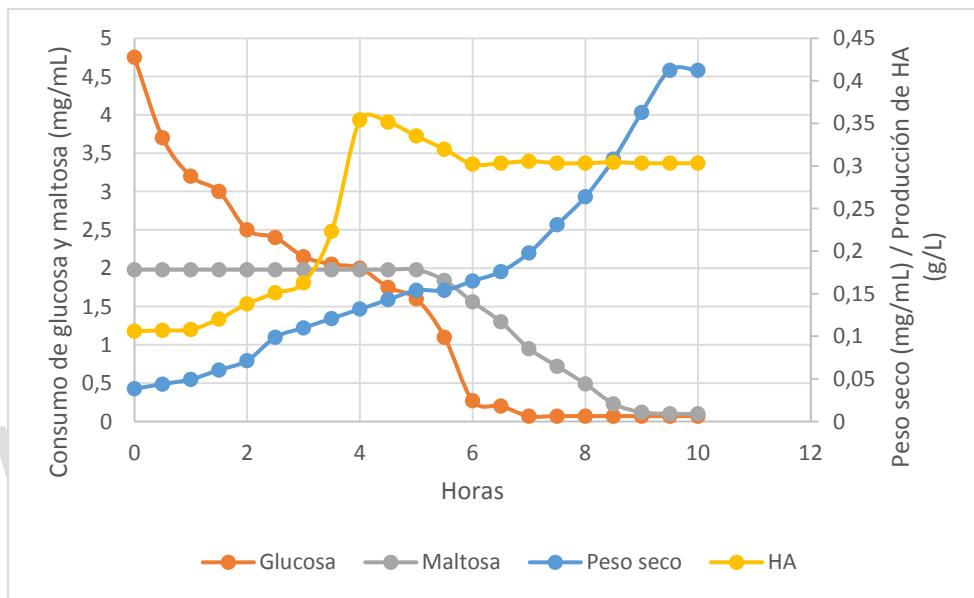


Figura 15. Peso seco vs producción de HA vs consumo de azúcares (Glucosa y maltosa)

Glucosa como fuente de carbono

Fermentación 3: En esta fermentación se incrementó la concentración de azúcar a 20 g/L. En la **figura 16** se pueden observar el peso seco con respecto al tiempo de fermentación y producción de HA en cada hora, obteniéndose un máximo de 0.68 g/L de ácido hialurónico. La figura también muestra el consumo de glucosa vs peso seco y vs producción de HA al pasar de las horas de fermentación; se puede observar que el máximo punto de producción se encuentra justo en el momento en donde decae la glucosa en la hora 6.6; cuando se consume la glucosa se alcanza la fase estacionaria del crecimiento bacteriano

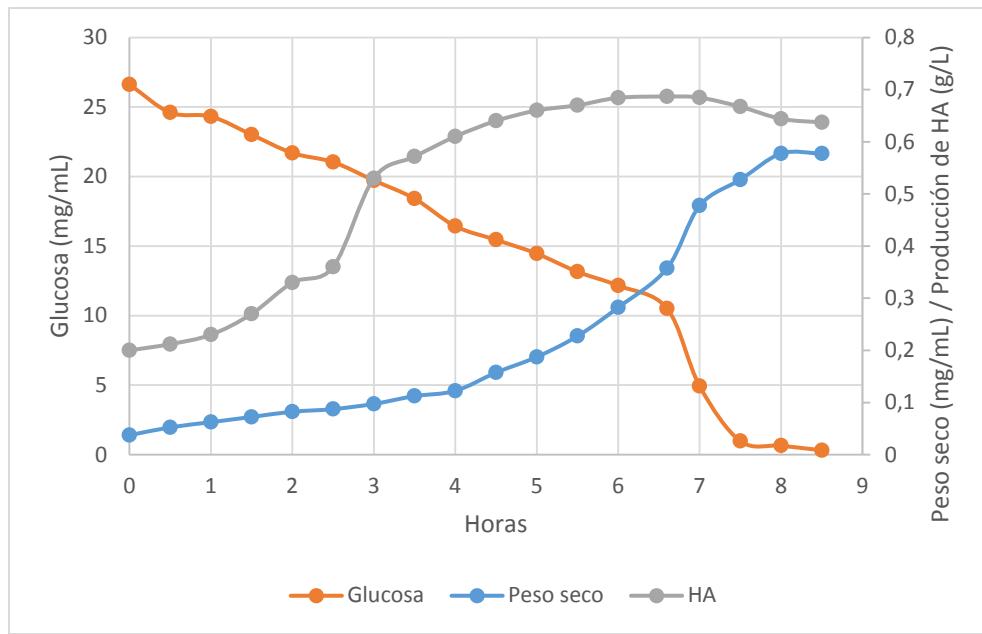


Figura 16. Gramos de células totales (peso seco) vs producción de HA vs consumo de glucosa.

Fermentación 4: Se realizó con 20 g/L de glucosa y se cambió el aminoácido cisteína de la formulación original por arginina. En la **figura 17** se pueden observar el peso seco vs la producción de HA a lo largo de la fermentación, obteniéndose un máximo de 0.70 g/L de HA en la hora 5.5, posteriormente el valor decae hasta 0.53 g/L de HA al final de la fermentación. La figura también muestra el consumo de glucosa vs peso seco y vs producción de HA; se puede observar que el máximo punto de producción se encuentra justo en el momento en donde decae rápidamente la glucosa en la hora 5; cuando se consume la glucosa se alcanza la fase estacionaria del crecimiento bacteriano y decae la producción de HA.

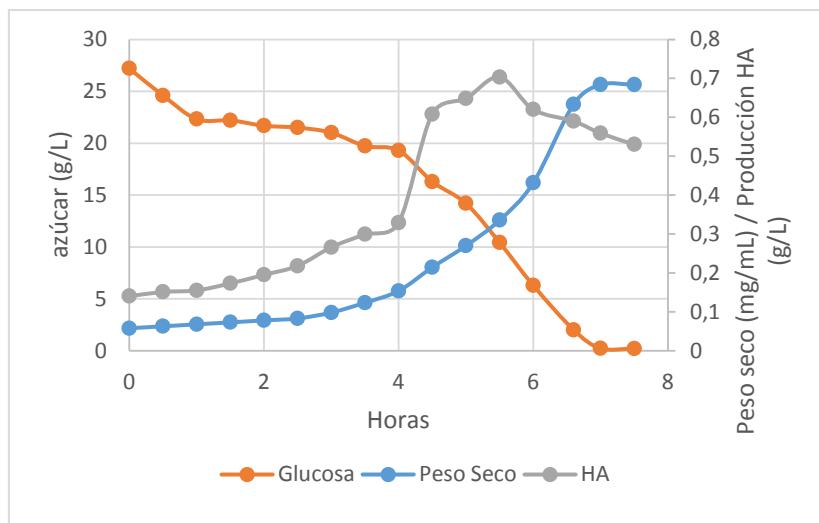


Figura 17. Peso seco vs producción de HA vs consumo de glucosa

Fermentación 5: Se realizó con 20g/L de glucosa y se sustituyó la cisteína de la formulación comercial de tioglicolato por glutamina al 0.5% en 0.5L. En la **figura 18** se puede observar el peso seco vs la producción de HA por hora de fermentación; obteniéndose un máximo de 0.96g/L de HA en la hora 5, posteriormente los valores de HA se mantienen relativamente constantes a medida que decae el azúcar y entra en fase estacionaria la curva de crecimiento bacteriano. En la figura se muestra el consumo de glucosa vs peso seco y vs producción de HA; se puede ver que el máximo punto de producción corresponde al rápido decaimiento de glucosa en la hora 5; cuando se consume completamente la glucosa las bacterias entran en fase estacionaria (puntos 6.5 y 7 de la curva).

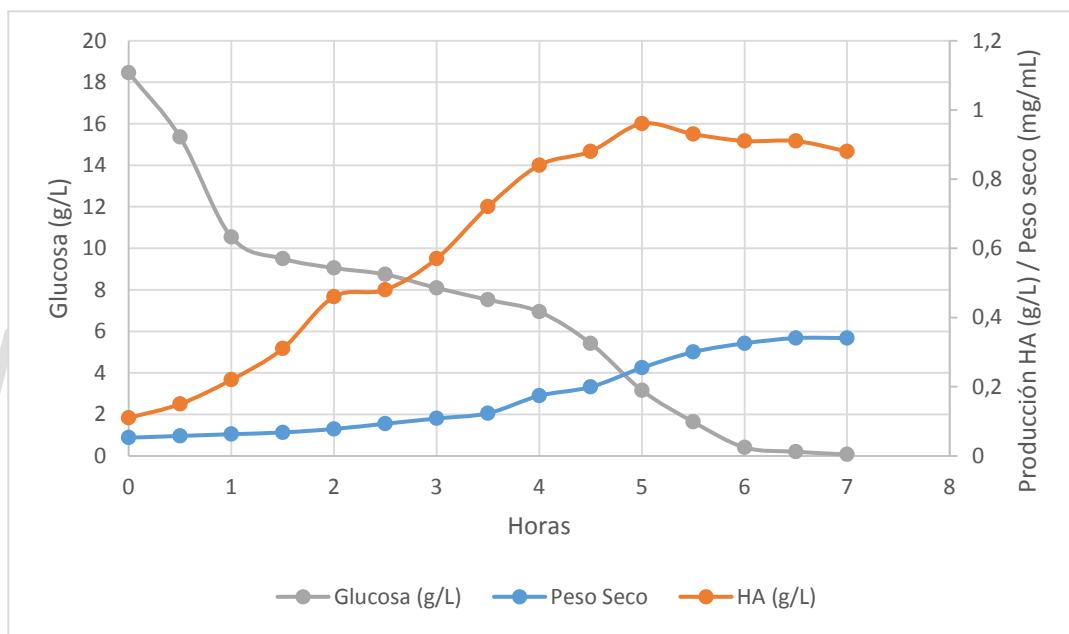


Figura 18. Peso seco vs producción de HA vs consumo de glucosa

Fermentación 6: Se realizó con 20g/L de glucosa y con 0.04g/L del agente alquilante Iodoacetamida, sustituyendo al aminoácido cisteína de la formulación comercial de tioglicolato. En la **figura 19** se puede observar el peso seco vs la producción de HA por hora de fermentación; obteniéndose un máximo de 1.02 g/L de HA en la hora 5.5, posteriormente los valores de HA se mantienen relativamente constantes a medida que decae el azúcar y se llega al final de la fermentación. La figura también **muestra** el consumo de glucosa vs peso seco y vs producción de HA; se puede observar que el máximo punto de producción corresponde al rápido agotamiento de glucosa en el punto

6 de la fermentación; cuando se consume completamente la glucosa las bacterias entran en fase estacionaria (puntos 7 y 7.5 de la curva).

