

**OBTENCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO MEDIANTE *Streptococcus zooepidemicus*  
EMPLEANDO COMO FUENTE DE SUSTRATO RESIDUOS DE LA INDUSTRIA  
LÁCTEA.**

**PAULA ALEJANDRA MALDONADO PULIDO  
MIGUEL ANDRÉS RODRÍGUEZ SALAS**

**Proyecto integral de grado para optar el título de:  
INGENIERO QUÍMICO**

**Directora**

**Diana Milena Morales Fonseca**

**Profesor Investigador en Bioprocesos y Microbiología**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ D.C.**

**2022**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Nombre:

Firma del director:

---

Nombre:

Firma del docente jurado 1:

---

Nombre:

Firma del docente jurado 2:

Bogotá D.C., Enero de 2022

## **DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente institucional y rector del claustro.

**Dr. Mario Posada García-Peña**

Consejero institucional.

**Dr. Luis Jaime Posada García-peña**

Vicerrectora académica y de investigaciones.

**Dra. Alexandra Mejía Guzmán**

Vicerrector administrativo y financiero.

**Dr. Ricardo Alfonso Peñaranda Castro**

Secretario general.

**Dr. Jose Luis Macias Rodríguez**

Decana general de la facultad de ingenierías.

**Dra. Naliny Patricia Guerra Prieto**

Director del programa de ingeniería química.

**Ing. Nubia Liliana Becerra Ospina**

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág
<b>RESUMEN</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
<b>1. GENERALIDADES</b>	<b>15</b>
1.1 Ácido Hialurónico	15
1.2 Estructura	15
1.3 Aplicaciones del ácido hialurónico	17
1.4 Formulaciones Comerciales de HA	18
1.4.1 Aplicación del HA lineal	19
1.4.2 Aplicación del HA reticulado	19
1.5 Especificaciones del HA	20
<b>2. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO PARA LA OBTENCIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS</b>	<b>21</b>
2.1 Metodología	21
2.1.1 Ecuación de búsqueda	22
2.2 Protocolo de selección de artículos	25
2.3 Especificación de condiciones de crecimiento de <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	34
2.4 Conclusión	36
<b>3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS Y DE RECONOCIMIENTO DE ÁCIDO HIALURÓNICO</b>	<b>38</b>
3.1 Caracterización de <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	38
3.1.1 Caracterización taxonómica de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (NCBI)	39
3.1.2 Caracterización morfológica de <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	40
3.1.3 Caracterización molecular de <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	41
3.2 Técnicas de caracterización de <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	44
3.2.1 Técnicas microscópicas	44
3.3 Técnicas de cuantificación y reconocimiento de ácido hialurónico	46

3.3.1 Método turbidimétrico CTAB	46
3.3.2 Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR)	47
3.3.3 Espectroscopía de infrarrojo FTIR	49
3.3.4 Resonancia magnética nuclear de protón <sup>1</sup> H-NMR	51
3.4 Conclusión	53
<b>4. ECUACIONES, PARÁMETROS Y MODELOS CINÉTICOS PARA EL CRECIMIENTO DE <i>STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS</i></b>	<b>55</b>
4.1 Matriz de modelos y parámetros cinéticos para <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	55
4.2 Tipos de modelos de crecimiento microbianos	60
4.2.1 Fenomenológicos	60
4.2.2 Empíricos	60
4.2.3 Combinación de fenomenológicos y empíricos	60
4.3 Clasificación de los modelos según su tipo de información	60
4.3.1 Descriptivos	60
4.3.2 Explicativos	61
4.3.3 Puramente predictivos	61
4.4 Análisis de los modelos en bioprocesos encontrados	61
4.5 Modelos de crecimiento microbiano para <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	63
4.5.1 Modelo cinético de Gompertz	65
4.5.2 Modelo cinético de Monod	67
4.5.3 Modelo cinético de Han-Levenspiel	70
4.5.4 Modelo cinético Andrews	75
4.5.5 Modelo cinético Luedeking-Piret	76
4.5.6 Modelo cinético Haldane	78
4.5.7 Modelo cinético de la Ecuación Logística	80
4.6 Ajuste de los modelos cinéticos	81
4.7 Influencia del tipo de sustrato empleado	84
4.8 Características del suero de leche como sustrato	86
4.9 Propuesta para el proceso de fermentación	88
4.10 Conclusión	88

<b>5. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO OBTENIDO POR FERMENTACIÓN MICROBIANA</b>	<b>90</b>
5.1 Métodos de purificación de ácido hialurónico	90
5.1.1 <i>Purificación de HA mediante filtraciones</i>	91
5.1.2 <i>Purificación de HA por tratamiento con ácido tricloroacético, carbón activado y centrifugación</i>	95
5.1.3 <i>Purificación de HA por precipitación con solventes orgánicos y filtración tangencial</i>	97
5.1.4 <i>Purificación de HA por microperlas impresas con DGA (D-ácido glucurónico)</i>	100
5.1.5 <i>Purificación de HA mediante cloruro de sodio y cloruro de hexadecilpiridinio monohidrato</i>	101
5.1.6 <i>Purificación de HA por ultrafiltración tangencial</i>	101
5.1.7 <i>Purificación de HA por métodos combinados de centrifugación, precipitación, adsorción, filtración y diafiltración</i>	103
5.2 Determinación del método de purificación de HA	104
5.2.1 <i>Propiedades del ácido hialurónico</i>	104
5.2.2 <i>Tipos de ácido hialurónico</i>	105
5.2.3 <i>Peso molecular del ácido hialurónico</i>	107
5.2.4 <i>Selección del método según las características del HA deseado</i>	109
5.3 Conclusiones	111
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>112</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>113</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
<b>Figura 1.</b> Estructura del HA	15
<b>Figura 2.</b> Tipo de documentos	22
<b>Figura 3.</b> Cantidad de documentos publicados por año. .	23
<b>Figura 4.</b> Cantidad de documentos según áreas de investigación.	23
<b>Figura 5.</b> Países con el mayor número de documentos publicados	24
<b>Figura 6.</b> Árbol de decisión para la selección de artículos relevantes	25
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de documentos seleccionados según la condición de temperatura en °C	32
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de documentos seleccionados según la condición de agitación en RPM	32
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de documentos seleccionados según la condición de pH	33
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de documentos seleccionados según el tiempo empleado en horas	33
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de documentos seleccionados según la aireación en v/v/min	34
<b>Figura 12.</b> Colonias de la bacteria Streptococcus zooepidemicus	41
<b>Figura 13.</b> Ruta de biosíntesis de ácido hialurónico en Streptococcus zooepidemicus	43
<b>Figura 14.</b> Tinción de Gram de Streptococcus zooepidemicus	44
<b>Figura 15.</b> Microscopía electrónica de Streptococcus	45
<b>Figura 16.</b> Espectros FTIR de HA comercial y de las muestras de HA producidas	50
<b>Figura 17.</b> Espectro <sup>1</sup> H-NMR del HA comercial.	52
<b>Figura 18.</b> Espectro <sup>1</sup> H-NMR del HA producido en cultivo sumergido de S. equi subspdemicus.	53
<b>Figura 19.</b> Dependencia de la velocidad específica de crecimiento respecto a la concentración de sustrato limitante según el modelo cinético de Monod	70
<b>Figura 20.</b> Gráficas de Lineweaver-Burk para varias formas de inhibición de células o producto	72
<b>Figura 21.</b> Representación gráfica de valores ajustados y obtenidos para determinar el R <sup>2</sup>	82
<b>Figura 22.</b> Efecto de los solventes orgánicos sobre la precipitación de HA	97
<b>Figura 23.</b> Ilustración de los tipos de filtración a través de la membrana	99
<b>Figura 24.</b> Diagrama de proceso del sistema de filtración por membrana	102
<b>Figura 25.</b> Representación de la forma lineal del HA	106
<b>Figura 26.</b> Representación de la forma derivatizada del HA	106

<b>Figura 27.</b> Representación de la forma reticulada del HA	107
<b>Figura 28.</b> Actividad en la piel del ácido hialurónico en función de su peso molecular	109
<b>Figura 29.</b> Caja de petri	126
<b>Figura 30.</b> Rastrillo	126
<b>Figura 31.</b> Cepa de Streptococcus zooepidemicus bajo microscopio	128
<b>Figura 32.</b> Suero de leche	129
<b>Figura 33.</b> Elementos de medición volumétrica	129
<b>Figura 34.</b> Schott de vidrio	130
<b>Figura 35.</b> Diagrama de bloques de la propuesta para la obtención y purificación de HA	132

## LISTA DE TABLAS

	Pág
<b>Tabla 1.</b> Contenido de agua en muestras de diferentes pesos moleculares	16
<b>Tabla 2.</b> Aplicaciones de ácido hialurónico	17
<b>Tabla 3.</b> Propiedades generales del HA	20
<b>Tabla 4.</b> Matriz de documentos seleccionados	27
<b>Tabla 5.</b> Condiciones establecidas para el crecimiento de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> en la obtención de ácido hialurónico	35
<b>Tabla 6.</b> Clasificación taxonómica de <i>Streptococcus zooepidemicus</i> según NCBI	39
<b>Tabla 7.</b> Clasificación morfológica de <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	40
<b>Tabla 8.</b> Concentraciones de HA en caldo de fermentación en diferentes momentos.	48
<b>Tabla 9.</b> Matriz de parámetros y modelos cinéticos para <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	56
<b>Tabla 10.</b> Clasificación de modelos cinéticos de crecimiento microbiano	65
<b>Tabla 11.</b> Ajuste de los modelos cinéticos	83
<b>Tabla 12.</b> Sustratos empleados con la tasa de crecimiento obtenida	85
<b>Tabla 13.</b> Composición aproximada del suero de leche dulce y ácido	87
<b>Tabla 14.</b> Resultados de la filtración con hojas de filtro de celulosa fibriladas	92
<b>Tabla 15.</b> Resultados de la eliminación de endotoxinas por adsorbentes de carbón activado y alúmina	93
<b>Tabla 16.</b> Resultados de la eliminación de proteínas por adsorbentes de carbón activado y alúmina	94
<b>Tabla 17.</b> Resultados de la eliminación de proteínas del caldo de fermentación con ácido tricloroacético	96
<b>Tabla 18.</b> Ventajas y desventajas del método de purificación	110
<b>Tabla 19.</b> Porcentaje de recuperación de HA en cada una de las etapas	111
<b>Tabla 20.</b> Comparación nutricional de sustrato preparado y suero de leche	134

## LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>HA:</b>	Ácido hialurónico
<b>NCBI:</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>UTP:</b>	Uridina trifosfato
<b>UDP:</b>	Uridina difosfato
<b>HasA:</b>	Hialuronato sintasa
<b>ATP:</b>	Adenosín Trifosfato
<b>SEM:</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>CTAB:</b>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<b>FTIR:</b>	Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier
<b>RMN:</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b><math>\mu</math>:</b>	Velocidad específica de crecimiento
<b>Y x/s:</b>	Rendimiento biomasa/sustrato
<b>Y p/s:</b>	Rendimiento producto/sustrato
<b>X:</b>	Biomasa
<b>S:</b>	Sustrato
<b>rx:</b>	Velocidad de crecimiento
<b><math>\mu_{max}</math>:</b>	Velocidad específica máxima de crecimiento
<b>Ks:</b>	Constante de Monod
<b>S*:</b>	Concentración crítica del sustrato inhibidor donde el crecimiento se detiene
<b>Ci:</b>	Concentración de la sustancia inhibidora
<b>Cp:</b>	Concentración de producto
<b>Cx:</b>	Concentración de células
<b>Cs:</b>	Concentración de sustrato
<b>R<sup>2</sup>:</b>	Coefficiente de determinación (ajuste)
<b>DGA:</b>	D-ácido glucurónico
<b>SDS:</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>MWCO:</b>	Molecular weight cut-off

## RESUMEN

El presente proyecto de grado incluye áreas de innovación y desarrollo tecnológico de Ingeniería Química, empleando bioprocesos y cinética de crecimiento microbiano, con la finalidad de definir un proceso eficiente para la obtención de ácido hialurónico mediante la bacteria *Streptococcus zooepidemicus* empleando suero de leche como sustrato.

A partir de un análisis estadístico de referencias se darán a conocer las condiciones óptimas de crecimiento que permitan llevar a cabo la fermentación y que garanticen la producción de biomasa, además se va a proponer un modelo cinético de crecimiento microbiano que se ajuste al comportamiento de la bacteria y que permita obtener una aproximación del rendimiento y la productividad del proceso basándonos en estudios y análisis realizados anteriormente por distintos autores que proponen modelos cinéticos para *Streptococcus zooepidemicus* a partir de diversas fuentes de sustrato ricas en azúcares.

Se darán a conocer las técnicas de reconocimiento y cuantificación tanto de la bacteria como del ácido hialurónico, realizando una caracterización taxonómica de *Streptococcus zooepidemicus* y describiendo técnicas que se basan principalmente en espectrofotometrías y métodos turbidimétricos para garantizar la existencia de los grupos funcionales propios del HA. Finalmente se describen los métodos de purificación que pueden ser empleados en el proceso con el objetivo de separar y purificar el HA teniendo en cuenta que se desea obtener un producto granular de uso cosmético y se dan a conocer las ventajas y desventajas del método seleccionado.

**PALABRAS CLAVE:** *Streptococcus zooepidemicus*, ácido hialurónico, fermentación, cinética microbiana, suero de leche, purificación.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Diseñar una propuesta para la obtención de ácido hialurónico mediante el microorganismo *Streptococcus zooepidemicus* empleando como sustrato suero de leche.

### Objetivos específicos

- Especificar las condiciones adecuadas que aseguren el crecimiento de *Streptococcus zooepidemicus*.
- Establecer las técnicas de caracterización del microorganismo y del reconocimiento del ácido hialurónico obtenido.
- Definir las ecuaciones que estiman el comportamiento de los parámetros cinéticos como el crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y formación de producto.
- Analizar los diferentes procesos de purificación de ácido hialurónico con el fin de seleccionar el método más conveniente.

## INTRODUCCIÓN

El ácido hialurónico es un polisacárido glicosaminoglicano lineal, de alto peso molecular compuesto por unidades de disacárido repetidas de ácido D-glucurónico y N- acetilglucosamina por enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 [1] . Se encuentra presente principalmente en la piel, los cartílagos, las articulaciones y el humor del vítrio de la mayoría de los animales vertebrados; debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas únicas, como alta capacidad de retención de agua, viscoelasticidad y biocompatibilidad, el ácido hialurónico se usa ampliamente en la fabricación de medicamentos, oftalmología, reumatología, campos de la salud y especialmente la cosmética [2].

En la actualidad el ácido hialurónico es un producto con alto valor agregado gracias a las diversas funciones e importantes aplicaciones, convirtiéndose así en un gran potencial de la industria cosmética en Colombia debido a la preocupación de las personas por verse mejor cada día, por lo tanto, recurren a procedimientos estéticos que no requieren cirugías costosas disminuyendo la alta probabilidad de que existan complicaciones a largo plazo. Los métodos de obtención de HA tradicionales están generando incrementos en el impacto ambiental ya que se extrae de tejidos animales y fluidos corporales, generando una gran cantidad de residuos químicos que se emplean a lo largo de la obtención de HA y que además no son aprovechables, obteniendo como consecuencia procesos químicos que resultan bastantes costosos debido a la cantidad de reactivos y solventes empleados para la extracción, purificación y preparación de este producto.