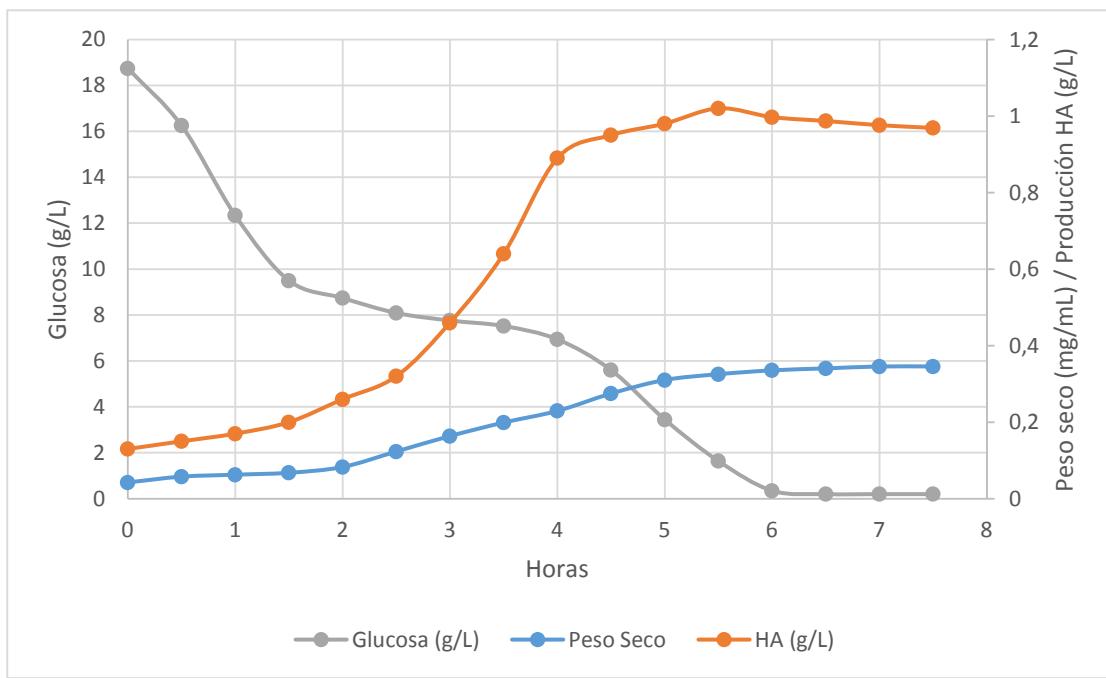


Figura 19. Peso seco vs producción de HA vs consumo de glucosa

Fermentación 7: Se realizó con 20g/L de glucosa y 0.04g/L del agente alquilante Iodoacetamida, sustituyendo al aminoácido cisteína de la formulación comercial de tioglicolato por glutamina al 0.5% en 0.5L. En la **figura 20** se puede observar el peso seco vs la producción de HA por hora de fermentación; obteniéndose un máximo de 1.17 g/L de HA en la hora 4.5, posteriormente los valores de HA se mantienen constantes a medida que decae el azúcar y se llega al final de la fermentación. En la figura se muestra también el consumo de glucosa vs peso seco y vs producción de HA; se puede observar que el máximo punto de producción corresponde al rápido agotamiento de glucosa en el punto 4.5 de la fermentación; cuando se consume completamente la glucosa las bacterias entran en fase estacionaria (puntos 5.5 y 6.0 de la curva)

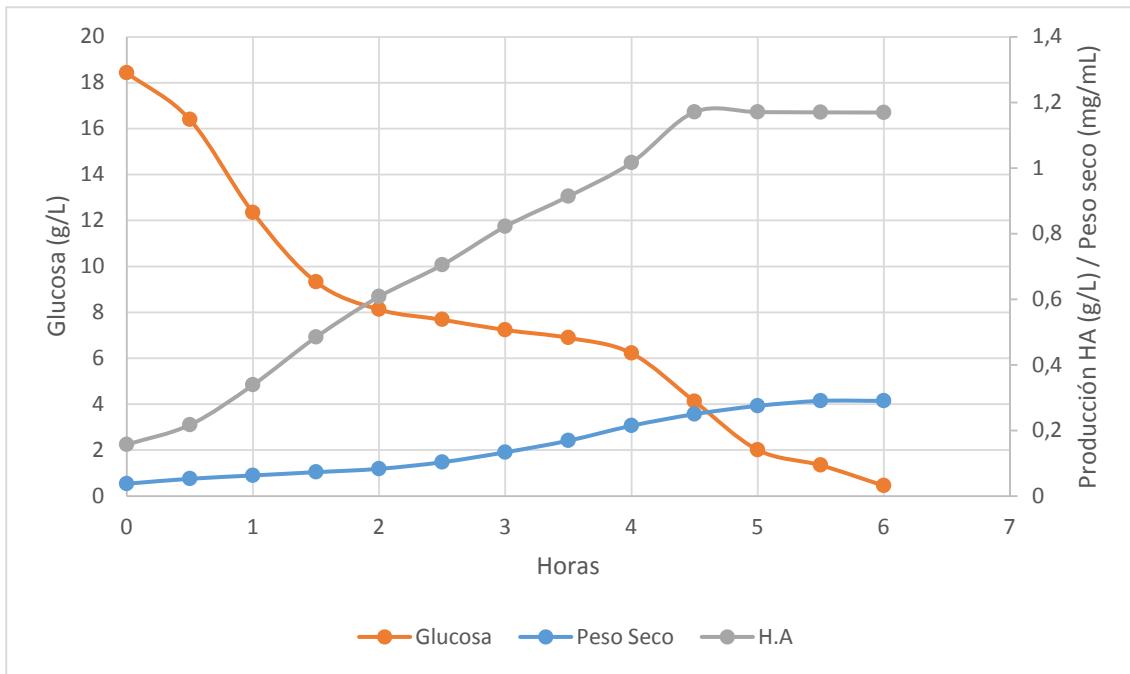


Figura 20. Peso seco vs producción de HA vs consumo de glucosa

9.4.- FERMENTACIÓN DE 500 mL EN MEDIO TIOGLICOLATO COMERCIAL

Glucosa como fuente de carbono:

Fermentación 8: Se realizó con 14.5 g/500 mL sin hacer cambios en la formulación del medio (ver anexos- preparación de medios). En la **Figura 21** se puede observar el peso seco vs la producción de HA por hora de fermentación; obteniéndose un máximo de 0.86 g/L de HA en la hora 4 de fermentación, posteriormente los valores de HA se mantienen constantes a medida que decae el azúcar y se llega al final de la fermentación con una diferencia de +/- 0.01 g/L. La **Figura 21** también muestra el consumo de glucosa vs peso seco y vs producción de HA; se puede observar que el máximo punto de producción corresponde al rápido agotamiento de glucosa en el punto 4 de la fermentación; cuando se consume completamente la glucosa las bacterias entran en fase estacionaria

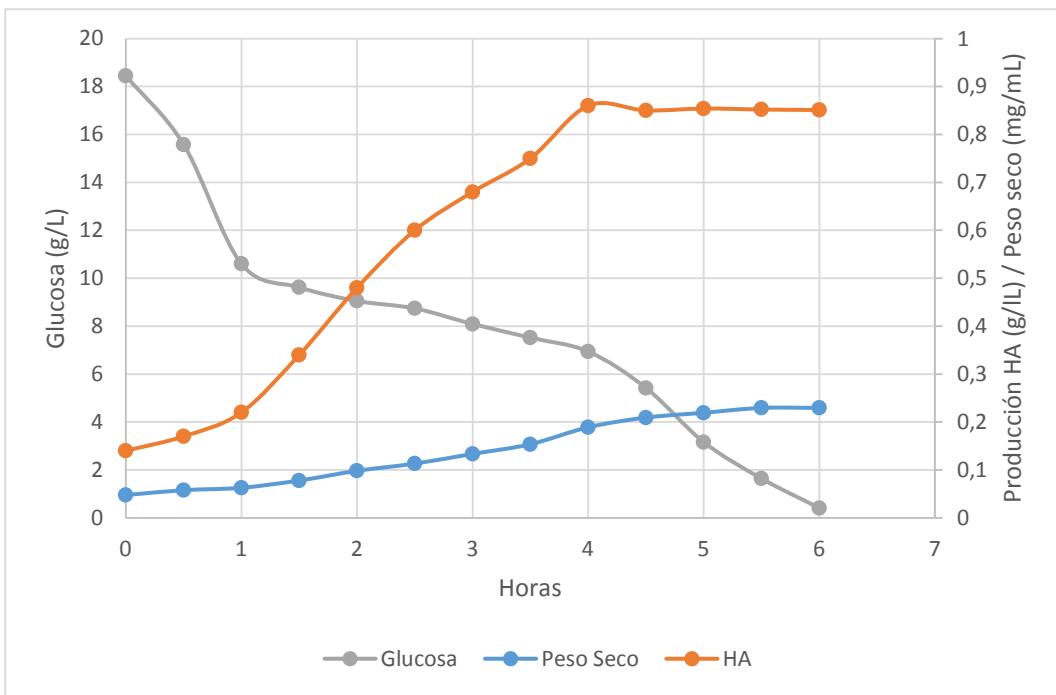


Figura 21. Peso seco vs producción de HA vs consumo de glucosa

9.5.- FERMENTACIONES DE 500mL EN MEDIO BHI (INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN)

Glucosa como fuente de carbono:

Fermentación 9: Se realizó con 20g/L sin hacer cambios en la formulación del medio (ver anexos-preparación de medios). En la **figura 22** se puede observar el peso seco vs la producción de HA por hora de fermentación; obteniéndose un máximo de 0.63 g/L de HA en la hora 4, posteriormente los valores de HA se mantienen relativamente constantes a medida que decae el azúcar y se llega al final de la fermentación con una diferencia de +/- 0.01 g/L. La figura 22 también muestra el consumo de glucosa vs peso seco y vs producción de HA; se puede observar que el máximo punto de producción corresponde al rápido agotamiento de glucosa en el punto 4 de la fermentación; cuando se consume completamente la glucosa las bacterias entran en fase estacionaria (puntos 4.5 y 5.0 de la curva).

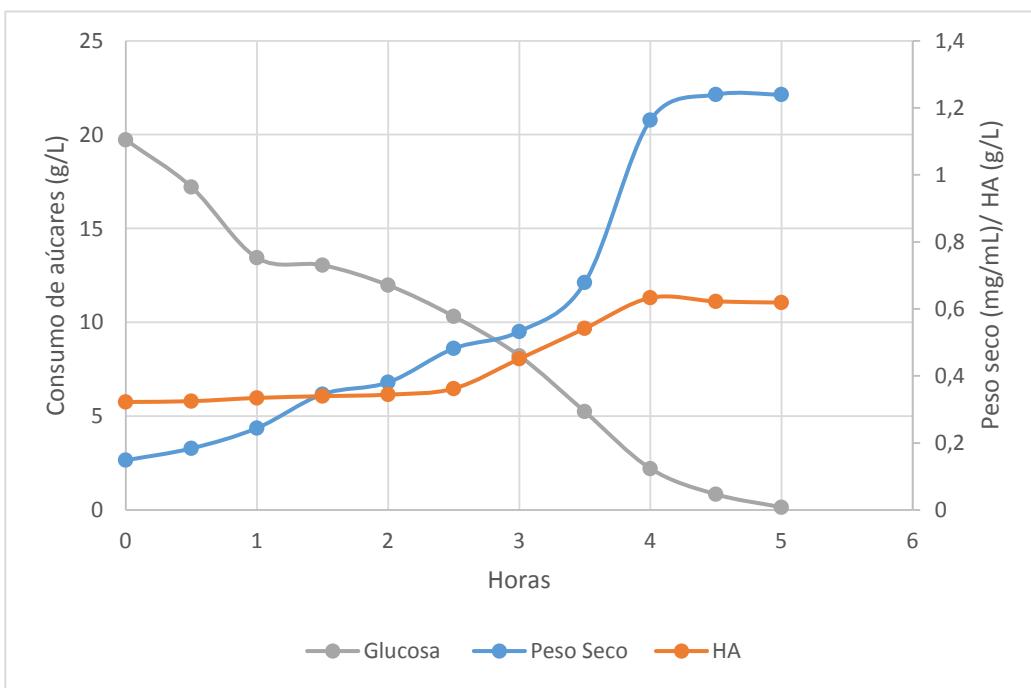


Figura 22. Peso seco vs producción de HA vs consumo de glucosa

Fermentación 10: Se realizó con 20g/L de glucosa, 0.04g/L del agente alquilante Iodoacetamida y glutamina al 0.5% en 0.5L). En la **figura 23** se puede observar el peso seco vs la producción de HA por hora de fermentación; obteniéndose un máximo de 0.63 g/L de HA en la hora 3.5, posteriormente los valores de HA se mantienen relativamente constantes a medida que decae el azúcar y se llega al final de la fermentación. La figura también muestra el consumo de glucosa vs peso seco y vs producción de HA; se puede observar que el máximo punto de producción corresponde al rápido agotamiento de glucosa en el punto 4 de la fermentación; cuando se consume completamente la glucosa las bacterias entran en fase estacionaria (punto 4 y 4.5).

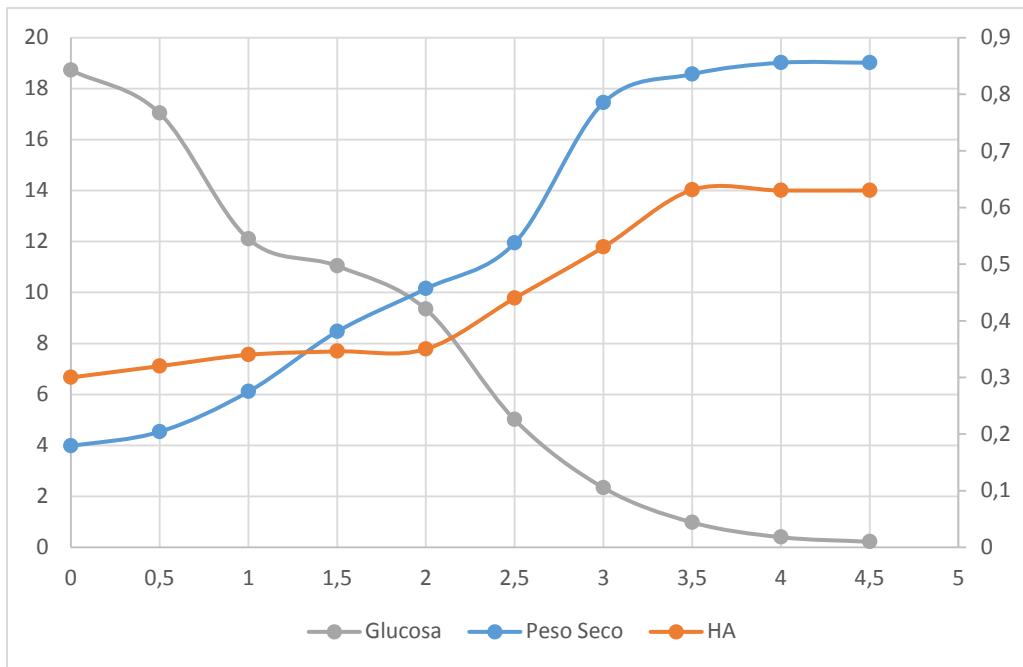


Figura 23. Peso seco vs producción de HA vs consumo de glucosa

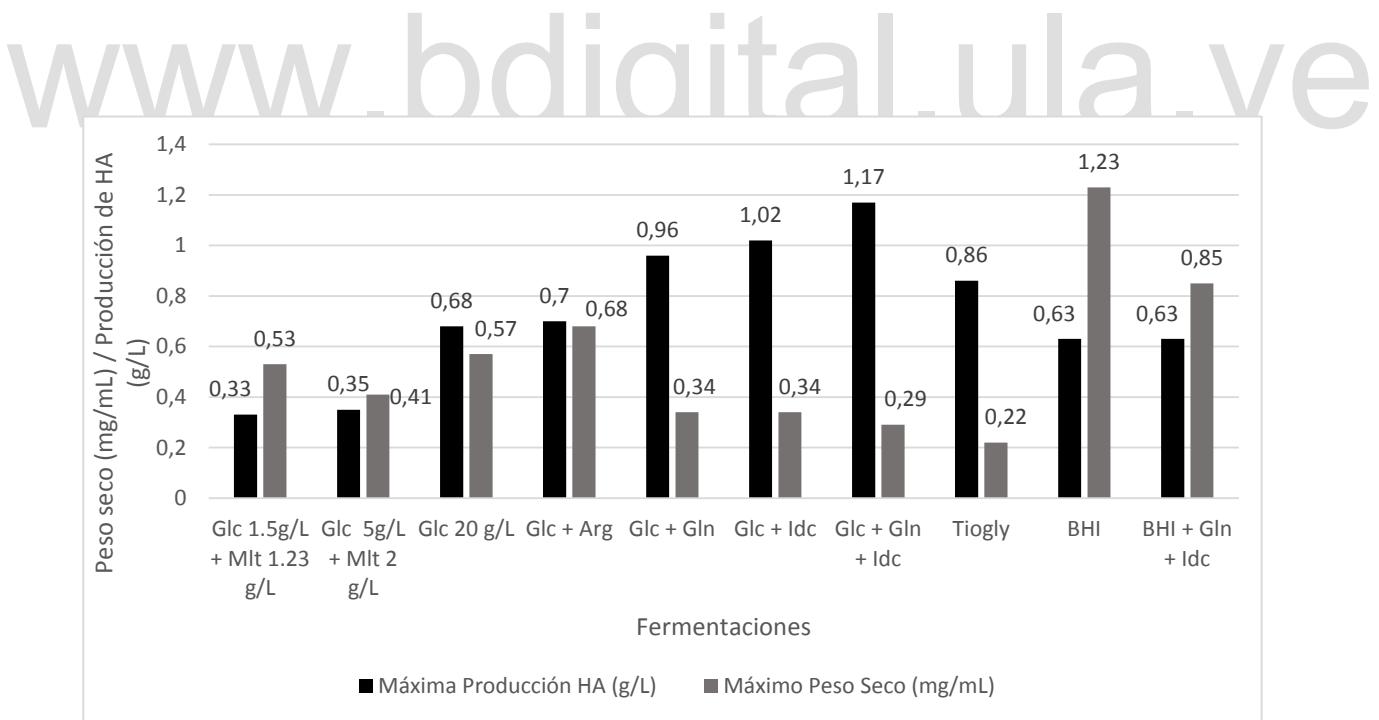


Figura 24. Diagrama comparativo entre la máxima producción de HA (g/L) y la máxima producción de peso seco (mg/mL) Abreviatura: **Glc** (Glucosa); **Mlt** (Maltosa); **Arg** (Arginina); **Gln** (Glutamina); **Idc** (Iodoacetamida); **Tiogly** (Tioglicolato); **BHI** (Infusión cerebro-corazón).

9.6.- CALCULOS OBTENIDOS A PARTIR DE LAS FERMENTACIONES.

Tiempo de generación (θ) para las diferentes fermentaciones realizadas:

En la **figura 25** se muestra el tiempo de generación obtenidos en las fermentaciones de 500mL para cada uno de los medios empleados y sus distintas formulaciones. El mayor valor de θ se obtuvo en la fermentación realizada con 20g de glucosa más el aminoácido arginina ($\theta = 173$ minutos.), seguido por la fermentación de realizada con 20g de glucosa más el aminoácido glutamina ($\theta = 153.96$ minutos). El menor de los valores fue obtenido por la fermentación realizada con 20g de glucosa más el agente alquilante idoacetamida ($\theta = 98.25$ minutos).