Teniendo en cuenta esta problemática se busca proponer un modelo para la obtención de ácido hialurónico empleando la fermentación como la mejor alternativa a nivel económico y a nivel industrial haciendo uso de microorganismos, específicamente *Streptococcus zooepidemicus* el cual presenta una buena selectividad hacia ácido hialurónico y es uno de los microorganismos que más capacidad tiene de generarlo [2], además, presenta grandes ventajas como la disminución de los gastos energéticos y los tiempos de producción gracias a su elevado metabolismo, de igual manera se pueden aprovechar los residuos de la industria láctea como lo es el suero de leche para ser empleado como fuente de sustrato, y al aprovechar un residuo de otra industria se puede garantizar que el proceso de fermentación es más rentable y genera un producto de alta calidad.

# 1. GENERALIDADES

## 1.1 Ácido Hialurónico

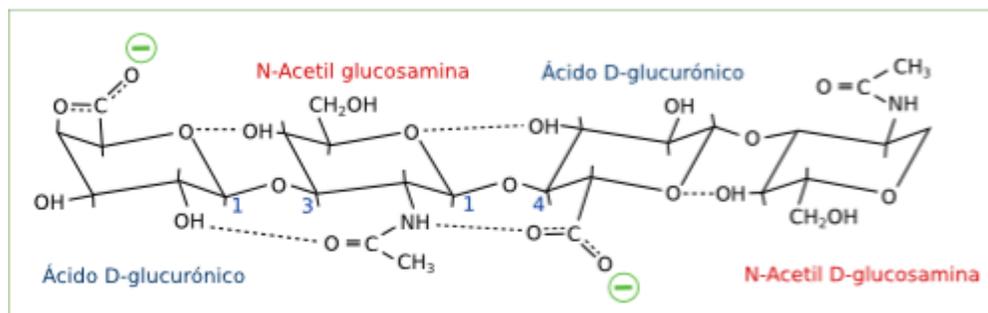
El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano que se encuentra en todo el cuerpo, en diversos tejidos y líquidos y se une a receptores específicos de la superficie celular, también es una sustancia que está naturalmente presente en el cuerpo humano. Este polisacárido tiene una gran variedad de aplicaciones médicas y cosméticas. Las concentraciones más altas, se encuentran en el líquido de los ojos y articulaciones [3]. El ácido hialurónico que se usa como medicamento se extrae de crestas de gallo o de las bacterias en el laboratorio. Hoy en día se sabe que el ácido hialurónico (HA), participa activamente en la regulación de la división celular, la migración, la diferenciación y la regeneración de tejidos y órganos.

## 1.2 Estructura

Es un polímero formado por pares de disacáridos, D-glucurónico y N-acetil glucosamina, unidos mediante enlaces alternos: (1-3)-beta-D-N-acetil glucosamina- (1-4)-beta-D- glucurónico con las unidades repetidas de disacáridos unidas por enlaces  $\beta(1-4)$ -glicosídicos . Algunas moléculas pueden llegar a tener hasta de 2000 a 25000 repeticiones de dichas parejas y alcanzar los 20000 Da.[3].

**Figura 1.**

*Estructura del HA*



**Nota.** La figura muestra la estructura del HA formada por pares de disacáridos en unidades repetitivas. Tomado de: J. H. Sze, J. C. Brownlie, and C. A. Love, “Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review,” vol. 6, no. 1, pp. 1–9, Feb. 2016, doi: 10.1007/s13205-016-0379-9. [Online]. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-016-0379-9> [Acceso: jul.23,2021]

«El HA en soluciones acuosas ocupa un gran volumen hidrodinámico, e incluso a bajas concentraciones (< 1 mg/L) y las cadenas son capaces de interactuar para formar redes. Estas características estructurales, que son altamente dependientes del peso molecular, le confieren al polímero su reología viscoelástica y la habilidad de retener grandes volúmenes de agua, que son determinantes para las funciones fisiológicas del HA» [4].

**Tabla 1.**

*Contenido de agua en muestras de diferentes pesos moleculares*

Peso molecular (kDa)	Agua (g/g ácido hialurónico)
100,1	38,7
253,9	38,2
522,1	29,2
740,0	70,7
1390,0	76,9

**Nota:** La tabla muestra el peso molecular tomando como referencia distintos contenidos de agua. Tomado de: S. Cordon, J. Pérez. “Ajuste de un modelo matemático para el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* en 2 sustratos para la producción de ácido hialurónico a escala de laboratorio”, Trabajo de grado, Facultad de ingenierías, Universidad de América, Bogotá Colombia, 2016. Disponible: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/429/1/6111618-2016-2-IQ.pdf> [Acceso: 29.jul,2021]

Este ácido posee un alto grado de polimerización por lo que puede tener un peso molecular desde 100.000 Da hasta 10 MDa. Esta propiedad depende de su origen y los métodos de purificación que se lleven a cabo, por lo general cada unidad de disacárido o monómero tiene un peso molecular de 401 Da aproximadamente [5]. La molécula presenta enlaces de hidrógeno con una hélice doble dando lugar a que el agua pueda actuar como un importante estabilizador de su estructura molecular. El ácido hialurónico puede tener zonas hidrofílicas y zonas hidrofóbicas, lo que le da la característica de ser una sustancia anfipática, es decir, un extremo es soluble en agua y el otro es hidrófobo [5]

### 1.3 Aplicaciones del ácido hialurónico

Debido a las características del ácido hialurónico se pueden establecer propiedades viscoelásticas e hidratantes que le permiten tener un amplio campo de aplicación en la industria biomédica, farmacéutica y cosmética, además está presente en los principales fluidos y componentes dentro del cuerpo humano [6] por lo que a continuación se mostrarán los campos más importantes donde se emplea el HA como materia prima.

**Tabla 2.**

*Aplicaciones de ácido hialurónico*

CAMPO	APLICACIÓN
Medicina	Recuperación quirúrgica y de heridas, tratamiento de cáncer de mama, tratamiento de accidentes cerebrovasculares.
Ortopedia	Se inyecta en las articulaciones para mejorar su funcionalidad, previene el deterioro articular por sus propiedades viscoelásticas y de lubricación.
Dermatología	Rellenar arrugas faciales y cicatrices, se emplea en necrosis tumoral favoreciendo el desarrollo de células endoteliales y retención de agua en la piel, tratamiento del Escleroderma Sistemático localizado.
Cosmética	Componente de rellenos dérmicos, reducción de arrugas y líneas faciales a largo plazo, efecto humectante y suavizante.
Oftalmología	Trasplante de córnea, operaciones de catarata, prótesis, trabeculectomía, cirugía de retina.

**Nota.** La tabla muestra las distintas aplicaciones del HA en diferentes áreas según su utilidad. Tomado de: L.M Mendoza, G. Cremata, J. A. y C. Valdés, G. “Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones”. Tesis doctoral en ciencias, Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, La Habana, Cuba, 2007. Disponible: <https://isbn.cloud/9789591616005/cordones-umbilicales-residuales-nueva-fuente-de-obtencion-de-acido-hialuronico-y-sus-fracciones/> [Acceso: 30.jul,2021]

#### **1.4 Formulaciones Comerciales de HA**

El ácido hialurónico se comercializa de tres diferentes formas, la primera es en su forma natural o lineal, pero en muchas ocasiones se somete a distintos procesos como la reticulación para modificar de su cadena lineal y la derivatización para la formación de enlaces covalentes entre las cadenas, ya que así lo hacen menos propenso a la hidrólisis química o enzimática, esta manipulación permite que el HA prolongue su presencia y se mejoren las propiedades mecánicas específicas del material. Estas modificaciones usualmente implican procesos de esterificación y sulfatación [7].

### ***1.4.1 Aplicación del HA lineal***

1.4.1.a Industria cosmética. El HA se usa como elemento para hidratar debido a su propiedad hidrofílica. En el mercado existen diferentes productos de belleza, como cremas, serum e hidratantes que sirven para restaurar la elasticidad reduciendo la profundidad de arrugas y protegiendo la piel de rayos UV [7]

1.4.1.b Medicina estética. Se aplica para tratamientos biorevitalizante inyectándolo en la piel en pequeñas dosis para ayudar, restaurar y preservar su elasticidad y aspecto saludable. Se aplica a las líneas de expresión para obtener como una piel más suave, compacta y luminosa. [7]

1.4.1.c Farmacología. El HA se usa como fármaco tópico para mejorar la agudeza de ciertas drogas a través de la capa córnea, otros beneficios que presenta es la mejora de la retención y localización de la droga a través de la epidermis a diferencia de otras drogas en ausencia de este. El ácido hialurónico de forma lineal es ampliamente usado con fines curativos para el tratamiento de irritaciones y lesiones cutáneas, promoviendo una cicatrización más rápida. [7]

1.4.1.d Oftalmología. Las soluciones fisiológicas HA lineales se usan con fin de proteger los delicados tejidos del ojo y proporcionar espacio durante las manipulaciones quirúrgicas. Debido a la viscoelasticidad que presenta el HA lo hace ideal para proteger a las células oculares de instrumentos quirúrgicos e implantes y permite realizar con mayor facilidad el procedimiento [7]

1.4.1.e Urología. La terapia intravesical de HA lineal se ha utilizado recientemente como tratamiento alternativo eficaz para el cáncer en la vejiga, infecciones recurrentes del tracto urinario, y cistitis hemorrágica [7]

### ***1.4.2 Aplicación del HA reticulado***

1.4.2.a Medicina estética. Se usa el HA reticulado para rellenos dérmicos, ya que suple con la gran demanda del aumento de volumen de forma no quirúrgica de tejidos blandos. También se ha vuelto común inyecciones intradérmicas para el relleno de arrugas faciales. Estos rellenos se hacen generalmente de partículas micrométricas del HA reticulado que se encuentra en suspensión en una solución fisiológica.

En el mercado, los rellenos dérmicos y las inyecciones intradérmicas se diferencian por la concentración del HA, el grado de reticulación, el tamaño de partícula, la capacidad de hinchamiento, la cantidad de HA soluble presente en la formulación y el módulo elástico. Estas propiedades afectan estrictamente su desempeño clínico final.[7]

1.4.2.b Tratamiento osteoartritis. El HA reticulado, se aplica en forma de inyecciones intraarticulares ya que posee efectos terapéuticos en las patologías artrósicas. Ayuda disminuyendo la degeneración del cartílago, protegiendo las superficies de los tejidos blandos de las articulaciones, reduciendo el dolor mediante la normalización del líquido sinovial.[7]

### 1.5 Especificaciones del HA

El HA presenta propiedades físicoquímicas que dependen del tamaño de la molécula, por lo que puede llegar a ser muy variable por si mismo. En las industrias se puede encontrar que el ácido hialurónico va a depender de la calidad del producto y contenido de pureza, ya sea para uso médico o farmalógico y de grado cosmético. En la siguiente Tabla se dan a conocer las propiedades generales del HA. [7]

**Tabla 3.**

*Propiedades generales del HA*

<b>Fórmula química</b>	(C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>11</sub> ) <sub>n</sub>
<b>Estado físico, aspecto</b>	Polvo blanco, sin olor
<b>pH</b>	5,0 – 8,5 (solución acuosa al 0,5%)
<b>Pureza</b>	> 93 - 95%
<b>Recuento total microbiano</b>	≤10 UFC/g
<b>Endotoxinas bacterianas</b>	≤0,05 UI/mg
<b>Peso molecular</b>	8 – 2400 kDa
<b>Solubilidad</b>	Soluble en agua y mezclas de agua y solventes orgánicos miscibles en agua (ej. alcoholes). Insoluble en grasas y solventes orgánicos anhídridos.
<b>Principales características</b>	Higroscópico, poco inflamable

**Nota.** La tabla presenta un resumen de las principales generalidades del ácido hialurónico. Tomado de: C. Schiraldi, Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. IntechOpen, 2010 Disponible: <https://openresearchlibrary.org/viewer/da17b9db-86eb-4489-af12-ec17a18a2994> [Acceso: 01.ago,2021]

## **2. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO PARA LA OBTENCIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS**

La fermentación microbiana es uno de los procesos biotecnológicos para la formación eficaz de metabolitos y sustancias activas bajo condiciones específicas [8] en el proyecto se llevará a cabo una revisión científica del proceso de fermentación para la obtención de HA por medio de la bacteria *Streptococcus zooepidemicus* gram positiva, la cual es un microorganismo anaerobio facultativo, es decir, puede obtener energía tanto por respiración (en presencia de oxígeno), como por fermentación (en ausencia de oxígeno). Para garantizar que la fermentación se lleve a cabo correctamente se deben cumplir las necesidades metabólicas de la bacteria teniendo en cuenta su clasificación y morfología, es importante definir las condiciones de crecimiento del microorganismo, ya que permiten que la fermentación se lleve a cabo correctamente y que se produzca el HA deseado, cualquier variación en estas condiciones puede generar implicaciones en el metabolismo de la bacteria, así mismo afectar la tasa específica de crecimiento y por ende el rendimiento del proceso. En este capítulo se realizará un análisis estadístico de referencias que permita obtener información de variables como temperatura, pH, agitación, aireación y tiempo, con el fin de determinar las condiciones óptimas de crecimiento de la bacteria.

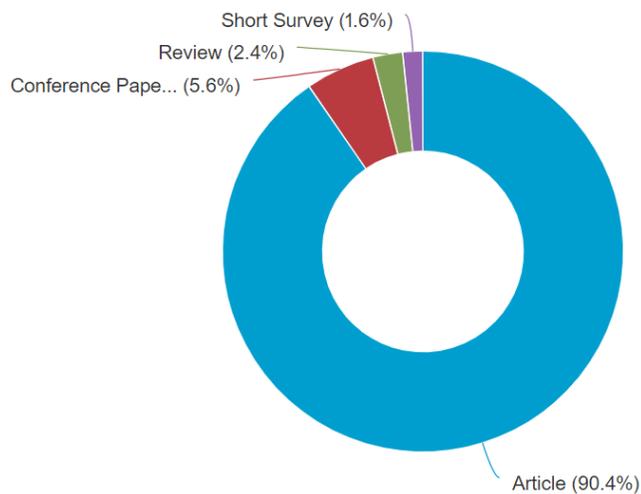
### **2.1 Metodología**

Se realiza una búsqueda bibliográfica mediante la cual se obtienen artículos donde se establecen condiciones de crecimiento de *Streptococcus zooepidemicus* por diferentes autores. Para realizar esta caracterización de artículos científicos se emplea la base de datos Scopus, la cual contiene referencias bibliográficas y contenido web de calidad para el análisis y visualización de la investigación con el fin de hacer un análisis estadístico de referencias en las cuales se encuentran antecedentes de estudios, propuestas y experimentos donde se establecen las condiciones necesarias para el crecimiento y así poder identificar los documentos que contengan información clave para el proceso.