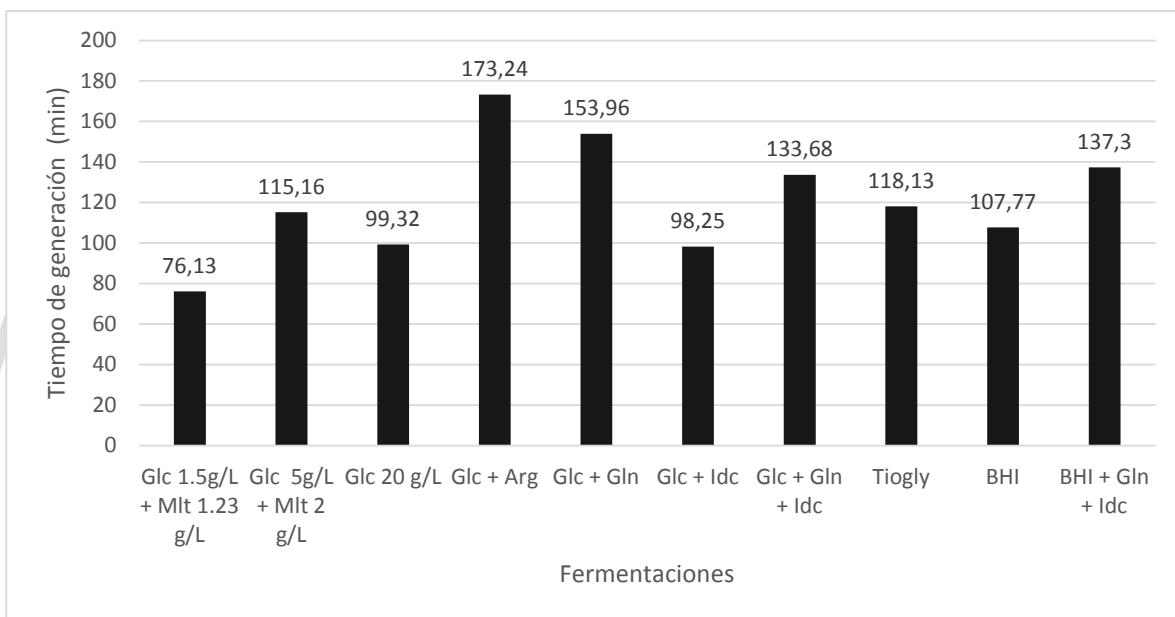


Figura 25. Tiempo de generación obtenido en las distintas fermentaciones realizadas en biorreactor de 500 mL. Abreviatura: **Glc** (Glucosa); **Mlt** (Maltosa); **Arg** (Arginina); **Gln** (Glutamina); **Idc** (Iodoacetamida); **Tiogly** (Tioglicolato); **BHI** (Infusión cerebro-corazón).

Velocidad de crecimiento (K) para las diferentes fermentaciones realizadas:

El mayor valor de K obtenido, se presentó en la fermentación diauxia 1 ($K = 0.024$ bacterias/min), en la etapa de consumo de glucosa y el menor valor obtenido, fue en la fermentación con glucosa y glutamina ($K = 0.005$ bacterias/min). Tanto el mayor como el menor valor de K fueron en medio

tioglicolato no comercial; los valores de K para todas las fermentaciones se pueden observar en la **Figura 26**.

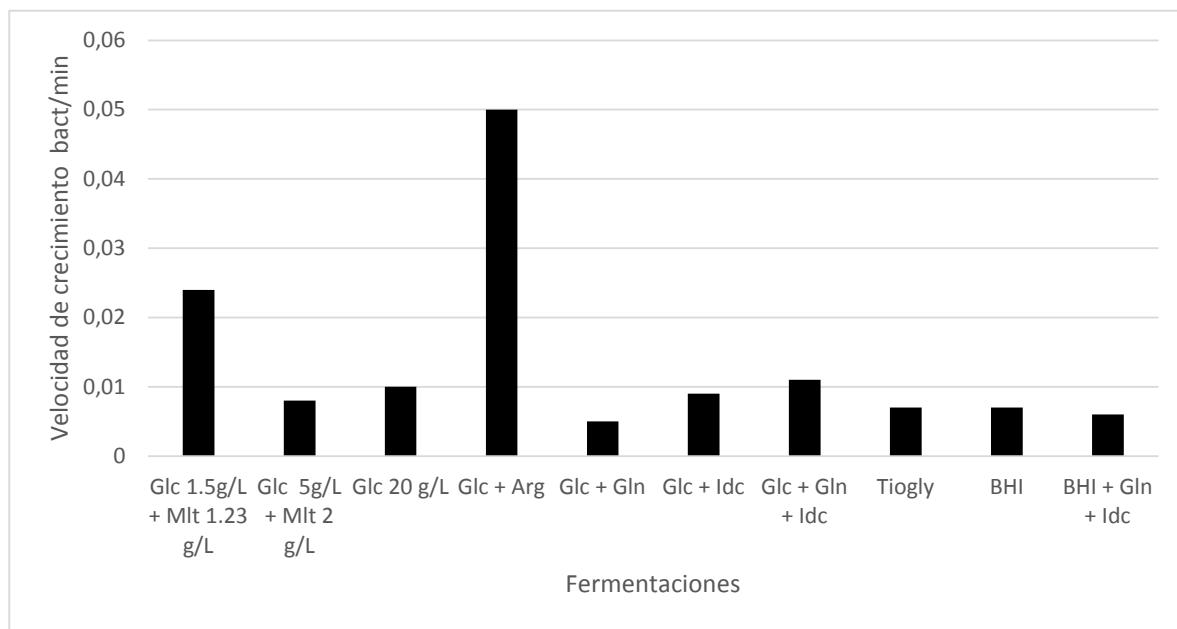


Figura 26. Velocidad de crecimiento para las diferentes fermentaciones realizadas en biorreactor de 500 mL. Abreviatura: **Glc** (Glucosa); **Mlt** (Maltosa); **Arg** (Arginina); **Gln** (Glutamina); **Idc** (Iodoacetamida); **Tiogly** (Tioglicolato); **BHI** (Infusión cerebro-corazón).

Rendimiento (R) para las diferentes fermentaciones realizadas

En la **figura 27** se puede observar, el medio en el cual se aprovechó mejor el azúcar por parte de las bacterias para su crecimiento. El mayor rendimiento se presentó en la fermentación en medio BHI con glutamina y Iodoacetamida ($R= 0.19$ g de células/h), mientras que el menor rendimiento fue en medio tioglicolato no comercial, en la fermentación diauxia 2, en la fase de consumo de glucosa ($R= 0.05$ g de células/h).

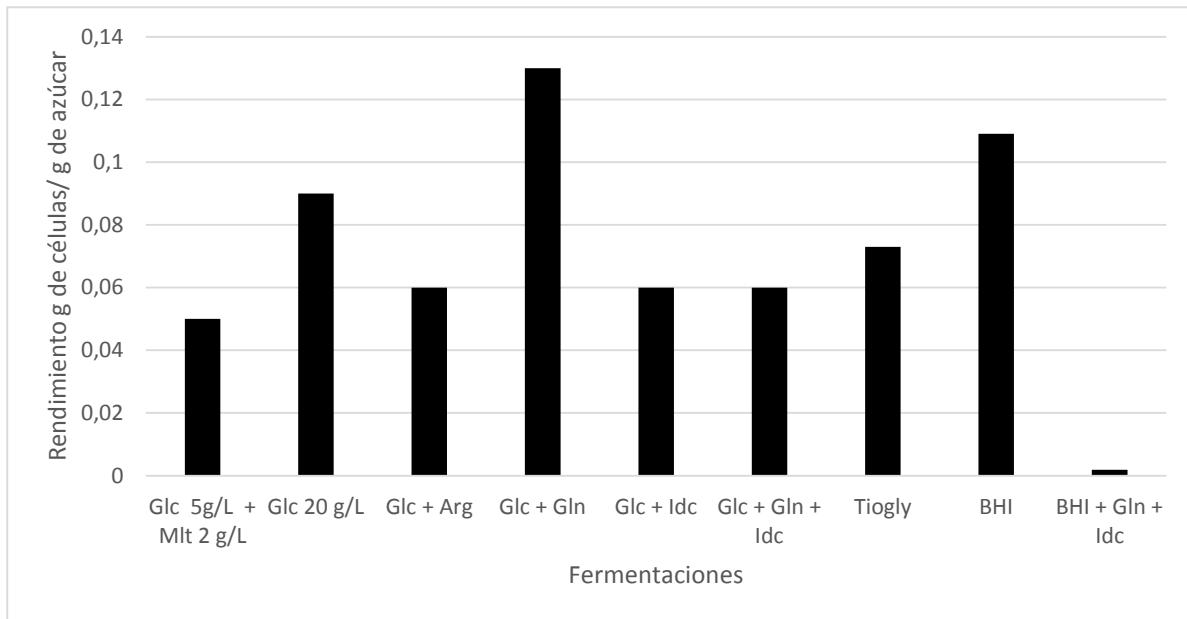


Figura 27. Rendimiento obtenido para las distintas fermentaciones realizadas en biorreactor de 500mL. Abreviatura: **Glc** (Glucosa); **Mlt** (Maltosa); **Arg** (Arginina); **Gln** (Glutamina); **Idc** (Iodoacetamida); **Tiogly** (Tioglicolato); **BHI** (Infusión cerebro-corazón).

Producción de biomasa (P) para las diferentes fermentaciones realizadas

La fermentación que presentó una mayor producción de biomasa, fue la fermentación en medio BHI con glutamina y Iodoacetamida ($P= 0.24$), mientras que la menor producción de biomasa la presento el medio tioglicolato no comercial, en la fermentación- diauxia 2 ($P= 0.035$ g células/h). Los valores de producción de biomasa para todas las fermentaciones se presentan en la **Figura 28**.