### 2.1.1 Ecuación de búsqueda

Al momento de realizar la búsqueda se emplea la ecuación “*Streptococcus zooepidemicus Production Hyaluronic Acid*” donde se tiene como resultado un total de 125 artículos, los cuales serán agrupados y caracterizados mediante un análisis estadístico de referencias incluyendo gráficas que permitan observar la cantidad de documentos por año, autores relevantes, áreas de investigación, entre otros parámetros para finalmente seleccionar los artículos de mayor relevancia.

**Figura 2.**  
*Tipo de documentos*

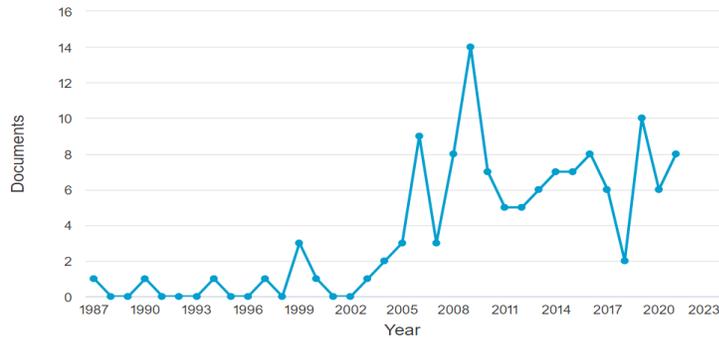


**Nota.** La figura representa los tipos de documentos encontrados en la base de datos Scopus de acuerdo a la ecuación de búsqueda. Tomado de: Análisis de resultados de Scopus. Disponible: <https://onx.la/c3698> [Acceso: sep.06,2021]

En la Figura 2 se observa el gráfico que agrupa los documentos según su tipo, teniendo como resultado que el 90.4% de los documentos encontrados son artículos científicos, y que el porcentaje restante se distribuye entre documentos de conferencias, revisiones y encuestas cortas.

**Figura 3.**

*Cantidad de documentos publicados por año*

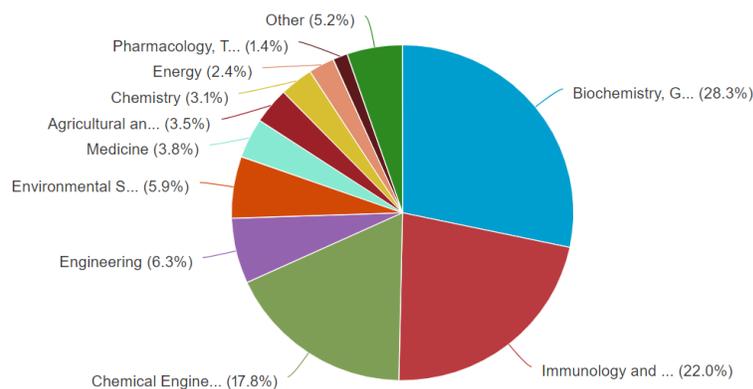


**Nota.** La figura representa la cantidad de artículos publicados por año en la base de datos Scopus de acuerdo a la ecuación de búsqueda (*Streptococcus zooepidemicus* Production Hyaluronic Acid). Tomado de: Análisis de resultados de Scopus. Disponible: <https://onx.la/c3698> [Acceso: sep.06,2021]

En la Figura 3 se observa que en el año 2009 se publicó la mayor cantidad de documentos (14), y que después del año 2000 se incrementó el número de estudios sobre la producción de ácido hialurónico mediante *Streptococcus zooepidemicus*. Los procesos biotecnológicos empiezan a considerarse como alternativas rentables para la obtención de productos de interés, así que se profundiza el estudio de los bioprocesos a nivel industrial.

**Figura 4.**

*Cantidad de documentos según áreas de investigación*

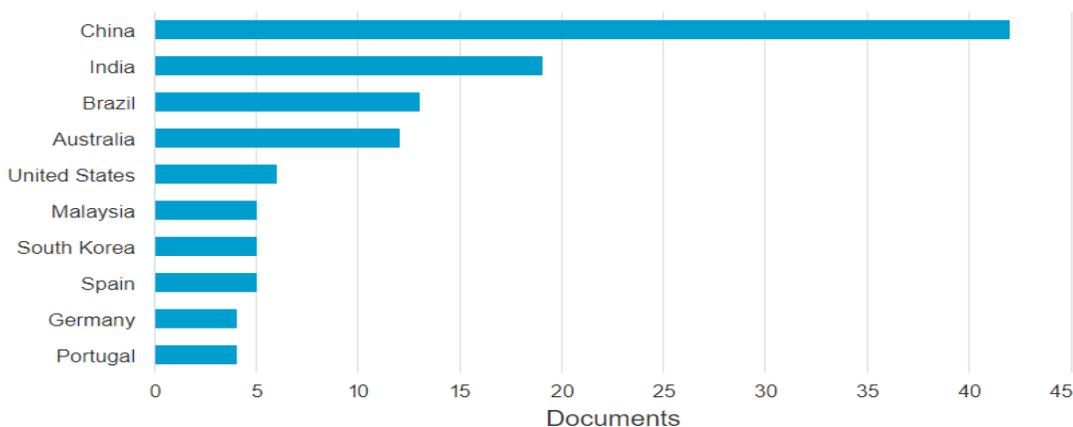


**Nota.** La figura representa la cantidad de documentos encontrados en la base de datos Scopus según el área de investigación. Tomado de: Análisis de resultados de Scopus. Disponible: <https://onx.la/c3698> [Acceso: sep.06,2021]

En la Figura 4 se agrupan los documentos en distintas áreas de investigación, donde la mayoría se fundamenta en bioquímica, microbiología e ingeniería química, estas áreas de conocimiento están directamente relacionadas con el presente trabajo y los artículos agrupados en estas categorías nos permitirán obtener información precisa para determinar las condiciones de crecimiento del microorganismo con una base científica.

### Figura 5.

*Países con el mayor número de documentos publicados*



**Nota.** La figura representa los países que han publicado el mayor número de documentos teniendo en cuenta la ecuación de búsqueda en la base de datos Scopus.. Tomado de: Análisis de resultados de Scopus. Disponible: <https://onx.la/c3698> [Acceso: sep.07,2021]

En la Figura 5 se observa que en China se han publicado 42 documentos en la base de datos relacionados con el tema de investigación, debido a que en este país se evidencia un gran interés en temas de biotecnología y desarrollo, así que las investigaciones y estudios realizados nos permiten obtener aportes significativos. A nivel de latinoamérica se observa que Brasil ha publicado 13 documentos sobre la obtención de ácido hialurónico mediante fermentación microbiana, puesto que la producción y venta de productos humectantes para la piel y antienvjecimiento en este país se ha incrementado desde el 2002 hasta la actualidad. [9]



Al momento de seleccionar los artículos según el área de conocimiento se descarta la categoría de medicina donde los artículos hacen referencia a patologías y tienen fundamento únicamente teórico acerca de los usos más comunes de HA, pero no se encuentra información sobre las condiciones necesarias para el crecimiento de *Streptococcus zooepidemicus* y para llevar a cabo la fermentación que permita la obtención de nuestro producto de interés.

Después de realizar el protocolo de selección de artículos con ayuda de la Figura 6, se tiene como resultado un total de 15 artículos científicos que cumplen con las características necesarias para el desarrollo del objetivo. Adicionalmente, se tendrán en cuenta dos tesis que contienen información y datos relevantes que nos permitirán tener mayor soporte bibliográfico, la primera se titula “Producción y caracterización de ácido hialurónico por cultivo sumergido de *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*” del año 2016 recuperada del repositorio de la Universidad Autónoma Metropolitana de la Ciudad de México, donde se evalúa el efecto de la concentración inicial de glucosa y de la agitación en la producción de HA por cultivo sumergido de *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* en caldo de soya y tripticaseína. La segunda es una tesis de doctorado que se titula “Producción de ácido hialurónico por *Streptococcus*: Estudio de la fermentación y caracterización de producto” del año 2006 recuperada del repositorio de la Universidad Estadual de Campinas de São Paulo Brasil, donde se estudia la producción de HA por vía microbiana y la influencia de las variables involucradas en la productividad y las propiedades fisicoquímicas del producto. Finalmente se realiza una matriz con los 17 documentos seleccionados donde se especifican las condiciones de fermentación empleadas en cada uno de ellos, junto con su respectivo autor y año de publicación con el fin de poder realizar un análisis estadístico que nos permita definir las condiciones que se van a emplear a lo largo del trabajo.

**Tabla 4.***Matriz de documentos seleccionados*

<b>Título</b>	<b>Autor</b>	<b>Año</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Agitación (RPM)</b>	<b>pH</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Aireación (v/v/min)</b>	<b>REF</b>
<i>Uso de promotores de inducción para regular la expresión de hialuronansintetasa y UDP-glucosa-6-deshidrogenasa de Streptococcus zooepidemicus en Lactococcuslactis: un estudio de caso del mecanismo de regulación del polímero de ácido hialurónico</i>	<i>J.Z. Sheng, P.X. Ling, X.Q. Zhu, X.P. Guo, T.M. Zhang, Y.L. Hea y F.S. Wang</i>	2009	37	170	7	12	N/A	[67]
<i>Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de Weissella confusa contra Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae</i>	<i>Liliana Serna Cock, Leidy Johana Valencia Hernández, Rómulo Campos Gaona</i>	2013	33	100	6	24	Anaerobio	[68]
<i>Optimización y análisis cinético de la producción de ácido hialurónico Por Streptococcus zooepidemicus en un sistema por lotes</i>	<i>Pulau Pinang, Malaysia</i>	2020	37	150	7	12	0.5 - 2	[69]

**Tabla 4.** Continuación

<i>Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production</i>	<i>Isabel R. Amado a,d, José A. Vázquez b Lorenzo Pastrana c José A. Teixeira</i>	2016	37	500	7	14	1	[70]
<i>Método de aislamiento de bacterias con potencial para producir ácido hialurónico</i>	<i>Suárez Hernández Guatemala Morales Mendoza Bernardo</i>	2019	37	200	7	24	Anaerobio	[71]
<i>Producción de Ácido Áialurónico por Streptococcus: estudio de fermentación y caracterización del producto</i>	<i>Christiane Saraiva Ogrodowski</i>	2006	37	150	7.5	24	0.5 - 2	[72]
<i>Diseño del bioproceso productivo de Ácido Hialurónico</i>	<i>Jordi Arévalo Aguado</i>	2019	36	N/A	7	24	N/A	[73]

---

**Tabla 4.** Continuación

---

<i>Rendimiento mejorado de ácido hialurónico de alto peso molecular</i>	<i>Pourzardosht N., Rasae</i>								
<i>Producción en una cepa estable de Streptococcus zooepidemicus mediante la eliminación del gen que codifica la hialuronidasa</i>	<i>MJ</i>	<i>2017</i>	<i>37</i>	<i>200</i>	<i>6.7</i>	<i>16</i>	<i>0.2-1</i>	<i>[74]</i>	
<hr/>									
<i>Producción mejorada de ácido hialurónico en Streptococcus zooepidemicus al sobreexpresar HasA y molecular control de peso con niscina y glucosa</i>	<i>Zakeri A., Rasae</i> <i>MJB, Pourzardosht N.C</i>	<i>2007</i>	<i>37</i>	<i>300</i>	<i>7</i>	<i>30</i>	<i>0.3</i>	<i>[75]</i>	
<hr/>									
<i>Efecto de las condiciones de fermentación sobre la producción de Ácido Hialurónico por Streptococcus zooepidemicus</i>	<i>Nicole Caldas Pan</i> <i>Josian Vignoli</i> <i>Cristiani Baldo</i>	<i>2015</i>	<i>37</i>	<i>100</i>	<i>8</i>	<i>48</i>	<i>N/A</i>	<i>[76]</i>	

---

**Tabla 4.** Continuación

---

<i>Efectos de la peptona de soja en la preparación del inóculo de Streptococcus zooepidemicus por producción de hialurónico ácido</i>	<i>Benedini LJ,Santana MHA</i>	2013	37	150	7	24	N/A	[77]
---	--------------------------------	------	----	-----	---	----	-----	------

---

<i>Construcción de Streptococcus zooepidemicus eficientes para la producción del ácido hialurónico basada en la identificación de genes clave involucrado en el metabolismo de la sacarosa</i>	<i>Xuzhen Zhang Man Wang Tuanjie Li Lixia Fu Hao Liu</i>	2016	30 - 37	400	7	N/A	1.5	[78]
--	--	------	------------	-----	---	-----	-----	------

---

<i>Producción mejorada de ácido hialurónico de Streptococcus zooepidemicus mediante una estrategia de estrés alcalino intermitente</i>	<i>L. Liu M. Wang G. Du J. Chen</i>	2008	37	200	7	12	0.2	[79]
--	---	------	----	-----	---	----	-----	------

---

<i>Un medio sin suero para el crecimiento de colonias y Ácido Hialurónico producción de Streptococcus zooepidemicus</i>	<i>Jianfa Zhang Xia Ding Liuyan Yang Zhiming Kong</i>	2005	37	220	7	20	N/A	[80]
---	---	------	----	-----	---	----	-----	------

---

**Tabla 4.** Continuación

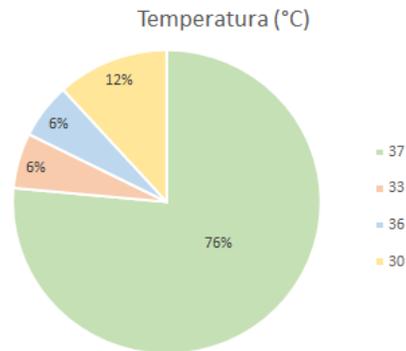
<i>Producción y caracterización de Ácido Hialurónico por cultivo sumergido de streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i>	<i>Ivana Cristina Peñuelas Silva</i>	2016	37	200 - 600	6.7	24	1	[15]
<i>Desarrollo de un sistema de eliminación de genes sin marcadores para Streptococcus zooepidemicus: caracterización funcional del gen de la hialuronano sintasa</i>	<i>Xiaoyan Sun, Dandan Yang, Yangyang Wang, Hongran Geng, Xihong He, Hao Liu</i>	2013	30 - 37	300	7	24	5	[81]
<i>Diseño factorial en desarrollo de medio de fermentación para producción de ácido hialurónico por Streptococcus zooepidemicus</i>	<i>Nicole Caldas Pan Guilherme Buiz Cristiani Baldo</i>	2020	37	100	8	24	0.5	[82]

**Nota.** La tabla muestra los documentos seleccionados siguiendo el protocolo del árbol de decisión, se muestran las condiciones de crecimiento de *Streptococcus zooepidemicus* encontradas en cada uno de los documentos.

Después de obtener la matriz de referencias bibliográficas, se debe realizar un análisis estadístico para definir la condiciones que se van a manejar, para lo cual se realizan gráficas que permiten observar cuáles son los datos más empleados en el proceso de obtención de ácido hialurónico mediante *Streptococcus zooepidemicus*.