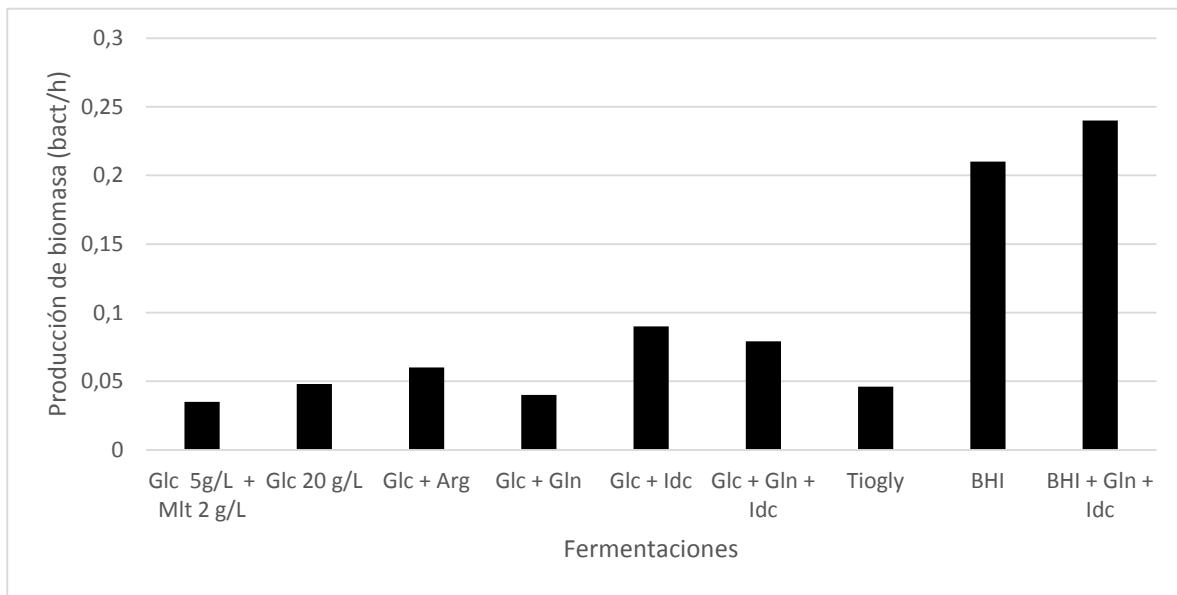


Figura 28. Producción de biomasa para las diferentes fermentaciones realizadas en biorreactor de 500 mL. Abreviatura: **Glc** (Glucosa); **Mlt** (Maltosa); **Arg** (Arginina); **Gln** (Glutamina); **Idc** (Iodoacetamida); **Tiogly** (Tioglicolato); **BHI** (Infusión cerebro-corazón).

Tabla 2. Resumen de los parámetros calculados para las distintas fermentaciones realizadas en biorreactor de 500mL.

Parámetros	HA g/L	Peso seco (mg/m L)	Tiempo de generación (min)	V de crecimiento (bact/min)	Rendimiento (g bact /g azúcar)	Biomasa (g bact/hora)
Glc 1.5g/L + Mlt 1.23 g/L	0.33	0.53	76.13	0.024	-	-
Glc 5g/L + Mlt 2 g/L	0.35	0.41	115.16	0.008	0.05	0.035
Glc 20 g/L	0.68	0.57	99.32	0.01	0.09	0.048
Glc + Arg	0.7	0.68	173.24	0.05	0.06	0.06
Glc + Gln	0.96	0.34	153.96	0.005	0.13	0.04
Glc + Idc	1.02	0.34	98.25	0.009	0.06	0.09
Glc + Gln + Idc	1.17	0.29	133.68	0.011	0.06	0.079
Tiogly	0.86	0.22	118.13	0.007	0.073	0.046
BHI	0.63	1.23	107.77	0.007	0.13	0.21
BHI + Gln + Idc	0.63	0.85	137.3	0.006	0.10	0.24

Abreviatura: **Glc** (Glucosa); **Mlt** (Maltosa); **Arg** (Arginina); **Gln** (Glutamina); **Idc** (Iodoacetamida); **Tiogly** (Tioglicolato); **BHI** (Infusión cerebro-corazón).

10.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

10.1- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA CEPA

Las bacterias sembradas en agar sangre, mostraron colonias pequeñas, de color blanco perlado, con apariencia mucoide y con halos de hemólisis grandes (ver **figura 11**), la caracterización coincide con el fenotipo reportado para *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* por Marr et al., 2014, quienes publicaron una fotografía de un cultivo de *S. zooepidemicus* en una caja de agar sangre. Milligan R, 2019; también reportó el mismo fenotipo en diferentes cultivos de agar sangre, para distintas especies de *Streptococcus equi*, describiendo colonias translúcidas, de aspecto brillante y con presencia de β -hemólisis.

Los preinoculos preparados a partir de muestras congeladas o de las cajas de agar sangre, mostraron un mayor crecimiento y floculación cuando se reconstituían o sembraban en medio BHI. Sin embargo, en medio tioglicolato también crecían y floculaban, pero en menor proporción (Ver **figura 10**); estos resultados coinciden con la biomasa obtenida en las fermentaciones realizadas con estos medios (ver **tabla 2**).

La observación al microscopio de la cepa de *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* empleada, mostró las características que han sido descritas para la especie, mostrando células inmóviles; encapsuladas; no esporulantes y; que forman largos collares de cocos (ver **figura 12**), mismas características que ha sido reportadas por el (Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo, 2018) y por (Choi et al., 2011), en su trabajo de características bioquímicas y moleculares de *S. zooepidemicus*.

10.2- MEJORAS EN LAS CONDICIONES DE CULTIVO

Los resultados de los ensayos realizados buscando las mejores condiciones de cultivo para su posterior uso en fermentaciones de 500 mL que fueron seleccionados por obtener un mayor rendimiento en cuanto crecimiento celular y producción de HA son: pH = 7, temperatura = 37°C y agitación = 300 r.p.m (ver **tabla 1**); estos parámetros coinciden con los determinados y empleados por (Shah et al., 2013) en donde el pH se reguló mediante la adición por control en el biorreactor de NaOH 4M.

Temperatura: *Streptococcus zooepidemicus*, como la gran mayoría de las especies del género *Streptococcus*, son altamente sensibles a los cambios de temperatura. Algunos autores como (Khue y Vo, 2013) reportan una máxima producción de HA a 40°C. Sin embargo, otros autores como (Kim et al., 1996) y (Caldas et al., 2015) determinaron que 37°C era la temperatura óptima de producción de HA, temperatura que coincide con la determinada en esta investigación.

pH: Se encontró una mayor producción de HA a un pH de 7 (ver **tabla 1**) este resultado coincide con (Liu et ., 2007), quienes empleando un biorreactor, reportaron un aumento en la producción de HA cuando la cepa era expuesta a estrés alcalino a pH 7.0-8.5 a 37°C; el estrés alcalino mejora la producción de HA, redirigiendo la fuente de carbono para producción e inhibiendo el crecimiento celular y la formación de ácido láctico; ya que existe una gran competencia para el uso de la fuente de carbono, entre la síntesis de HA y el crecimiento celular

Agitación: La agitación se mantuvo a 300 r.p.m en todos los ensayos y fermentaciones realizadas, las variaciones en cuanto a pH y temperatura, fueron las que mostraron cambios en la producción de HA. Sin embargo, diversos autores como (Liu et al., 2007) y (Caldas, 2015) reportan una mayor producción de HA a 200 r.p.m, mientras que (Barbosa y Santana, 2010) reportan la mayor producción incrementando la agitación a 250 r.p.m. Sin embargo, (Jhons et al., 1994), mencionan que agitaciones de 600 r.p.m mejoran el rendimiento del HA más no la tasa de producción que se obtiene con agitaciones de 300 r.p.m.

10.3- FERMENTACIONES DE 500mL EN MEDIO TIOGLICOLATO NO COMERCIAL

Fermentaciones con crecimiento diaúxico: Las fermentaciones 1 y 2 fueron realizadas empleando glucosa y maltosa como fuentes de carbono (1.5g de glucosa/1.23g de maltosa y 5g de glucosa/2g de maltosa respectivamente). El crecimiento diaúxico conseguido en ambas fermentaciones, mostraron los niveles más bajos tanto de peso seco como de HA producidos de todas las fermentaciones (0.33 y 0.35 g/L, respectivamente) (ver **tabla 2**). Los niveles de HA más altos en ambas fermentaciones, se alcanzaron en la fase de agotamiento de la glucosa, posteriormente a la fase de inicio del consumo de la maltosa, no se observa un aumento en la producción, más si en el crecimiento bacteriano. (ver **figuras 14,15**).

(Boeriu et al., 2013) determinó que las cepas de *Streptococcus*, en general emplean glucosa como fuente de carbono. La biosíntesis de HA en *Streptococcus* requiere de una gran cantidad de energía, la cual compite con la bacteria para el crecimiento de la misma. Por tanto, la glucosa proporciona a las células dicha energía. Cuando se emplea una baja concentración de glucosa, esta es destinada para el crecimiento. Sin embargo, una adecuada concentración de glucosa limita el crecimiento, ya que cuando las células están creciendo lentamente, los recursos de carbono y energía están disponibles para otros procesos, como lo es la producción de HA.

No existen reportes previos de fermentaciones que empleen glucosa y maltosa para la producción de HA, las investigaciones existentes en fermentaciones con glucosa y maltosa, pertenecen a otros sistemas biológicos como *Streptococcus equisimilis* y *Streptococcus pyogenes*, cuyas fermentaciones con crecimiento diaúxico, muestran una buena producción de otro metabolito de interés médico, como lo son las Streptokininas, tal y como reportan (Cruz, 1991) y (Torres, 2000). Por tanto, se necesitaría realizar más ensayos para determinar si es la baja concentración de glucosa quien limita la producción de HA o si el cambio de azúcar, desvía la ruta hacia crecimiento celular (vía glucolítica).

Fermentaciones que emplean glucosa como medio de carbono: El resto de fermentaciones realizadas con medio tioglicolato no comercial, se realizaron empleando 20g de glucosa. Al incrementarse la concentración de glucosa, aumentó al doble la producción de HA en la fermentación 3, con respecto a las fermentaciones 1 y 2 (0.68 g/L) (ver **tabla 2 y Figura 16**). (Barbosa y Santana, 2010) obtuvieron un aumento significado en la producción de HA con concentraciones similares de glucosa (25g). Por tanto, al aumentar las concentraciones de glucosa en el medio, el crecimiento bacteriano es lento, mientras que la producción de HA aumenta, tal y como lo reporta (Boeriu et al., 2013).

Cambio del aminoácido cisteína por arginina: En la fermentación 4 se sustituyó el aminoácido cisteína de la formulación original, por arginina. El cambio aumentó la producción de HA a 0.70g/L (ver **tabla 2 y figura 17**) con respecto a la fermentación 3; aumento que resulta bajo. Sin embargo, hubo un aumento tanto en la producción de HA como en la biomasa. Esto se puede explicar debido a la importancia de la arginina, como uno de los tres aminoácidos esenciales en la ruta que conlleva a la producción de HA (cisteína, arginina y lisina), (Liu et al., 2009) reportan un incremento tanto en rendimiento como en producción de HA cuando se añaden concentraciones adecuadas de alguno de

estos tres aminoácidos esenciales (0.05g para la arginina), el medio original de tioglicolato emplea 0.26g de aminoácido (ver anexos- preparación de medios).

Cambio del aminoácido cisteína por glutamina: En la fermentación 5 se sustituyó el aminoácido cisteína de la formulación original de tioglicolato por glutamina. El cambio aumentó la producción de 0.70g/L de la fermentación 4 a 0.96 g/L (ver **figura 18**) y disminuyó la biomasa de 0.06 a 0.04 g de bacterias/hora (ver **tabla 2**). La adición de glutamina aumenta la producción de HA, al ser esta donante de grupos aminos para la formación de N-acetylglucosamina, precursor clave en la ruta de producción de HA. Por tanto, la glutamina mejora la ruta de producción, al actuar hacia la formación de UDP- N-acetylglucosamina, aumentando hasta un 5% el HA (Shah et al., 2013).

Cambio del aminoácido cisteína por el agente alquilante Iodoacetamida: En la fermentación 6, se sustituyó el aminoácido cisteína por la Iodoacetamida, este cambio incrementó la producción de HA de 0.96 g/L en la fermentación 5 con glutamina a 1.02 g/L (ver **figura 19**). Sin embargo, la producción de biomasa aumentó a 0.09 g de bacterias/hora (ver **tabla 2**). La Iodoacetamida al igual que el Iodoacetato, son empleados frecuentemente para inhibir la glicolisis, esto se logra gracias al efecto inhibitorio e irreversible que tienen sobre la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Schmidt y Dringen, 2009).

(Shah et al., 2013) encontraron resultados similares, en cuanto incremento en la producción de HA, al utilizar concentraciones bajas de iodoacetato (10 y 25 μ M), esto es debido a que el iodoacetato inhibe la producción de ácido láctico, el cual es principal producto del consumo de glucosa en los Streptococcus; la disminución de ácido láctico, disminuye el funcionamiento de la ruta glucolítica, lo cual conduce a un aumento en la producción de HA. Por tanto, el empleo de iodoacetato o de Iodoacetamida, disminuye la tasa de crecimiento y debilita la ruta glucolítica, favoreciendo a la vía de producción de ácido hialurónico.

Cambio del aminoácido cisteína por glutamina y Iodoacetamida: Al agregar ambos agentes, aumentó la producción de HA de 1.2 g/L en la fermentación 6, a 1.17 g/L (ver **figura 20**), la biomasa disminuyó en esta fermentación a 0.07 g de bact/hora (ver **tabla 2**). Sin embargo, la producción de biomasa fue superior a la mayoría de las fermentaciones anteriores, a excepción de la realizada con solo Iodoacetamida. (Shah et al., 2013), encontraron el mismo comportamiento respecto a la biomasa, también encontraron un aumento en la producción de HA al emplear ambos agentes, obteniendo un aumento hasta de 5.0g/L de HA . Por tanto, al utilizar glutamina y Iodoacetamida, la mayor parte de la glucosa es empleada en la producción de HA.

10.4- FERMENTACIÓN DE 500mL EN MEDIO TIOGLICOLATO COMERCIAL

La fermentación 8 se realizó con un medio comercial de tioglicolato, sin introducir ninguna modificación en su formulación. Se obtuvo una producción de HA de 0.86 g/L (ver **figura 21**) y una producción de biomasa de 0.096 g de bacterias/hora, similar al valor obtenido en la fermentación en medio no comercial con Iodoacetamida. Esta fermentación, al no tener los suplementos que permitieron un incremento en la producción de HA en las fermentaciones anteriores (ver **tabla 2**) mostró una baja en la producción de la molécula de ácido hialurónico. Sin embargo, al tener cisteína la formulación original y ser este uno de los tres aminoácidos esenciales (cisteína, arginina y lisina) empleados en la ruta de producción de HA, al estar presentes en concentraciones adecuadas, se asegura una eficiente producción de ácido hialurónico (Liu et al., 2009).

10.5.- FERMENTACIONES DE 500mL EN MEDIO BHI (INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN)

Las fermentaciones 9 y 10 fueron realizadas en medio BHI, la primera sin hacer cambios en la formulación y la segunda añadiendo glutamina y Iodoacetamida; ambas fermentaciones obtuvieron los mismos valores de producción de HA, 0.63 g/L (Ver **figuras 22 y 23**). Por tanto, el uso de BHI como medio de fermentación, aún cuando se hace una reformulación con glutamina y Iodoacetamida, la cual mostró un aumento en la producción de HA en el medio de tioglicolato no comercial, parece no tener el mismo efecto en este medio de cultivo. Sin embargo, este medio dentro todas las fermentaciones, mostró la mayor producción de biomasa (0.21 y 0.24 g de bacterias/hora, respectivamente) (Ver **tabla 2**), lo cual indica que es un medio que favorece a la vía glucolítica, permitiendo un adecuado crecimiento y producción de biomasa.

No hay reportes del uso de BHI como medio para fermentar. Sin embargo, autores como (Caldas et al., 2015) lo emplean para reconstituir las cepas congeladas, lo cual se podría explicar debido a la gran producción de biomasa por parte de la bacteria, cuando crece en este medio.

11.- CONCLUSIONES

La cepa de *Streptococcus equi subsp zooepidemicus* CVCM-529 de la colección de la Universidad Central de Venezuela, es una cepa productora de HA. La cepa se determinó como productora debido a los distintos ensayos en cuanto la mejora en las condiciones de cultivo, siendo Temperatura: 37°C, pH: 7 y agitación: 300 r.p.m, quienes favorecieron a una mayor producción de HA.

De los tres medios de cultivo empleados (Tioglicolato comercial, tioglicolato no comercial y BHI), el tioglicolato no comercial reformulado y suplementado con glutamina y Iodoacetamida, es quien mostró una mayor producción de HA. Sin embargo, quien mostró la menor producción fue el medio tioglicolato no comercial, en fermentación con diauxia glucosa- maltosa. De los tres medios de cultivo, el medio BHI mostró una mayor producción de biomasa, pero baja producción de HA. Por tanto, se puede concluir que la producción de HA depende directamente del consumo de glucosa por parte de las bacterias y del desvío de la vía glucolítica a la vía de producción de HA.

Los resultados obtenidos permiten aceptar las hipótesis de la investigación, ya que el mejoramiento de las condiciones de cultivo de *Streptococcus equi subsp zooepidemicus* dan un mejor resultado en cuanto a la producción de HA. Por otro lado, las modificaciones en la formulación de los medios cultivo, obtuvieron producciones más elevadas de la molécula de ácido hialurónico.

12.- RECOMENDACIONES

Al final de este trabajo especial de grado, se realizan las siguientes recomendaciones, que enriquecerán futuras investigaciones del área.

1. En este trabajo solo se realizaron reformulaciones del medio de cultivo de tioglicolato no comercial, con otros aminoácidos o agentes alquilante; existen otros componentes que han sido reportados que aumentan la producción de HA cuando son empleados. Es conveniente seguir realizando pruebas y reformulaciones de los medios.
2. El enriquecimiento de los medios de cultivo afecta tanto a la producción de HA como a la calidad del mismo. Por tanto, purificar y determinar el PM del ácido hialurónico obtenido de las formulaciones realizadas en esta investigación, permitiría determinar el impacto de las formulaciones en cuanto a la calidad del ácido hialurónico.
3. Emplear en las fermentaciones cepas de *Streptococcus equi subsp zooepidemicus*, como la ATCC 39920, la cual ha sido reportada por diversos autores, como la cepa que produce la mayor cantidad de HA.

13.- BIBLIOGRAFÍA

1. Baltazar J. (2018). Engineering of Hyaluronic Acid Synthases from *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* and *Pasteurella multocida* Towards Improved HA Chain Length and Titer. Tesis Doctoral, 15-25.
2. Barbosa A & Santana M. (2010). Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. 162, 1751-1761.
3. Blank L, Hugenholtz P, & Nielsen L. (2008). Evolution of the Hyaluronic Acid Synthesis (has) Operon in *Streptococcus zooepidemicus* and Other Pathogenic Streptococci. *J Mol Evol*, 67, 13-22.
4. Boeriu C, Springer J, Kooy F, Van den Broek L, & Eggink G. (2013). Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013, 1-14.
5. Caldas N, Vignoli J, Baldo C, Braga H, Ferreira R, & Pedrine A. (2015). Effect of fermentation conditions on the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. 37(4), 411-416.
6. Choi S, Kim S, & Cho G. (2011). The biochemical and molecular characteristics of *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* isolated from the genital tract of Thoroughbred mares in Korea. 34(3), 204.
7. Chong B, Blank L, McLaughlin R, & Nielsen L. (2005). Microbial hyaluronic acid production. *Microbiol Biotechnol*, 66, 341-351.
8. Cordon S & Pérez J. (2016). Ajuste de un modelo matemático para el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* en 2 sustratos para la producción de ácido hialurónico a escala de laboratorio. Fundación Universidad de America.
9. Cruz J. (1991). Producción de Streptokinasa por *Streptococcus pyogenes* [Tesis de pregrado]. Universidad de Los Andes.
10. Di ferrante N. (s. f.). Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *Journal of biological chemistry*, 1(220), 303-306.
11. Han SN. (2021). *Streptococcus zooepidemicus*. <http://www.bacteriainphotos.com/streptococcus%20zooepidemicus.html>
12. Hynes L & Walton S. (2000). Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letter*, 183(2000), 201-207.