**Figura 7.**

*Porcentaje de documentos seleccionados según la condición de temperatura en °C*

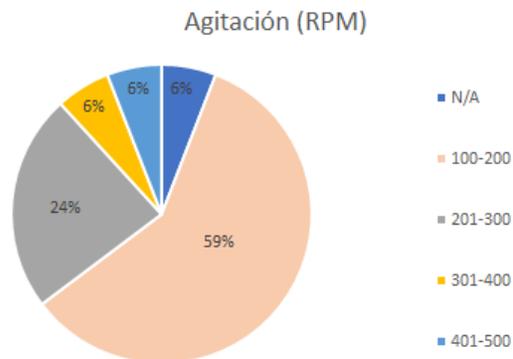


**Nota.** La figura representa el porcentaje de documentos respecto al valor de temperatura encontrado en cada uno de ellos.

En la figura 7 se observa que el 76% de los documentos seleccionados emplean como condición de temperatura 37°C, la cual garantiza el crecimiento de *Streptococcus zooepidemicus* y que la fermentación pueda llevarse a cabo.

**Figura 8**

*Porcentaje de documentos seleccionados según la condición de agitación en RPM*

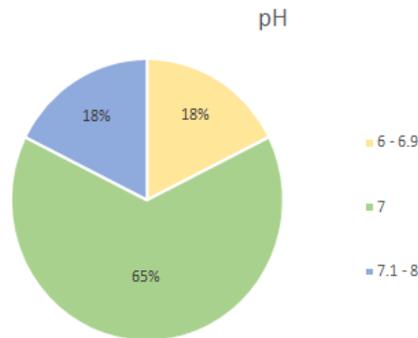


**Nota.** La figura representa el porcentaje de documentos respecto al rango de agitación en RPM encontrado en cada uno de ellos.

En la figura 8 se observan rangos de agitación empleados en los documentos seleccionados, y el 59% de ellos emplean una agitación de 100 a 200 RPM, por lo que se emplea la mediana como herramienta estadística para definir un único valor de agitación, en este caso el dato central del rango de 100 a 200 es 150, el cual será definido como el valor de agitación en RPM para este proceso.

**Figura 9**

*Porcentaje de documentos seleccionados según la condición de pH*

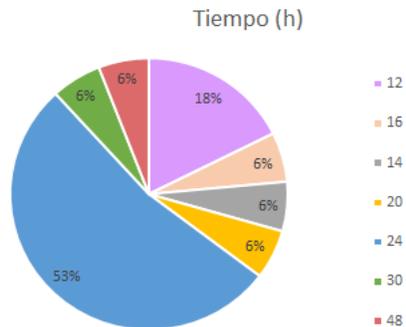


**Nota.** La figura representa el porcentaje de documentos respecto al pH empleado en cada uno de ellos.

En la figura 9 se observa que en el 65% de los documentos seleccionados se emplea un pH de 7, el cual es un valor de pH neutro apto para el crecimiento de bacterias ya que no afecta su morfología ni metabolismo.

**Figura 10.**

*Porcentaje de documentos seleccionados según el tiempo empleado en horas*

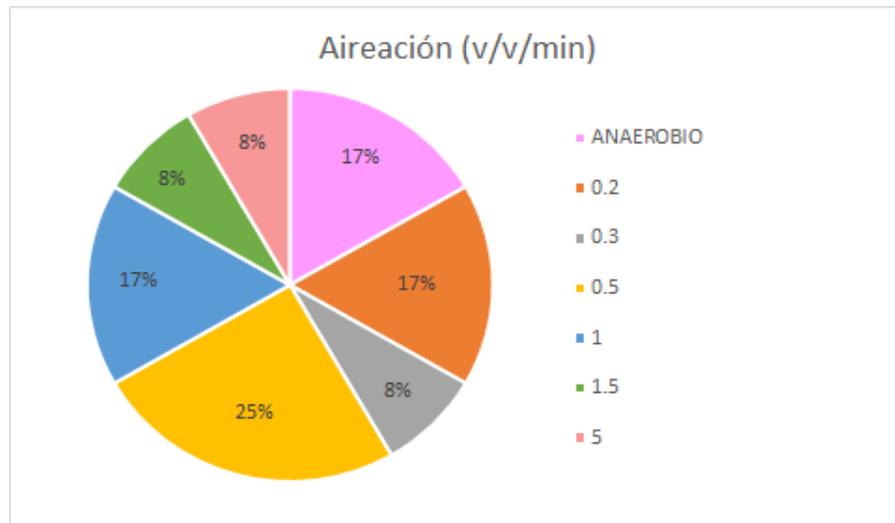


**Nota.** La figura representa el porcentaje de documentos respecto al tiempo de fermentación que se emplea en cada uno de ellos.

En la figura 10 se observa que en el 53% de los documentos se lleva a cabo la fermentación por 24 horas y este tiempo garantiza la duplicación del microorganismo y la formación del producto de interés.

**Figura 11.**

*Porcentaje de documentos seleccionados según la aireación en v/v/min*



*Nota.* La figura representa el porcentaje de documentos respecto a la aireación que se emplea en cada uno de ellos.

En la figura 11 se observa que el 25% de los documentos emplean una aireación de 0.5 v/v/min, mientras que el 17% de ellos llevan a cabo una fermentación anaeróbica, sin embargo, al revisar las referencias bibliográficas se evidencia que el proceso se ve favorecido en un medio aireado porque presenta mayor producción de HA, así que para el desarrollo del trabajo se define una aireación de 0.5 v/v/min.

### **2.3 Especificación de condiciones de crecimiento de *Streptococcus zooepidemicus***

Después de realizar el análisis estadístico de los documentos seleccionados, se pueden definir las condiciones de crecimiento de *Streptococcus zooepidemicus* descritas en la Tabla 5.

**Tabla 5.**

*Condiciones establecidas para el crecimiento de Streptococcus zooepidemicus en la obtención de ácido hialurónico*

<b>Microorganismo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Aireación (v/v/min)</b>	<b>Agitación (RPM)</b>	<b>Tiempo (h)</b>
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	37	7	0.5	150	24

*Nota.* La tabla muestra los valores definidos de condiciones de crecimiento para llevar a cabo el trabajo, tales como temperatura, pH, aireación, agitación y tiempo.

La bacteria *Streptococcus zooepidemicus* se caracteriza por ser una bacteria gram positiva anaeróbica facultativa, además es un microorganismo mesófilo capaz de reproducirse entre los 20 y los 45°C y su temperatura óptima de crecimiento es 37°C como se definió anteriormente en la revisión bibliográfica[10], así que al momento de llevar a cabo la fermentación se debe garantizar que el intercambio de calor sea controlado con agua de enfriamiento puesto que la reacción es exotérmica. Al realizar un estudio del efecto de la temperatura en la producción de HA por *S. zooepidemicus* cultivando la bacteria en un rango de temperaturas de 20 a 45°C se encontró que la mayor tasa específica de crecimiento se obtuvo en el cultivo a 37°C [11].

En la producción de HA por *S. zooepidemicus* se emplea un pH cercano a la neutralidad, esto debido a que la membrana del microorganismo puede verse afectada si se somete a condiciones extremas de pH al punto de que la bacteria puede morir y no se llevaría a cabo la fermentación, en la bibliografía se encuentra que con un pH neutro se presenta un buen rendimiento y la mayor tasa de producción volumétrica de HA, con un pH de 7 se presenta la tasa de crecimiento específica más alta, ya que mientras más alcalino es el pH del medio, la tasa de crecimiento específica de la bacteria disminuye [12].

La aireación también presenta un efecto significativo en el rendimiento del proceso, obteniéndose una mayor producción de HA en un medio aireado en relación con un medio anaerobio [12] por lo

que se define una aireación de 0.5 v/v/min como se presentó en el análisis estadístico de referencias.

La agitación se debe llevar a cabo mediante agitadores en el fermentador de manera constante y así garantizar la transferencia continua de nutrientes desde el medio de cultivo hasta el microorganismo y evitar problemas de crecimiento celular o de producción de metabolito de interés, este valor de agitación depende del volumen del fermentador y de la viscosidad del caldo de fermentación porque entre más viscoso sea el sustrato más alta debe ser la agitación [12]. En el trabajo se lleva a cabo la fermentación con suero de leche como sustrato por lo que se va a emplear una agitación de 150 RPM como se definió anteriormente en la revisión bibliográfica y así garantizar que la concentración del sustrato sea homogénea en todo el reactor.

El tiempo definido es de 24 horas para garantizar el crecimiento de la bacteria, el consumo del sustrato y la producción de HA. Además se debe tener en cuenta que el  $A_w$  es mayor a 0.9 (90%) puesto que el proceso se lleva a cabo mediante un caldo de fermentación que tiene suficiente cantidad de agua disponible para el crecimiento del microorganismo.

## **2.4 Conclusión**

Como resultado de los principales hallazgos encontrados en el recorrido del capítulo para garantizar las condiciones de crecimiento de *Streptococcus zooepidemicus* según la ecuación de búsqueda, nos permiten concluir que la producción de ácido hialurónico por medio de microorganismos ha venido incrementando durante los últimos 15 años según se ve evidenciado en la figura 2 donde el 90,4% de los resultados de búsqueda obtenidos tienen un enfoque en las áreas de investigación por medio de artículos científicos. China se mostró como el país que más invierte en temas de investigación, biotecnología y desarrollo según lo demostrado en la figura 5.

Se encontró que 76% de los artículos que han trabajado la propagación de *Streptococcus zooepidemicus* han empleado una temperatura de 37°C, el 65% usaron un pH de 7 y que el 53% llevaron a cabo la fermentación en 24 horas. Adicionalmente se hizo uso de la mediana como

herramienta estadística para establecer el valor de agitación mecánica, el cual se definió de 150 RPM según el 59% de los autores que trabajaron entre 100 a 200 RPM.

Finalmente se concluye que el proceso se ve favorecido en un medio aireado para la producción de ácido hialurónico según el 83% de los artículos encontrados, por lo que se recomienda trabajar con una aireación de 0.5 v/v/min.

### **3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* Y DE RECONOCIMIENTO DE ÁCIDO HIALURÓNICO**

En este capítulo se realizará la caracterización de la bacteria *Streptococcus zooepidemicus* empleando la base de datos NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) por sus siglas en inglés, esta investigación se desarrolla desde una clasificación general a una particular, incluyendo características taxonómicas, morfológicas y moleculares. Dentro de esta clasificación se va a determinar el dominio, filo, clase, orden, familia, género, especie y número de identificación fiscal, lo que permite reconocer la bacteria en cualquier base de datos de microbiología. Es importante realizar esta clasificación sistemática para conocer adecuadamente la bacteria y así mismo determinar si se encuentra clasificada como una bacteria patógena, además se debe garantizar que el microorganismo tenga las propiedades específicas que lo hacen ideal para la producción de ácido hialurónico. Para reconocer dichas características se emplean técnicas microscópicas desde muy básicas como la coloración de Gram, este método permite identificar la composición de la pared celular para reconocer el microorganismo, hasta técnicas más robustas que contemplan la secuenciación del genoma.

Para la obtención de ácido hialurónico se debe seguir una ruta metabólica en la cual participan enzimas y procesos bioquímicos propios de la bacteria, esto permite la formación de precursores de HA y de otros polisacáridos. Para asegurar la presencia de ácido hialurónico después de llevar a cabo la fermentación se deben emplear técnicas de reconocimiento y cuantificación, que se basan principalmente en espectroscopías y métodos turbidimétricos donde se comparan muestras de HA comercial con el obtenido experimentalmente para observar la existencia de los grupos funcionales presentes en el ácido hialurónico y determinar su concentración mediante curvas de calibración.

#### **3.1 Caracterización de *Streptococcus zooepidemicus***

La vida microscópica puede ser muy variada en sus propiedades y características, por esta razón es importante conocer la particularidad del microorganismo como su taxonomía y propiedades físicas que solo pueden ser observadas bajo microscopio, para poder reconocer el comportamiento y así tener un mejor conocimiento de esta misma.

### 3.1.1 Caracterización taxonómica de *Streptococcus zooepidemicus* (NCBI)

Se hizo una búsqueda en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), el cual es parte de la biblioteca nacional de medicina en los Estados Unidos, con el fin de encontrar los aspectos taxonómicos del microorganismo que permiten clasificarlo según su dominio, filo, clase, orden, familia, género, especie y número de identificación fiscal como se mostrará a continuación:

**Tabla 6.**

*Clasificación taxonómica de Streptococcus zooepidemicus según NCBI*

TAXONOMIA NCBI	
Número de identificación fiscal	1403449
Nombre de taxonomía	<i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i> CY
Dominio	Bacterias
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilos
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familia	<i>Streptococcaceae</i>
Género	Estreptococo
Especie	<i>Streptococcus equi</i>

**Nota.** La tabla muestra la clasificación taxonómica de *Streptococcus zooepidemicus* con los resultados obtenidos en NCBI. Tomado de: Genomes Online Database . <https://gold.jgi.doe.gov/organism?id=Go0012767> Acceso [sep.30,2021]

Como se observa, *Streptococcus* pertenece a la familia *Streptococcaceae*, es una bacteria de la especie *Streptococcus equi*, inmóvil, anaerobia facultativa, con forma esférica o de coco, algunas especies tienen cápsula y normalmente se agrupan formando cadenas de dos (diplococos) o más bacterias[13]. Es un estreptococo beta hemolítico que produce ácido hialurónico.

La identificación de los *Streptococcus* por métodos convencionales es difícil. Las cepas clínicas, en muchas ocasiones, es imposible determinar por su especie por lo que se realiza una determinación antigénica mediante la clasificación serológica de Lancefield o por su capacidad hemolítica o capacidad de formar halos de lisis en los medios de cultivo de agar sangre.[13]

### 3.1.2 Caracterización morfológica de *Streptococcus zooepidemicus*

La morfología de las colonias formadas es un factor fundamental para el reconocimiento y diferenciación de los microorganismos. La cepa se cultiva en un medio de agar sangre y se recomienda que en este tipo de observación es preferible reconocer colonias de cultivos frescos. Estas colonias son de única especie y cuando crecen a condiciones óptimas se pueden observar las especificaciones sobre características del tamaño, forma, consistencia y por su tamaño de las colonias, la cual es uniforme entre una misma especie y la forma se determina por los bordes y el grosor.

**Tabla 7.**

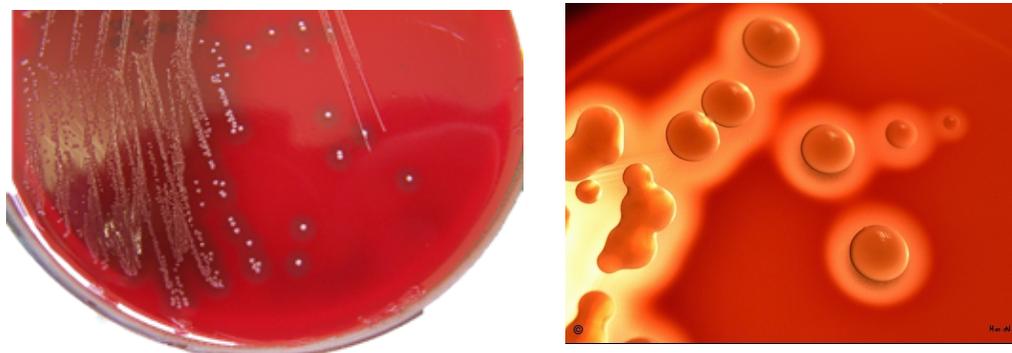
*Clasificación morfológica de Streptococcus zooepidemicus*

<b>Morfología de <i>Streptococcus zooepidemicus</i></b>	
<b>Forma</b>	Ovalada / esférica
<b>Diámetro</b>	0.5 - 1
<b>Cadenas</b>	Si ( 2-30 células )
<b>Movilidad</b>	No
<b>Esporas</b>	No
<b>Cápsulas</b>	Si

**Nota.** La tabla muestra la clasificación morfológica de *Streptococcus zooepidemicus* NCBI. Tomado de: Genomes Online Database . <https://gold.jgi.doe.gov/organism?id=Go0012767> Acceso [sep.30,2021]

## Figura 12.

*Colonias de la bacteria Streptococcus zooepidemicus*



**Nota.** La figura muestra una caja de petri con cepas de *Streptococcus zooepidemicus* en una placa de cultivo de agar sangre Tomado de: C. Marr, A. Waller, J. Slater, “*Streptococcus zooepidemicus* - The bug that can place bets”, 2014 Disponible: <https://trainermagazine.com/european-trainer-articles/2014/10/7/streptococcus-zooepidemicus-the-bug-that-can-place-bets> [Acceso: oct .02,2021]

### 3.1.3 Caracterización molecular de *Streptococcus zooepidemicus*

El genero *Streptococcus* del grupo C de Lancefield tiene una alta productividad en procesos fermentativos, el genoma completo de la cepa de *Streptococcus zooepidemicus* está compuesto por un cromosoma circular único de 2.167.264 pares de bases, el cual contiene 2087 genes que codifican proteínas, 57 genes de ARNt y 5 operones de ARNr 5S-16S-23S [14]. En el artículo “Complete Genome Sequence of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* Strain ATCC 35246” publicado en el año 2011 y recuperado de la base de datos NCBI, se emplea un sistema FLX secuenciador del genoma Roche 454 para determinar la secuencia del genoma completo de *Streptococcus zooepidemicus*, los genes que codifican proteínas se predijeron con el programa Glimmer 3.02 y las funciones de estos genes se determinaron mediante búsquedas de homología en la base de datos de proteínas no redundantes de NCBI, los genes de ARNt se identificaron utilizando la herramienta tRNAScan-SE\*, mientras que los genes de ARNr se identificaron con la herramienta RNAmmer1.2\*

\*Es un programa para la detección mejorada de los genes de ARN de transferencia en la secuencia genómica.

\*Es un programa que permite la anotación consistente y rápida de genes de ARN ribosomal

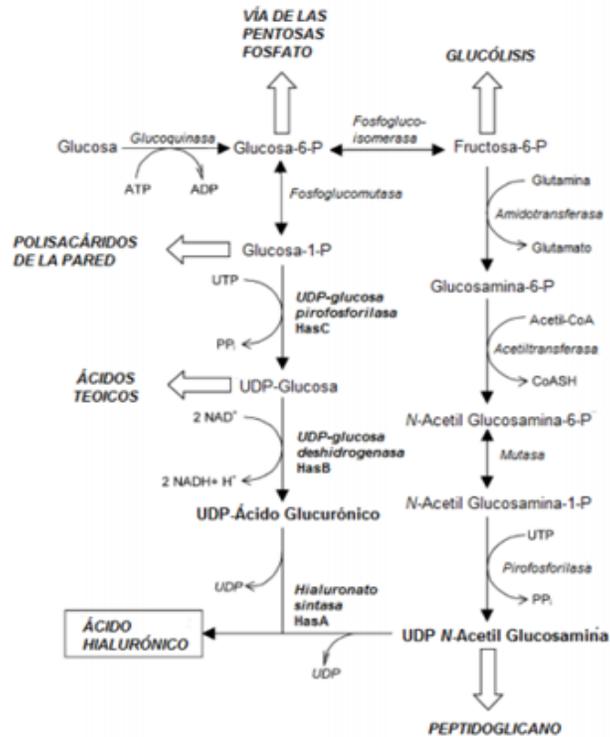
La bacteria *Streptococcus zooepidemicus* no es patógena en humanos y presenta catalasa negativa, este microorganismo produce HA como una cápsula extracelular, la cual protege a la bacteria de la fagocitosis y del oxígeno. La biosíntesis del ácido hialurónico es un proceso paralelo al crecimiento celular y puede dividirse en dos series de reacciones:

- En la primera serie, la glucosa 6-fosfato se convierte en glucosa 1-fosfato y posteriormente se le agrega UTP produciendo UDP-glucosa, finalmente por la oxidación del alcohol primario de la UDP-glucosa se obtiene el primer precursor de HA (Hialuronato sintasa HasA) [15]
- En la segunda serie, se transfiere un grupo amino de la glutamina a la fructosa-6-fosfato, produciendo glucosamina-6-fosfato. Posteriormente se cataliza un rearrreglo del grupo fosfato, formándose la glucosamina-1-fosfato. En la siguiente reacción se produce N-acetilglucosamina y finalmente la N-acetilglucosamina-1-fosfato pirofosforilasa produce el segundo precursor de HA, la UDP-N-acetilglucosamina [15].

A continuación, se mostrará un esquema detallado de la ruta de biosíntesis de HA, donde se observan las enzimas catalizadoras que llevan a cabo el proceso y el producto de cada una de las etapas.

**Figura 13.**

*Ruta de biosíntesis de ácido hialurónico en Streptococcus zooepidemicus*



**Nota.** La figura muestra la ruta bioquímica para la producción de ácido hialurónico mediante *Streptococcus zooepidemicus*. Tomado de: B. Chong, L. Blank, R. McLaughlin, and L. Nielsen, "Microbial hyaluronic acid production," vol. 66, no. 4, pp. 341–351, Jan. 2005, doi: 10.1007/s00253-004-1774-4. [Online]. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15599518/> [Acceso: sep.29,2021].

Como se observa en el esquema, el proceso inicia con la glucosa y gracias a la enzima glucoquinasa pasa a glucosa-6-fosfato para continuar con la biosíntesis descrita anteriormente. La participación del UTP en estas reacciones genera donadores de glicosilo activados, que pueden ser polimerizados en HA por la enzima HasA (hialuronato sintasa) [15]. Un total de 4 moles de ATP son consumidos para producir 1 mol del disacárido que constituye la unidad repetida del HA.

En esta ruta metabólica también se producen otros intermediarios involucrados en la síntesis, como por ejemplo el peptidoglicano, los ácidos teicoicos y polisacáridos antigénicos de la pared, estos componentes constituyen un 20% en masa de la célula [15], por lo que representan una desviación importante de las reservas de precursores para la síntesis de ácido hialurónico

### 3.2 Técnicas de caracterización de *Streptococcus zooepidemicus*

Existen diversas formas para la identificación y caracterización de los microorganismos, a continuación se describirán las técnicas más apropiadas como la coloración de Gram y la Microscopía electrónica de barrido (SEM), que permiten observar detalles bajo el microscopio.

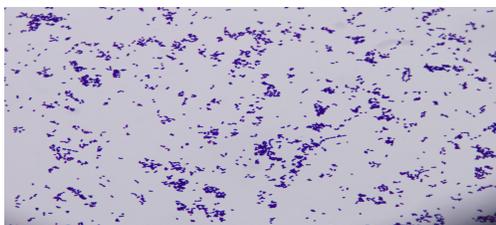
#### 3.2.1 Técnicas microscópicas

El estudio microscópico se realiza con el fin de conocer las características morfológicas del microorganismo. Se debe asegurar que se haga en fresco, es decir, que la bacteria se encuentre con vida para poder observar la movilidad, aglutinación, yemación, etc. Se debe realizar una tinción ya que esta va a revelar la forma, la forma de agruparse, la estructura de las células y su tamaño. Las tinciones se deben realizar como primer paso y ocasionalmente el único para la identificación bacteriana.

3.2.1.a Coloración de Gram. Uno de los procesos más importantes en la microbiología es la tinción o coloración de Gram. Este procedimiento se describe en el **Anexo 1**, y su resultado permite dividir las bacterias en dos grandes grupos: las bacterias grampositivas que se muestran de color morado y las gramnegativas de color rosa. La diferencia de color en la tinción es posible gracias a la estructura de la pared celular de las células. Cuando se utiliza el colorante cristal violeta, que tiñe las células de morado, el tratamiento más adelante con etanol remueve el color de las células gramnegativas pero no las grampositivas.[16]

#### Figura 14.

*Tinción de Gram de Streptococcus zooepidemicus*



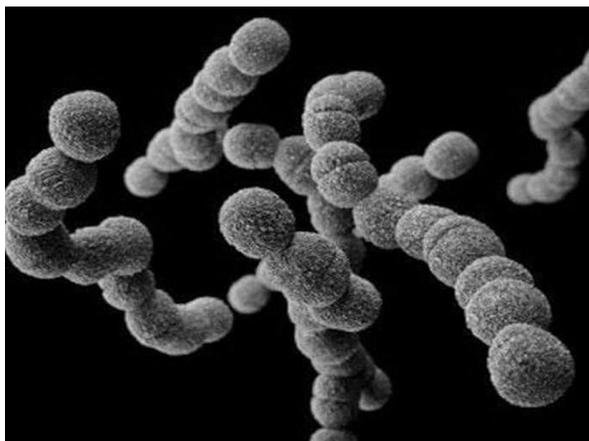
**Nota.** La figura muestra la tinción de Gram de *Streptococcus zooepidemicus* vista a 1000X bajo aceite. Foto tomada el 19 de agosto de 2016 por Joe Rubin. Tomado de “Gram Stain Of Streptococcus Zooepidemicus”. Disponible: <https://www.flickr.com/photos/therubinlab/33308787433> [Acceso: sep.26,2021].

Según la Figura 14 se puede observar como resultado tras la tinción de Gram, que el color predominante fue el morado, lo que significa que la clasificación de la bacteria es gram positiva, es decir, que en su envoltura celular comprende de la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano.

3.2.1.b Microscopía electrónica de barrido (SEM). Es un tipo de microscopio que utiliza un haz de electrones para formar la imagen ampliada a la superficie del microorganismo. Este instrumento permite observar y caracterizar con una gran profundidad de campo lo que permite que se enfoque muy detalladamente en la superficie, puede alcanzar un aumento de más de 30,000X mientras que el microscopio convencional alcanza un aumento de 1,000x. Ya que el SEM no utiliza la luz para capturar las imágenes, las fotos resultantes son a blanco y negro.

**Figura 15.**

*Microscopía electrónica de Streptococcus*



**Nota.** La figura muestra una imagen obtenida por microscopía electrónica del género *Streptococcus*. Tomada de: “*Streptococcus pyogenes*: ¿qué opinan los especialistas sobre la situación, la protección y el tratamiento?”, 2018 Disponible en : <https://n9.cl/streptococcus> [Acceso: sep.29,2021].

Como se observa en la Figura 15, los *Streptococcus* típicamente se organizan por cadenas de diplococos, una de las ventajas de este método es su gran campo de profundidad, lo que permite entender las características taxonómicas del microorganismo de una manera más detallada.

### **3.3 Técnicas de cuantificación y reconocimiento de ácido hialurónico**

El caldo de fermentación obtenido posee cierta concentración de HA el cual deberá ser extraído y purificado para obtener el producto de interés, dicha concentración puede determinarse por métodos turbidimétricos empleando reactivos que permitan la sedimentación o por métodos de espectroscopía, algunos de estos se describirán a continuación:

#### ***3.3.1 Método turbidimétrico CTAB***

Este método emplea el reactivo CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) el cual actúa como un detergente catiónico que permite precipitar ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos en soluciones de baja concentración iónica [17], este es un método seguro para la cuantificación de ácido hialurónico en caldos de fermentación ya que permite determinar el contenido de HA gracias a la formación de turbidez entre este producto y el CTAB, se establece que la cantidad de turbidez cuando se agrega CTAB a una solución de HA es proporcional a la cantidad de HA del sistema, sin embargo, la estabilidad de esta turbidez se ve afectada por diversos factores y efectos de las condiciones de reacción. Para la descripción de este método se emplea como referencia el artículo “*Establishment of CTAB Turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth*” por los autores Yong-Hao Chen y Qiang Wang, publicado en la base de datos ScienceDirect en el año 2009, donde se estudian los efectos de la temperatura y del tiempo de reacción para la formación de turbidez.

3.3.1.a Preparación de la solución de CTAB. Para emplear este reactivo primero se debe disolver 2.5g de CTAB en 100mL de una solución 0.2M de NaCl en agua desionizada.}

3.3.1.b Curva de calibración. Se debe preparar una solución stock de 0.1 mg/mL de HA comercial de *S. equi subsp. zooepidemicus* y a partir de ella se preparan las soluciones patrón para la curva de calibración. Las concentraciones de HA empleadas en esta curva serán de: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mg/mL.

3.3.1.c Método turbidimétrico CTAB. En este método se agrega 1.0 mL de reactivo CTAB preparado anteriormente a 0.5 mL de la solución de HA en agua desionizada, se homogenizan los tubos y se incuban a 30 °C por 10 minutos. Se mide inmediatamente la absorbancia de los tubos a 400 nm y se usa como blanco agua desionizada tratada de la misma forma que las muestras, las determinaciones se realizan por duplicado [18]

Por último se plantea una gráfica de absorbancia respecto a concentración de HA (mg/ml), para obtener la ecuación de la recta de la forma  $y = mx + b$  donde “x” será la concentración de HA y “y” la absorbancia obtenida, de esta forma se puede calcular la concentración de HA en las muestras obtenidas en la fermentación con la ecuación despejada.

$$x(HA) = \frac{y(abs) - b}{m}$$

### 3.3.2 Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR)

Este método permite realizar mediciones directamente a través de recipientes transparentes con muestras y debido a su buena precisión y exactitud es una de las herramientas analíticas más eficientes en la industria agrícola, petroquímica y farmacéutica. Para describir este método y el procedimiento para la cuantificación de HA se tomará como referencia el artículo “*Rapid determination of hyaluronic acid concentration in fermentation broth with near-infrared spectroscopy*” de los autores Qin Dong, Hengchang Zang, Lixuan Zang, Aihua Liu, Yanli Shi y Hui Zhang, publicado en el año 2013 en el repositorio de la Universidad de Shandong, China.

3.3.2.a Preparación de estándares y curva de calibración estándar. Para este paso se diluye 50 mg de ácido D-glucurónico en 100 mL de agua destilada, y ésta solución se diluyó 10 veces para obtener la solución de referencia de 50µg/mL. En tubos de ensayo se agregan volúmenes de 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mL de la solución de referencia y se les agrega agua hasta un volumen final de 1.0 mL respectivamente.