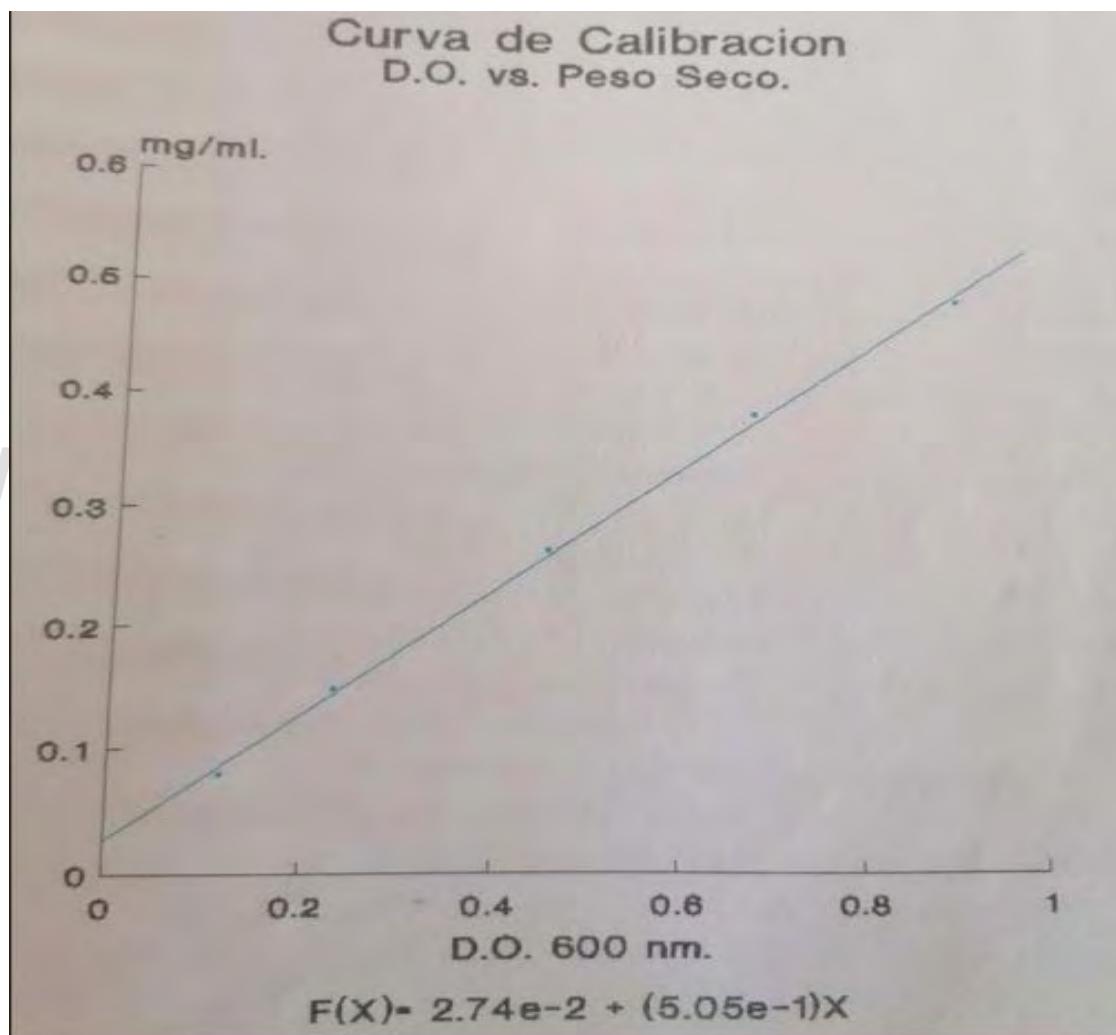
13. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. (2018). *Streptococcus spp.* DataBio, 1-6.
14. Jhons M, Goh L, & Orggerli A. (1994). Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. 16(5), 507-512.
15. Khue N. (2013). Study of complex nutrients , temperature and salts on hyaluronic acid production in *Streptococcus zooepidermicus* ATCC 43079. 3(5), 12-15.
16. Kim J, Yoo S, Oh D, Kweon Y, Park D, Lee C, & Gil G. (1996). Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. 19(6), 440-445.
17. Kogan G, Soltés L, Stern R, & Gemeiner P. (2007). Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*, 2007, 17-25.
18. Liu L, Liu Y, Li J, Du G, & Chen J. (2011). Microbial production of hyaluronic acid: Current state, challenge, and perspectives. *Microb Cell Fact*, 10-99.
19. Liu L, Sun J, Xu W, Du G, & Chen J. (2009). Modeling and Optimization of Microbial Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus* Using Radial Basis Function Neural Network Coupling Quantum-Behaved Particle Swarm Optimization Algorithm. 25(6), 1819-1825.
20. Liu L, Wang M, Du G, & Chen J. (2007). Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. 46, 383-388.
21. Marr C, Waler A, & Slater J. (2014). *Streptococcus zooepidemicus*—The bug that can place bets. 1. <https://trainermagazine.com/european-trainer-articles/2014/10/7/streptococcus-zooepidemicus-the-bug-that-can-place-bets>
22. Meyer K & Palmer J. (1934). The Polysaccharide of the vitreous humor. *Journal biological chemistry*, 629-634.
23. Milligan R. (2019). Hyaluronic Acid Production in *Streptococcus equi* Species [Tesis de Doctorado]. Heriot-Watt University.
24. Ortega M, Espinoza P, Suazo S, Jiménez A, Rubio F, & Breve L. (2015). Aplicación clínica del Ácido hialurónico. *Rev. Fac Cienc Méd*, Julio-Diciembre 2015.
25. Prehm P. (1984). Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem J*, 220, 597-600.
26. Rangaswamy V & Dharmendra J. (2008). An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*. *Biotechnol Lett*, 30, 493-496.

27. Schmidt M & Dringen R. (2009). Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. 1(1).
28. Scott E & Heatley F. (1999). Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A ¹³C NMR study. 96, 4850-4855.
29. Selyanin M, Boykov P, & Khabarov V. (2015). Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine (1.^a ed.). John Wiley & Sons, Ltd.
30. Shah M, Badle S, & Ramachandran K. (2013). Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. 7-12.
31. Stern R, Asari A, & Sugahara K. (2006). Hyaluronan Fragments: An information-rich system. European Journal of Cell Biology, 85, 699-715.
32. Sze J, Brownlie C, & Love C. (2016). Biotechnological production of hyaluronic acid: A mini review. Biotech, 6:67, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0379-9>
33. Torres A. (2000). Estudio del crecimiento y producción de Estreptoquinasa en *Streptococcus equisimilis* [Tesis de pregrado]. Universidad de Los Andes.
34. Tsepilov R & Beloded A. (2015). Hyaluronic Acid- an «Old» Molecule with «New» Functions: Biosynthesis and Depolymerization of Hyaluronic Acid in Bacteria and Vertebrate Tissues Including during Carcinogenesis. Biochemistry (Moscow) Pleiades Publishing, 80(9), 1315-1333.

14.- ANEXOS

14.1.- Curva de calibración D.O vs Peso seco

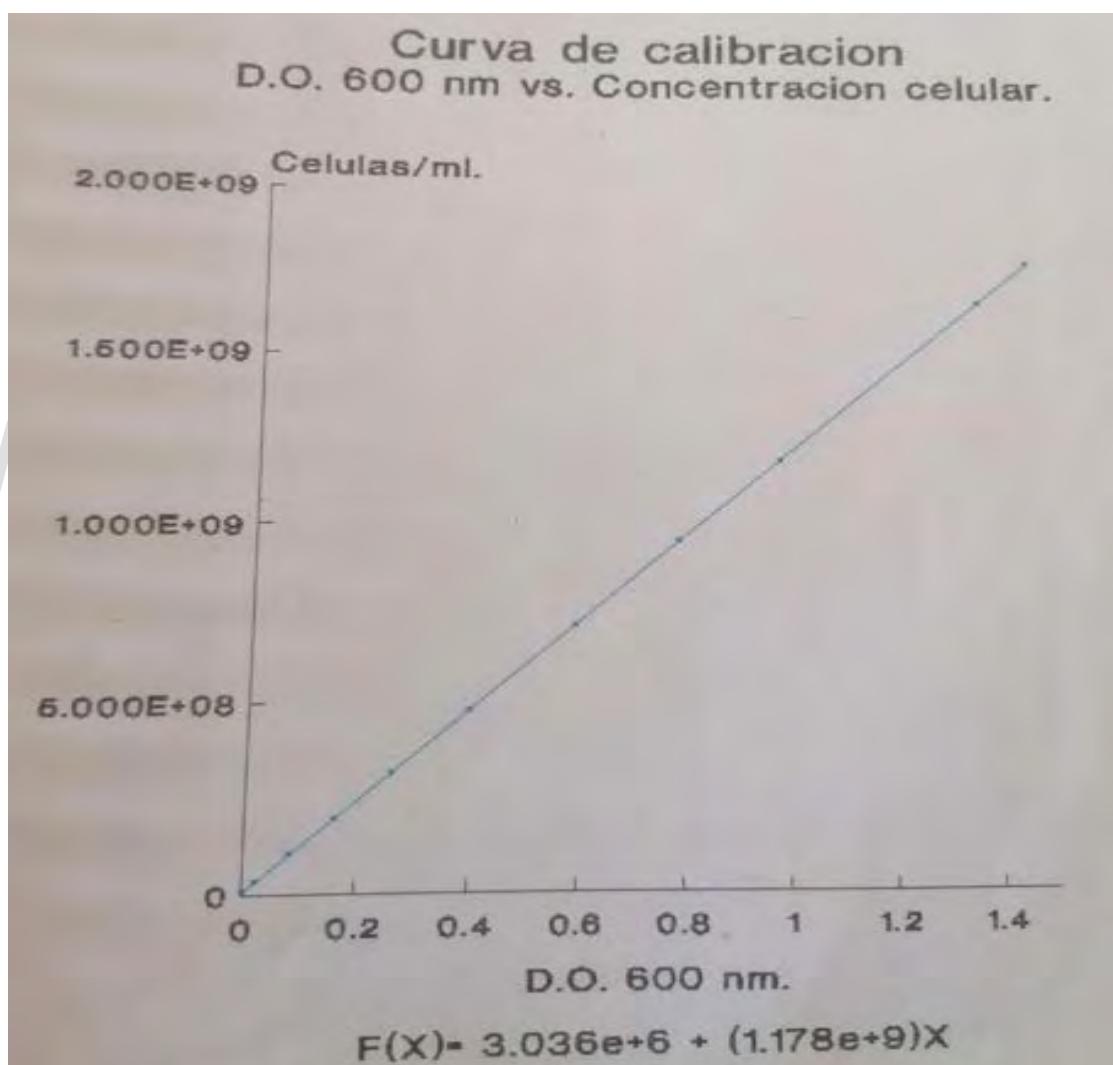
El siguiente gráfico se empleó para transformar los valores D.O a 600 nm de las alícuotas tomadas durante la fermentación, en número de células totales (Peso seco) expresadas en mg/ml



Anexo I.- Curva de calibración D.O vs Peso seco.