Estos tubos se enfriaron a 4°C con agua fría y a cada uno se le añade 5 mL de ácido sulfúrico con borato de sodio preparado\*. Los tubos se sellan para ser agitados, luego se colocan en baño de agua hirviendo durante 10 minutos y después se dejan enfriar a temperatura ambiente. A cada tubo

\* La preparación es de 4.77g de tetraborato de disodio en 500 mL de ácido sulfúrico de alta pureza.

de ensayo se le adicionan 0.2 mL de solución de carbazol\*. Los tubos se sellan y se agitan nuevamente para llevarlos a un baño de agua hirviendo durante 15 minutos, luego se enfrían a temperatura ambiente y se mide la absorbancia de las soluciones a 530 nm frente a una muestra en blanco. [19]

3.3.2.b Preparación de la muestra de HA. Para este paso se realizaron varias fermentaciones en las mismas condiciones de temperatura, pH, aireación, agitación y tiempo (24 horas). Después de 10 horas de iniciar la fermentación se empiezan a tomar muestras cada 2 horas, obteniendo 8 muestras de cada fermentación, en este artículo se llevan a cabo 7 lotes de fermentación por lo que se tiene un total de 56 muestras.

El caldo recogido se diluye cinco veces con agua purificada y luego se mezcla con volúmenes cuádruples de etanol absoluto, el sedimento generado se recoge y se disuelve en agua purificada [19]. La concentración de HA se puede calcular basándose en la curva de calibración estándar y la relación de dilución. En la siguiente tabla se muestran los datos obtenidos para las concentraciones de HA según el análisis del artículo de referencia.

**Tabla 8.**

*Concentraciones de HA en caldo de fermentación en diferentes momentos.*

Batch no.	HA concentration(g/L)							End point
	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h	20 h	22 h	
101204	3.82	5.46	6.53	7.48	7.75	8.34	8.73	8.79
101205	2.35	4.33	6.08	7.13	8.24	8.96	9.45	9.69
101206	3.26	5.09	6.48	7.35	8.18	8.63	8.91	8.89
101207	2.35	4.37	6.06	6.80	7.60	8.08	9.47	9.45
101208	2.60	4.69	6.29	7.13	8.04	8.62	8.99	8.96
101209	2.68	4.76	6.22	7.35	8.66	9.10	9.51	8.57
101210	2.54	4.45	6.02	7.35	8.31	8.78	9.46	9.69

**Nota.** La tabla muestra los valores de concentración de HA obtenidos después del análisis en diferentes tiempos y lotes de fermentación al llevar a cabo el método NIR para la cuantificación de ácido hialurónico. Tomado de: Q. Dong, H. Zang, L. Zang, A. Liu, Y. Shi, and H. Zhang, “Rapid determination of hyaluronic acid concentration in fermentation broth with near-infrared spectroscopy,” vol. 7, no. 6, pp. 1450012-1450012–7, Nov. 2014, doi: 10.1142/S1793545814500126. Disponible : <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S1793545814500126>.

\* La solución se prepara con 0,125 g de carbazol en 100,0 mL de alcohol absoluto.

Para este método se empleó un espectrofotómetro NIRS Antaris II en modo de transmisión con una resolución de 8 cm<sup>-1</sup> y los tubos de vidrio con una longitud de trayectoria óptica de 5 mm [19] Así como es importante determinar la concentración de HA en el caldo de fermentación también se debe garantizar la presencia de éste, por lo que se van a describir algunos métodos que permitan la caracterización del HA con el fin de verificar la existencia de sus grupos funcionales característicos.

### **3.3.3 Espectroscopía de infrarrojo FTIR**

Esta técnica es conocida como Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) y proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas [20] y gracias a esto es posible identificarlos, generalmente se emplea el equipo Mid-FTIR Remspec con resolución de 10 cm<sup>-1</sup> en un intervalo espectral de 900 a 5000 cm<sup>-1</sup>.

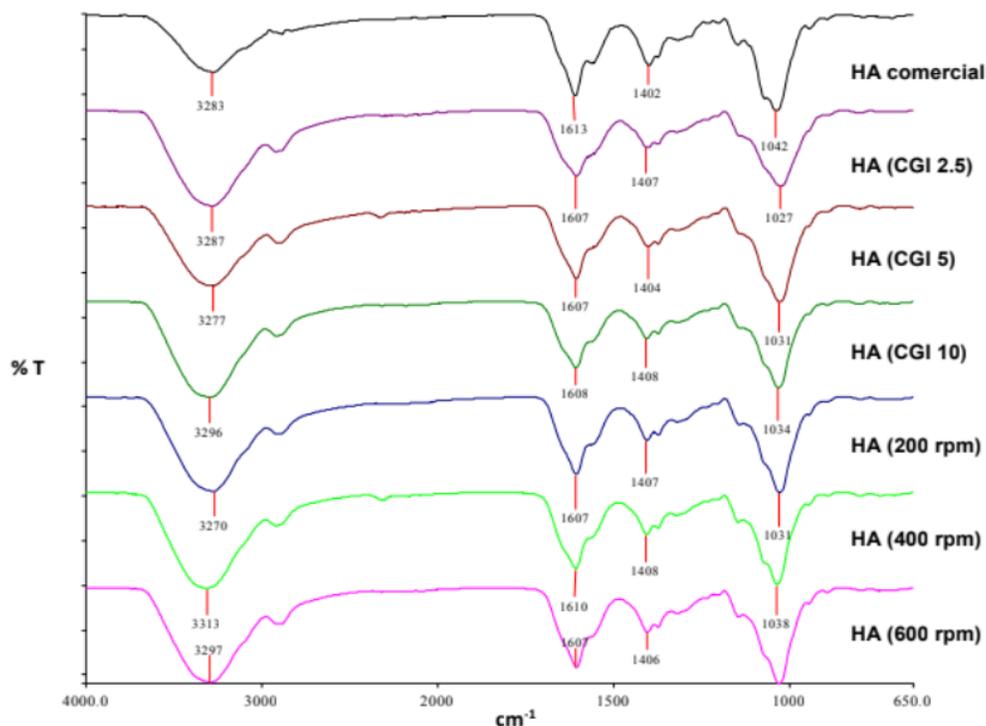
Para describir cómo se emplea este método en la caracterización de ácido hialurónico se tomará como base uno de los documentos seleccionados en el análisis estadístico de referencias del capítulo 2, titulado “Producción y caracterización de ácido hialurónico por cultivo sumergido de *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*” del año 2016 recuperada del repositorio de la Universidad Autónoma Metropolitana de la Ciudad de México.

Para este método se deben liofilizar\* las muestras para su posterior análisis de espectroscopía donde se va a detectar la presencia de los grupos amino, carboxilo e hidroxilo que posee el HA. Después las muestras se pulverizaron para ser sometidas al espectro y de igual manera las muestras de HA comercial para ser comparadas y verificar que en la gráfica se observen las mismas características. Finalmente se tiene como resultado los espectros de FTIR tanto del HA comercial como de las muestras obtenidas de la fermentación, en este documento se recolectaron muestras a diferentes condiciones experimentales como concentración inicial de glucosa y agitación en rpm, los espectros resultantes se muestran en la siguiente gráfica

\* La liofilización es el proceso más adecuado para secar compuestos orgánicos o inorgánicos sin alterar su composición, ya que se realiza al vacío y a baja temperatura por lo que se evita la desnaturalización de las proteínas

**Figura 16.**

*Espectros FTIR de HA comercial y de las muestras de HA producidas*



**Nota.** La figura muestra los espectros de FTIR de HA comercial y de las muestras de HA producidas por cultivo sumergido de *S. equi subsp. zooepidemicus* bajo diferentes condiciones experimentales empleadas. Tomado de: C. Peñuelas “Producción y caracterización de ácido hialurónico por cultivo sumergido de *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*”. Trabajo de grado, Universidad autónoma metropolitana, Ciudad de México, 2016. Disponible: <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=16999&docs=UAMI16999.pdf> [Acceso: sep.25,2021].

En la Figura 16 se observa que el HA comercial presentó cuatro bandas características [4]

- Una banda a 3283  $\text{cm}^{-1}$ , la cual es típica del estiramiento del enlace O-H
- Una banda a 1613  $\text{cm}^{-1}$  que representa la flexión del enlace N-H del grupo amida.
- Una banda a 1402  $\text{cm}^{-1}$  que representa el estiramiento del enlace C-O del grupo carbonilo de la amida

- Una banda a 1042 cm<sup>-1</sup> que corresponde al estiramiento de los enlaces C-O-C presentes en la molécula de HA

Las muestras del HA obtenido experimentalmente a diferentes condiciones presenta las mismas bandas características del HA comercial como se muestra en la Figura 16, así que al ser identificados los grupos funcionales se puede garantizar la presencia de HA.

### **3.3.4 Resonancia magnética nuclear de protón <sup>1</sup>H-NMR**

Esta técnica se utiliza para determinar las estructuras de los compuestos orgánicos, se emplea para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones ya que esto hace al núcleo magnéticamente activo. Cuando la muestra que contiene compuestos orgánicos es irradiada, los núcleos presentan excitación y al volver a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia se registra en una gráfica de frecuencia frente a intensidad lo que se conoce como espectro de NMR [21]

Para llevar a cabo esta técnica se emplea el espectrofotómetro de RMN (Resonancia Magnética Nuclear) el cual consta de un imán estable con controlador, un transmisor de radiofrecuencias, un detector para medir la absorción de energía de radiofrecuencia y un ordenador registrador para realizar las gráficas que forman el espectro RMN [21]

Para describir cómo se emplea este método en la caracterización de HA se usará como referencia el mismo documento del punto 3.3.3 donde se analiza el espectro de <sup>1</sup>H-NMR del HA comercial con la finalidad de compararlo con el HA obtenido experimentalmente.

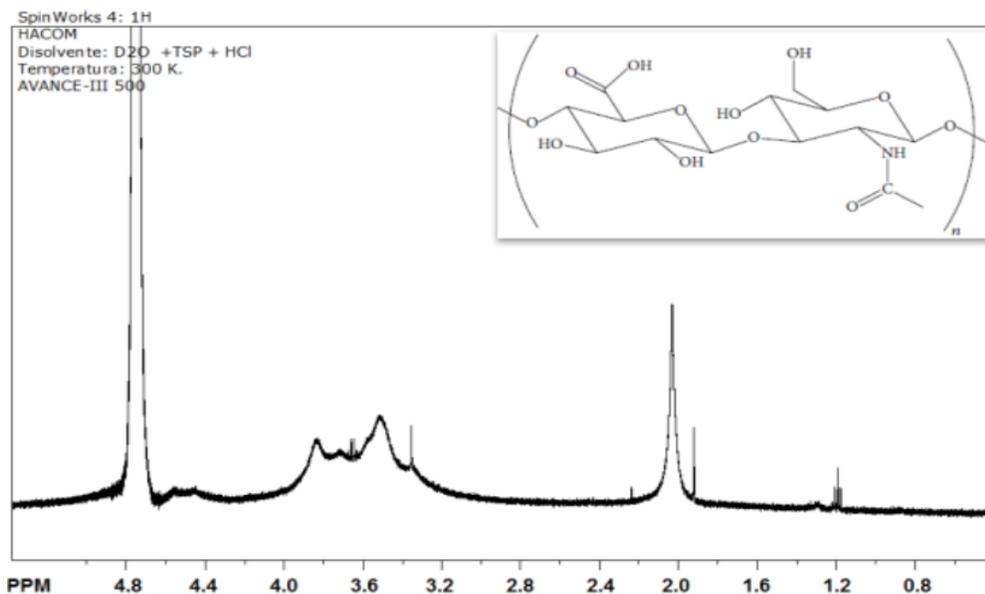
En este estudio se obtiene el espectro de una muestra de HA producida a 400 rpm y el espectro de la muestra de HA comercial, para obtener estos resultados se disolvieron 10 mg de cada muestra en 800 μL de D<sub>2</sub>O por 12 horas a temperatura ambiente, las muestras se analizaron en el espectrómetro a 300K y se realizaron mínimo 32 barridos de cada muestra [15]

El HA comercial presentó un desplazamiento químico a 1.18 ppm que indica la presencia del grupo metileno y otro a 2.02 ppm que indica la presencia del grupo acetamido de la *N*-acetilglucosamina [15]. Se presentó otro desplazamiento de 3.2 a 4 ppm lo cual indica la presencia de grupos hidroxilo en la molécula [22] y el pico a 4.8 ppm corresponde a la presencia de la molécula de agua [23]

Primero se somete el HA comercial al análisis de resonancia magnética y después la muestra de HA obtenida por el cultivo de *Streptococcus zooepidemicus*, como resultado se obtienen las siguientes gráficas que representan los espectros de cada una de las muestras

**Figura 17.**

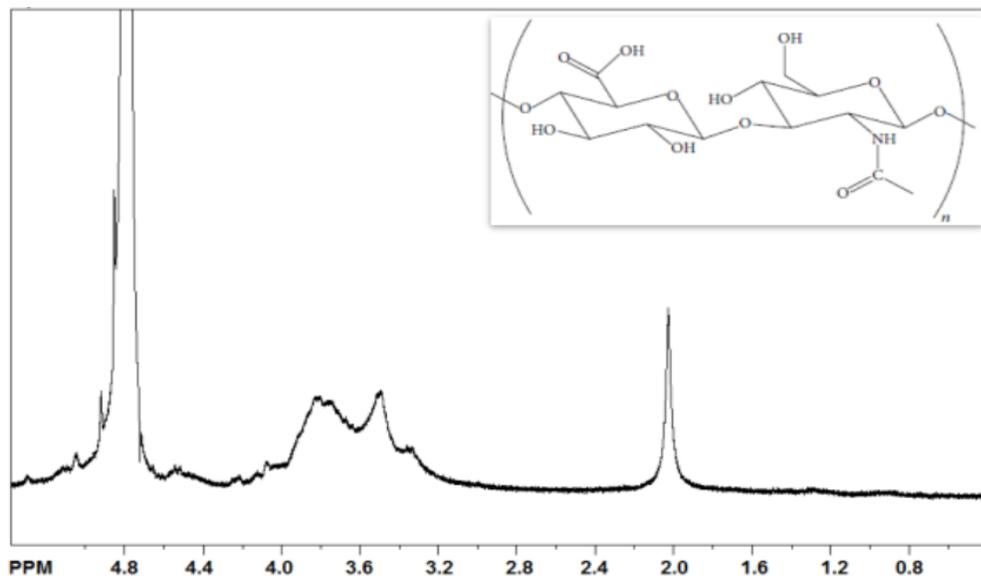
*Espectro <sup>1</sup>H-NMR del HA comercial.*



**Nota.** La figura muestra los espectros <sup>1</sup>H-NMR de HA comercial después de ser sometida al análisis de resonancia magnética nuclear.. Tomado de: C. Peñuelas “Producción y caracterización de ácido hialurónico por cultivo sumergido de *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*”. Trabajo de grado, Universidad autónoma metropolitana, Ciudad de México, 2016. Disponible: <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=16999&docs=UAMI16999.pdf> [Acceso: sep.25,2021].

### Figura 18.

Espectro  $^1\text{H-NMR}$  del HA producido en cultivo sumergido de *S. equi subsp. zooepidemicus*.



**Nota.** La figura muestra los espectros  $^1\text{H-NMR}$  de la muestra de HA obtenida por cultivo sumergido de *S. equi subsp. zooepidemicus* después de ser sometida al análisis de resonancia magnética nuclear. Tomado de: C. Peñuelas “Producción y caracterización de ácido hialurónico por cultivo sumergido de *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*”. Trabajo de grado, Universidad autónoma metropolitana, Ciudad de México, 2016. Disponible: <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=16999&docs=UAMI16999.pdf> [Acceso: sep.25,2021].

Ambos espectros presentan un pico a 2.02 ppm que corresponde al grupo acetamido de la N-acetilglucosamina y un masivo de 3.2 a 4 ppm que corresponde a los grupos hidroxilo presentes en la molécula de HA [24] De este modo se puede concluir que en la muestra obtenida experimentalmente sí hay presencia de HA ya que las características del espectro son similares a los resultados obtenidos con HA comercial.

### 3.4 Conclusión

Como resultado de la caracterización de *Streptococcus zooepidemicus* se determina que hace parte del dominio *Bacterias*, filo *Firmicutes*, clase *Bacilos*, orden *Lactobacillales*, familia *Streptococcaceae*, género *Streptococo* y especie *Streptococcus equi*, además su genoma está compuesto por un cromosoma circular de 2.167.264 pares de bases, el cual contiene 2087 genes

que codifican proteínas, 57 genes de ARNt y 5 operones de ARNr y para identificar el microorganismo se emplean técnicas microscópicas como la coloración de Gram que tiene como fundamento la composición de la pared celular. La ruta metabólica que le permite a la bacteria producir HA emplea la glucosa como fuente de energía para llevar a cabo esta biosíntesis, donde un total de 4 moles de ATP son consumidos para producir 1 mol del disacárido que constituye la unidad repetida del HA.

Para garantizar la presencia de ácido hialurónico se emplean técnicas como espectroscopía de infrarrojo FTIR y resonancia magnética nuclear de protón  $^1\text{H-NMR}$ , donde se compara una muestra de HA comercial con el obtenido en la fermentación para verificar la existencia de los grupos funcionales propios de HA, además para determinar su concentración se emplea el método turbidimétrico CTAB y la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) donde se realizan curvas de calibración para la cuantificación de ácido hialurónico.

El ácido hialurónico comercial que se utiliza como blanco en las técnicas de reconocimiento y cuantificación es obtenido mediante procesos químicos que necesitan de una gran cantidad de reactivos y solventes para su obtención, además se emplean tejidos animales y fluidos corporales que tienen gran cantidad de HA, sin embargo, mediante fermentación microbiana se obtiene HA con las mismas propiedades que el HA animal, por lo que también es posible emplear estas técnicas de cuantificación y reconocimiento para caracterizar el ácido obtenido.

#### 4. ECUACIONES, PARÁMETROS Y MODELOS CINÉTICOS PARA EL CRECIMIENTO DE *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS*

Los procesos llevados a cabo con microorganismos se han convertido en una importante alternativa para la obtención de una gran cantidad de productos comerciales, especialmente en la industria alimentaria y farmacéutica, pero también en otras industrias, tales como la cosmética, el análisis clínico y químico y en la biorremediación con fines ambientales.[25] Actualmente, los modelos de crecimiento microbiano se han caracterizado por ser una herramienta poderosa para analizar, describir y predecir el comportamiento de un microorganismo para entender los factores que influyen en él, con el propósito de explicar los cambios dinámicos en biomasa, la velocidad máxima de crecimiento y rendimientos, permitiendo analizar qué tan eficiente puede ser el microorganismo según su aplicación.

Se realizará un estudio de revisión bibliográfica que tiene como objetivo proporcionar información sobre los modelos cinéticos que describen el comportamiento del microorganismo para la obtención de ácido hialurónico con diferentes sustratos. Además, se describen los tipos de modelos definiendo las ecuaciones usadas por los distintos autores con el fin de estudiar la reproducibilidad y evaluar cuál tiene un mejor ajuste  $R^2$ . Finalmente, se evalúa la influencia del tipo de sustrato empleado para llevar a cabo la fermentación microbiana de manera adecuada, teniendo en cuenta factores como la concentración inicial y la fuente de carbono de éste, con el fin de establecer el suero de leche como fuente rica en nutrientes para el microorganismo y así junto al modelo cinético seleccionado poder sugerir un método que garantice de forma adecuada la producción de HA.

##### 4.1 Matriz de modelos y parámetros cinéticos para *Streptococcus zooepidemicus*

Se realiza una búsqueda bibliográfica en la base de datos Science Direct con la ecuación de búsqueda “*Streptococcus zooepidemicus and kinetic model*” con el fin de encontrar artículos científicos que relacionen modelos cinéticos para el crecimiento microbiano con la producción de ácido hialurónico mediante *Streptococcus zooepidemicus*. En cada uno de los artículos se definen parámetros cinéticos tales como la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), rendimientos ( $Y_x/s$   $Y_p/s$ ), productividad, concentración de sustrato inicial, concentración de inóculo y el modelo cinético que se emplea en cada uno de ellos. A continuación, se muestra la tabla que presenta los resultados obtenidos:

**Tabla 9.***Matriz de parámetros y modelos cinéticos para Streptococcus zooepidemicus*

TÍTULO	AÑO	SUSTRATO	VELOCIDAD (tasa de crecimiento)	RENDIMIENTOS		PRODUCTIVIDAD	CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO INICIAL (g/L)	CONCENTRACIÓN DE INÓCULO	MODELO CINÉTICO	REFERENCIAS
				Y x/s	Y p/s					
Producción y caracterización de ácido hialurónico por cultivo sumergido de <i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i>	2016	Caldo de soya	0.68 (h-1)	0.136(gBIOMASA/gGLUCOSA)	0.156 (gHA/gGLUCOSA)	0.54 (g/L) HA	5 (de glucosa)	10%(v/v)	Gompertz	[15]
Modelización cinética de la producción de ácido hialurónico en un medio basado en palma de palma ( <i>Borassus flabellifer</i> ) por <i>Streptococcus zooepidemicus</i> MTCC 3523	2018	Azúcar de palma	0.54 (h-1)	0.52 (gBIOMASA/gSUSTRATO)	0.09 (gHA/gSustrato)	1.22 (g/L) HA	30 (Sustrato)	5% (v/v)	Monod y Han-Levenspiel	[57]
Cinética de la producción de ácido hialurónico por <i>Streptococcus zooepidemicus</i> considerando el efecto de la glucosa	2009	Medio preparado de glucosa, extracto de levadura, fosfato monopotásico, fosfato de disodio, sulfato de magnesio y agua	1.14 (h-1)	0.37 (gBIOMASA/gGLUCOSA)	0.958 (gHA/gGLUCOSA)	0.354 (g/L) HA	40 (de glucosa)	11% (v/v)	Han-Levenspiel	[39]

<b>Tabla 9. Continuación</b>  Production of Hyaluronic Acid by <i>Streptococcus zooepidemicus</i> on Protein Substrates Obtained from <i>Scyliorhinus canicula</i> Discards	2015	Subproductos de las vísceras de <i>Scyliorhinus canicula</i>	1.10 (h-1)	0.080 (gBIOMASA/gSUSTRATO)	0.061(gHA/gSustrato)	3.03 (g/L) HA	20 ( de glucosa)	*	Ecuación logística	[58]
Deciphering the role of dissolved oxygen and N-acetyl glucosamine in governing higher molecular weight hyaluronic acid synthesis in <i>Streptococcus zooepidemicus</i> cell factory	2019	Glucosa y Sulfato de amonio	0.36 (h-1)	0.068 (gBIOMASA/gGLUCOSA)	0.067(gHA/gGLUCOSA)	2.1(g/L) HA	30 (de glucosa)	8% (v/v)	Andrew's	[59]
Hyaluronic acid production by <i>Streptococcus zooepidemicus</i> in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera	2010	Agua residual de mejillones(MPW)	1.32 (h-1)	*	*	2.46(g/L) HA	50 (Sustrato)	*	Monod y Luedeking-Piret	[60]
Fermentation process development for hyaluronic acid production by <i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920	2009	Glucosa, extracto de levadura, fosfato dipotásico, Cloruro de sodio, Sulfato de magnesio heptahidratado.	0.58 (h-1)	0.15 (gBIOMASA/gGLUCOSA)	0.12 (g HA/g glucose)	2.45(g/L) HA	20( glucosa)	50%(v/v)	Empírico	[61]

<p><b>Tabla 9.</b> Continuación</p> <p>Optimization And Kinetic Analysis On The Production Of Hyaluronic Acid By <i>Streptococcus zooepidemicus</i> In A Batch System</p>	2020	Medio preparado de glucosa, extracto de levadura, fosfato monopotásico, fosfato de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado y agua	0.81(h-1)	0.17(gBIOMASA/gGLUCOSA)	0.096(g HA/g glucose)	0.82(g/L) HA	30 (de glucosa)	10%(v/v)	Empírico	[62]
<p>Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by <i>Streptococcus zooepidemicus</i> using oxygen vector and optimum impeller tip speed</p>	2012	Glucosa , triptona, Fosfato monopotásico, Fosfato dipotásico	0.443(h-1)	0.196(gBIOMASA/gSISTRATO)	0.044 (gHA/gSustrato)	2.45(g/L) HA	50 (glucosa)	10%(v/v)	*	[63]
<p>Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of <i>Streptococcus zooepidemicus</i></p>	2008	Medio preparado de glucosa, extracto de levadura, sacarosa, sulfato de potasio, sulfato de magnesio heptahidratado, fosfato de hidrogeno disodico, sulfato ferroso heptahidratado.	1.21 (h-1)	0.18(gBIOMASA/gSacarosa)	0.08(gHA/gSacarosa)	1.44(g/L) HA	10(Sacarosa)	*	Haldane	[64]
<p>Bored Coffee Beans for Production of Hyaluronic Acid by <i>Streptococcus zooepidemicus</i></p>	2021	Monosacáridos en hidrolizados, extracto de levadura, Cloruro de sodio, Fosfato dipotásico, sulfato de magnesio heptahidratado	0.24 (h-1)	0.10(gBIOMASA/gSISTRATO)	0.13 (gHA/gSustrato)	2.7(g/L) HA	30 (de glucosa)	10%(v/v)	Empírico	[65]

<b>Tabla 9.</b> Continuación	2011	Mezcla de extracto de levadura y triptona	0.539 (h-1)	0.271 (gBIOMASA/gSUSTRATO)	0.024(gHA/gSustrato)	0.9 (g/L) HA	50 (glucosa)	5% (v/v)	*	[66]
Medium formulation and impeller design on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by <i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920										

**Nota.** La tabla muestra los parámetros cinéticos y los modelos de crecimiento microbiano que se emplean para la producción de ácido hialurónico mediante *Streptococcus zooepidemicus* a partir de diferentes sustratos.

## **4.2 Tipos de modelos de crecimiento microbianos**

De la matriz anterior, los modelos cinéticos que se presentan pueden clasificarse de acuerdo al conocimiento previo sobre el proceso.

### ***4.2.1 Fenomenológicos***

Corresponde a los modelos que están basados en fundamentos teóricos y además permiten explicar perfectamente el comportamiento del proceso. Estos modelos utilizan las leyes y principios básicos de la física, biología y química.[26]

### ***4.2.2 Empíricos***

Son modelos que se construyen sólo a partir de los datos experimentales realizando un ajuste de parámetros de las estructuras matemáticas correspondientes. Utilizan herramientas estadísticas para su construcción haciendo que sean de gran interés especialmente cuando se utilizan recursos digitales con baja complejidad computacional. Pero estos modelos son dependientes de los datos, es decir, si se efectúan variaciones del modelado, se deben obtener un nuevo conjunto de datos haciendo que el modelo cambie.[27]

### ***4.2.3 Combinación de fenomenológicos y empíricos***

Podemos encontrar estudios que se ajustan a los modelos semi-físicos de base fenomenológica ya que usan como principio universal la conservación de una estructura de fundamento fenomenológico fuerte, por otro lado, otros son de carácter semi físicos en los que se adiciona una estructura dada por el fenómeno de formulaciones empíricas para varios de los parámetros que se quieren obtener.

## **4.3 Clasificación de los modelos según su tipo de información**

### ***4.3.1 Descriptivos***

No necesitan explicar los fenómenos, ya que usualmente se realizan definiciones de características, componentes, condiciones que se presentan y cómo puede manifestarse el fenómeno. Solo se

realiza la descripción completa de los rasgos más relevantes del proceso con rasgos supuestos para construir la hipótesis de operación teniendo en cuenta el modelo seleccionado.

#### **4.3.2 Explicativos**

Se brinda un contenido amplio de información, ya que busca explicar todos y cada uno de los fenómenos presentes en el sistema basándose en leyes y principios. Responden al ¿por qué y de qué forma ocurren determinados fenómenos en un proceso? En esta clasificación no se pueden suponer valores.

#### **4.3.3 Puramente predictivos**

Se limitan a representar únicamente los efectos de las relaciones entre las variables de interés del sistema, sin proporcionar información alguna de los fenómenos involucrados respondiendo a ¿cómo será el comportamiento del sistema modelado en circunstancias diferentes?

### **4.4 Análisis de los modelos en bioprocesos encontrados**

La mayoría de los artículos estudiados en la matriz se ajustan a modelos empíricos con base fenomenológica, esto se debe a que en la actualidad los procesos continúan siendo un desafío para su modelado, esto se debe al nivel de complejidad del comportamiento que puede presentar la bacteria *Streptococcus zooepidemicus* en comparación con el análisis cinético de un reactor con productos químicos sin vida. Otra de las variables a tener en cuenta es que el microorganismo también presenta una membrana estructural, presenta partes filamentosas formación cápsulas y demasiadas reacciones bioquímicas que intervienen en la propia actividad celular [56]

La principal razón por la que los autores de la matriz busquen comprender el comportamiento de *Streptococcus zooepidemicus* es a través del empirismo, sin embargo, aunque se conozca la ruta metabólica y se conozcan modelos que representen la interacción de esta con el medio ambiente, es difícil entender el por qué no existe una relación matemática explícita, al menos, descriptiva entre las variables ambientales y la producción de HA. Ahí es donde se debe poder buscar matemáticamente desde analogías físico-químicas una descripción de los mecanismos por los cuales la célula establece comunicación con el medio en el que vive [56]

Esta formulación matemática proporcionará una mayor interpretación de los modelos empíricos de base fenomenológica aplicados a bioprocesos, puesto que ya no se tendrán que representar las cinéticas propias del microorganismo con términos empíricos como Monod, ya que este es el modelo más básico para comprender un poco el comportamiento de la bacteria.

En la Tabla 9 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos respecto a la producción de biomasa y formación de producto. Cada artículo estudia la fermentación microbiana de *Streptococcus zooepidemicus* para la producción de HA pero con diferentes sustratos que deben garantizar la presencia de los nutrientes que necesita la bacteria para crecer y reproducirse, también se emplean modelos cinéticos diferentes los cuales se ajustan a los resultados experimentales obtenidos por cada uno de los autores. La principal utilidad de los modelos cinéticos de crecimiento microbiano radica en que se puede obtener una predicción cuantitativa del proceso y así obtener un diseño experimental a partir de los datos obtenidos, también permiten visualizar las variables que pueden afectar el proceso y de este modo se puede tener un control de estas [56] a medida que se lleva a cabo la fermentación sin importar si el modelo cinético es empírico o fenomenológico.