14.2.- Curva de calibración D.O 600 nm vs concentración celular.

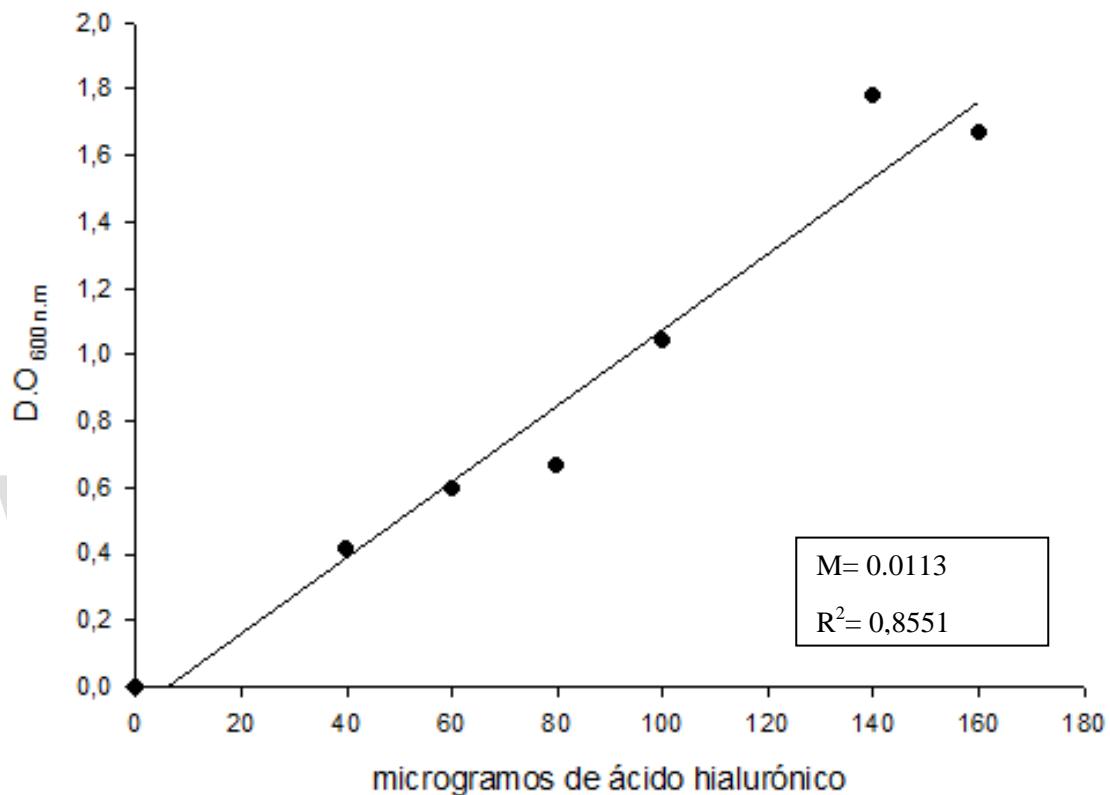
El siguiente gráfico muestra la curva de calibración empleada para realizar la transformación de D.O a 600 nm, para obtener los parámetros como son: velocidad de crecimiento, tiempo de generación, rendimiento del cultivo y producción de biomasa.



Anexo I.- Curva de calibración D.O 600 nm vs concentración celular.

14.3.- Curva de calibración de HA

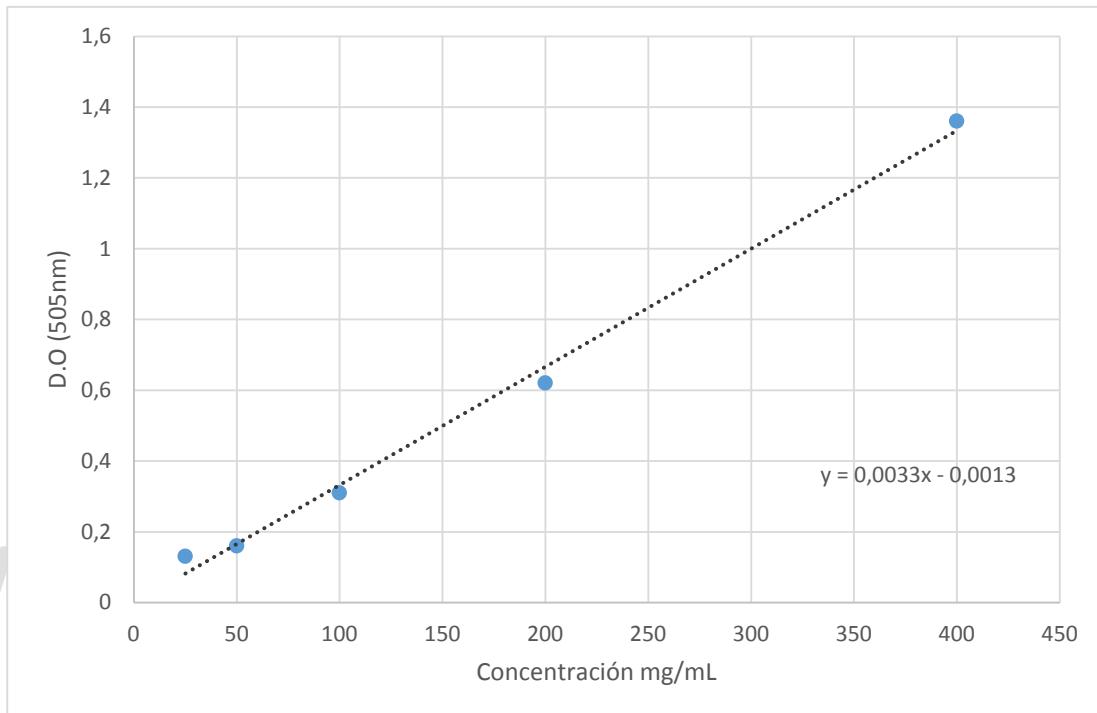
El siguiente gráfico muestra la curva de calibración obtenida a partir del ensayo CTM para la determinación de HA.



Anexo III.- Curva de calibración de ácido hialurónico a partir del ensayo de CTM

14.4.- Curva de calibración de glucosa

El siguiente gráfico muestra la curva de calibración construida a partir de la muestra patrón del método enzimático empleado para la determinación del consumo de glucosa por las bacterias, en las fermentaciones realizadas.



Anexo IV.- Curva de calibración de glucosa enzimática

14.5.- Preparación de medios

Preparación de medio sólido agar-sangre: La composición para un litro de agar base sangre es:

Infusión cerebro- corazón.....	10.0 g
Triptosa.....	10.0 g
NaCl.....	5.0 g
Agar- agar.....	15.0 g

Modo de preparación: se disuelven 40g de agar base sangre en 1 litro de agua destilada, posteriormente se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 121°C

Preparación de medios líquidos:

Medio tioglicolato: La composición por litro es la siguiente:

Peptona de caseína.....	15.0 g
Extracto de levadura.....	5.0 g
Glucosa.....	5.5 g
Cisteína.....	0.5 g
Cloruro de sodio.....	2.5 g
Tioglicolato de sodio.....	0.5 g

Modo de preparación: Se disuelven 29 g/L en 1 litro de agua destilada y se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 121°C

Observación: Para el medio tiglicolato no comercial, se hicieron reformulaciones en cuanto azúcares y aminoácidos.

Medio BHI:

Digestión péptica de tejido animal.....	10.0 g
Infusión de cerebro de ternera (sólidos).....	12.5 g
Infusión de corazón de res (sólidos).....	5.0 g
Cloruro de sodio.....	5.0 g
Dextrosa.....	2.0 g
Fosfato disódico.....	2.5 g

Modo de preparación: Se disuelven 37.0 g/L en un litro de agua destilada y se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 121°C.

14.6.- Consumo de azúcares

Glucosa: La determinación de glucosa se realizó mediante el método de glucosa oxidada enzimática, del kit de la compañía Biome diagnostics. El método se basa en la reacción enzimática GOD/POD



En 1.25 mL de la solución patrón (o el cultivo) se añade 10 μL de la muestra diluida (según sea necesario), se incuban los tubos a 36°C por 10 minutos y se mide la D.O a 505 nm.

La D.O obtenida se transforma en mg/mL mediante la siguiente formula:

$$\text{Glucosa} = \text{D.O de la muestra} / \text{D.O del patrón} \times 1 \text{ mg/mL}$$

Maltosa: La maltosa se determina mediante la maltasa. En 20 μL se mezclan 30 μL de buffer fosfato a pH 6 y 30 μL de maltasa a 0.02 U/ μL , los tubos se dejan overnight a 36°C en estufa. Posteriormente se toman 10 μL para la determinación de glucosa.

14.7.- Cálculos

La velocidad de crecimiento de cultivo (K):

$$K = \frac{\text{Lg2} N_t - \text{Lg2} N_0}{t}$$

Donde:

N_t = Número de bacterias presentes en el tiempo t .

N_0 = Número de bacterias presentes en el tiempo inicial.

t = Tiempo de crecimiento.

El tiempo de generación (θ):

$$\theta = 1/K$$

El rendimiento (R):

$$R = \frac{\text{gramos de celulas totales (peso seco)}}{\text{gramos de azúcar}}$$

Producción de biomasa (P):

$$P = \frac{\text{gramos de celulas totales (peso seco)}}{\text{Tiempo de fermentación}}$$

www.bdigital.ula.ve