En la Tabla 9 también se puede observar que la productividad y los rendimientos están estrictamente relacionados con el sustrato y las concentraciones iniciales que se emplean, ya que al tener un exceso en la concentración de glucosa se inhibe el crecimiento celular y por ende no hay producción de biomasa, esto se debe a que en altas concentraciones de glucosa ésta puede estar relacionada a la sobreproducción de metabolitos como etanol o ácido acético [28] los cuales traen efectos negativos para el proceso. Otro aspecto a considerar es la influencia del sustrato en la fermentación dado que en el metabolismo celular no todo el sustrato es consumido para la formación de biomasa, este puede utilizarse directamente en el crecimiento y en la síntesis de producto, mientras que otra parte se utiliza para generar la energía necesaria empleada en actividades de mantenimiento celular.

Este consumo de sustrato afecta directamente los rendimientos del proceso, dado que el rendimiento global es la cantidad de biomasa o producto presente entre la cantidad total de sustrato consumido para este fin [29], este rendimiento se expresa con la ecuación:

### **Ecuación 1.**

*Rendimiento global*

$$Y_{FG} = \frac{-\Delta F}{\Delta G}$$

Donde  $\Delta F$  es la masa de F producida y  $\Delta G$  es la masa de G consumida.

Los factores mencionados anteriormente influyen en los resultados obtenidos en los artículos científicos descritos en la matriz, por ende en cada uno de ellos se obtienen distintos rendimientos y productividades dado que se manejan sustratos y concentraciones diferentes, y cada uno de los autores definió el modelo que mejor se ajusta a los datos experimentales obtenidos y mediante ese modelo se pudo estimar el comportamiento de la bacteria en cuanto a producción de biomasa y consumo de sustrato. Sin embargo, hay carencia de conocimiento de varios de los fenómenos involucrados en un bioproceso, lo cual hace que la mayoría de los modelos de bioprocesos sean empíricos y por lo tanto debe restringir el espacio de los datos experimentales disponibles.

#### **4.5 Modelos de crecimiento microbiano para *Streptococcus zooepidemicus***

La descripción del crecimiento microbiano es un proceso fundamental para la comprensión de un bioproceso. Predecir este crecimiento es importante para un número amplio y muy variado de aplicaciones a nivel industrial . Los modelos cinéticos de crecimiento se han convertido en una herramienta consolidada para establecer los factores que influyen en él con el fin de poder explicar la propagación y actividad microbiana.

Los modelos matemáticos permiten relacionar variables medibles y no medibles en un proceso, cuando estos modelos son empleados para el crecimiento celular se debe tener en cuenta que están compuestos por tres partes, la primera corresponde a los principios químicos, físicos o biológicos involucrados en el proceso [30], la segunda son deducciones que se pueden hacer con datos existentes previamente y la tercera son suposiciones que el investigador debe realizar con criterios

válidos, por ejemplo, se puede suponer que se tiene un conjunto homogéneo de células, es decir, no se toma en cuenta las diferentes formas o tamaños de las células, normalmente en los procesos de fermentación existen parámetros desconocidos antes de llevar a cabo el proceso.

La relación entre la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) de una población de microorganismos y la concentración de sustrato (S) es una herramienta valiosa en biotecnología. Esta relación está representada por un conjunto de valores derivados empíricamente leyes de tasas que se denominan modelos teóricos. Estos modelos no son más que expresiones matemáticas generadas para describir el comportamiento de un sistema determinado.[31]

De esta manera los modelos matemáticos pueden ser estructurados o no estructurados, en los estructurados se consideran los aspectos básicos de la célula, mientras que en los no estructurados se considera que los microorganismos poseen una composición fija y simple [25] además, este tipo de modelos desprecia los cambios en el medio de cultivo por la concentración de biomasa.

Los modelos no estructurados se usan comúnmente en la solución de problemas en ingeniería, sin embargo, si se desea tener un concepto más amplio del sistema se deben considerar modelos cinéticos que involucren reacciones complejas como por ejemplo el metabolismo del microorganismo, la clasificación de estos modelos se muestra a continuación:

**Tabla 10.***Clasificación de modelos cinéticos de crecimiento microbiano*

<i>MODELO CINÉTICO</i>	<i>CONCEPTO</i>
<i>No estructurado (no segregado)</i>	<i>La biomasa se considera como un único componente y se considera una célula media como representativa del cultivo.</i>
<i>Metabólico</i>	<i>Se describen las rutas metabólicas como una red de reacciones con relaciones estequiométricas definidas</i>
<i>Estructurado</i>	<i>La descripción de la biomasa se realiza considerando que es formada por varias especies y se tienen en cuenta los componentes intracelulares</i>
<i>Químicamente estructurado</i>	<i>Se considera la biomasa formada por varias especies y también un metabolismo simplificado en una red de reacciones</i>
<i>Segregado</i>	<i>En la descripción del microorganismo se considera la distribución de alguna propiedad y no se considera con microorganismo medio.</i>

**Nota:** La tabla muestra la clasificación de los modelos cinéticos de crecimiento microbiano con su respectivo concepto donde se describen los aspectos a considerar en cada uno de ellos. Tomado de: A. Almudena, “Desarrollo de Modelos Cinéticos para bioprocesos: Aplicación a la Producción de Xantano”, Trabajo de grado, Universidad Complutense de Madrid, España, 1999. Disponible: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/3549/1/T23512.pdf> Acceso: [oct.23,2021].

Algunos de los modelos cinéticos empleados para el crecimiento de *Streptococcus zooepidemicus* se describen a continuación:

#### **4.5.1 Modelo cinético de Gompertz**

Este modelo se presenta gracias a la aplicación del cálculo diferencial para mostrar el comportamiento de la mortalidad humana, donde la primera causa de muerte sería un factor externo independiente (edad) y la segunda un factor dependiente (deterioro por envejecimiento), el cual crece exponencialmente a medida que la edad avanza [33].

La ecuación de Gompertz puede ajustarse al crecimiento microbiano con la siguiente expresión [34]:

**Ecuación 2.**

*Expresión de Gompertz para crecimiento microbiano [34]*

$$\text{Log } N = A + C e^{\{-e^{[B(t-M)]}\}}$$

Donde:

$\text{Log } N$  = logaritmo decimal de los recuentos microbianos [ $\log$  (UFC/ml)] al tiempo  $t$

$A$  = logaritmo de los recuentos cuando el tiempo decrece indefinidamente, es aproximadamente el logaritmo decimal del nivel inicial de bacterias.

$C$  = logaritmo de los recuentos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente

$M$  = tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento [h]

$B$  = velocidad de crecimiento relativa al tiempo  $M$  [h<sup>-1</sup>]

A partir de esta ecuación que define el modelo de Gompertz, se pueden derivar parámetros cinéticos importantes para el estudio del comportamiento de la bacteria, biomasa y producto. Dichos parámetros se pueden representar con las siguientes ecuaciones:

**Ecuación 3.**

*Expresión de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en modelo de Gompertz [34]*

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{BC}{e}$$

**Ecuación 4.**

*Expresión de la duración de la fase de latencia (LDP) en modelo de Gompertz [34]*

$$LDP = \frac{M - 1}{B}$$

**Ecuación 5.**

*Expresión de la máxima densidad de población microbiana (MDP) en modelo de Gompertz*

$$MSP = A + C$$

**3.5.2 Modelo cinético de Monod**

El planteamiento de este modelo se basa en que las reacciones que tienen lugar en el interior del microorganismo son enzimáticas, además este modelo muestra la expresión fundamental de la cinética microbiana porque considera la concentración de sustrato o nutriente limitante, dado que esta concentración varía durante la fermentación [25]. Este modelo se representa mediante la siguiente ecuación:

**Ecuación 6.**

*Expresión de Monod para cinética microbiana [29]*

*Sustrato (S) + Células (X) → más células (X) + Producto (P)*

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{S \cdot X}{K_s + S}$$

Donde:

$r_x$  = Velocidad de crecimiento de las células

$\mu_m$  = Velocidad específica máxima de crecimiento

$K_s$  = Constante de Monod

Comúnmente con la expresión de Monod también se puede obtener una ecuación en función de la velocidad específica de crecimiento representada por la ecuación 7

**Ecuación 7.**

*Expresión de velocidad específica de crecimiento en modelo de Monod [29]*

$$\mu = \frac{\mu_m \cdot S}{K_s + S}$$

Donde:

$\mu_m$  = Máximo valor que puede alcanzar la velocidad de crecimiento cuando  $S \gg K_s$

$K_s$  = Valor de la concentración del nutriente limitante en la que la velocidad específica de crecimiento es la mitad de la velocidad máxima

Se debe tener en cuenta que para valores de S (sustrato) inferiores a  $K_s$ , la velocidad de crecimiento depende de una forma lineal de de S, de lo contrario, el valor de  $\mu$  se hace independiente de S [276]. A partir del modelo cinético de Monod también se puede determinar una ecuación para el consumo de sustrato a lo largo de la fermentación:

**Ecuación 8.**

*Expresión de consumo de sustrato en modelo de Monod [29]*

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt}$$

Donde  $Y_{X/S}$  representa el rendimiento de biomasa respecto al sustrato. Teniendo en cuenta el concepto de sustrato limitante que maneja el modelo cinético de Monod, se puede definir el rendimiento del proceso como:

**Ecuación 9.**

*Expresión de rendimiento de biomasa producida respecto al consumo de sustrato [29]*

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{\text{Biomasa Producida}}{\text{Consumo Sustrato}} = \frac{gX \text{ seca}}{gS \text{ consumido}}$$

Normalmente el sustrato es la fuente de carbono empleada para proporcionar energía a las células, este sustrato no sólo se emplea para la producción de biomasa sino que también para asimilación de los microorganismos como material celular, provisión de energía para la síntesis celular y energía para el mantenimiento del cultivo[29] por lo tanto el consumo total de sustrato se representa con la siguiente ecuación:

**Ecuación 10.**

*Expresión de consumo total de sustrato [29]*

*Sustrato total = Sustrato empleado asimilación materia celular  
+ Provisión Energía síntesis celular + Energía mantenimiento cultivo.*

$$\Delta S = (\Delta S)_{MC} + (\Delta S)_C + (\Delta S)_M$$

También se puede definir el rendimiento de producto obtenido respecto al consumo de sustrato con la siguiente ecuación:

**Ecuación 11.**

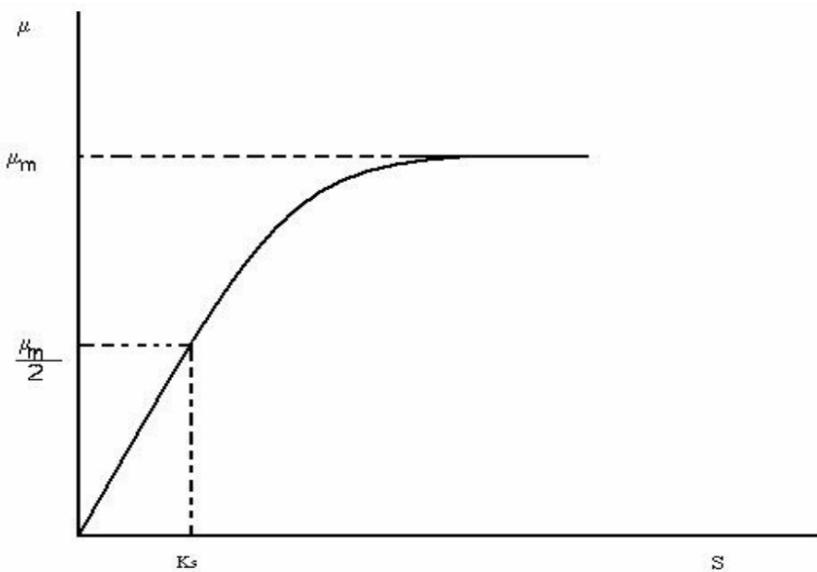
*Expresión de rendimiento de producto producido respecto al sustrato consumido [29]*

$$Y_{\frac{P}{S}} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{\text{Producto producido}}{\text{Consumo Sustrato}} = \frac{g / \text{mol}P}{g / \text{mol}S \text{ consumido}}$$

Otro aspecto a considerar es que en este modelo no se puede observar el comportamiento completo del microorganismo, dado que por ser uno de los modelos más simples sólo considera las fases de crecimiento exponencial y estacionaria como se muestra a continuación:

**Figura 19.**

*Dependencia de la velocidad específica de crecimiento respecto a la concentración de sustrato limitante según el modelo cinético de Monod*



**Nota.** La figura muestra el punto donde se obtiene la máxima velocidad específica de crecimiento ( $\mu_m$ ) respecto al consumo de sustrato y el comportamiento de la fase exponencial y estacionaria las cuales son las únicas fases consideradas en el modelo de Monod. Tomado de “Diseño de una planta piloto para la producción de bioetanol anexo 6”, 2004. Disponible: <https://onx.la/3f4b8> [Acceso: oct.24,2021].

#### **4.5.3 Modelo cinético de Han-Levenspiel**

Como se mencionó anteriormente, el modelo cinético de Monod asume que el sustrato es el único factor limitante del crecimiento, sin embargo, hay muchos factores que traen como consecuencia un efecto de inhibición para el crecimiento celular y la producción de biomasa. Debido a esto, Keehyun Han y Octave Levenspiel propusieron una generalización de la ecuación de Monod pero

teniendo en cuenta los efectos de inhibición causados por una alta concentración de sustrato, de células, de producto o de cualquier otra sustancia [35]

La ecuación que relaciona el crecimiento celular con la inhibición provocada por la concentración de sustrato se expresa a continuación:

**Ecuación 12.**

*Expresión de inhibición de crecimiento por concentración de sustrato en el modelo de Han-Levenspiel [35]*

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{S}{S^*}\right)^n * \frac{S}{\left(S + K_S \left(1 - \frac{S}{S^*}\right)^m\right)}$$

Donde:

S = Concentración del sustrato inhibidor

S\* = Concentración crítica del sustrato inhibidor donde el crecimiento se detiene

n y m = Constantes de Han-Levenspiel (números adimensionales)

Esta ecuación también puede emplearse para la inhibición por células o producto, reemplazando S por X o P respectivamente.

Como en el modelo cinético de Monod, las constantes m y n de la ecuación 12 con  $C_i = C_p$  o  $C_i = C_x$  pueden ser evaluadas a partir de un gráfico de Lineweaver-Burk con  $C_x/r_x$  vs.  $1/C_s$  [211] teniendo en cuenta que:

$C_i$  = Concentración de la sustancia inhibidora

$C_p$  = Concentración de producto

$C_x$  = Concentración de células

$C_s$  = Concentración de sustrato

La ecuación que se obtiene del gráfico se representa a continuación:

**Ecuación 13.**

*Expresión para el gráfico de Lineweaver-Burk que representa los 6 patrones de inhibición [35]*

$$\frac{C_x}{rx} = \frac{K_S \left(\frac{1 - C_i}{C_i^*}\right)^m}{\mu_m \left(\frac{1 - C_i}{C_i^*}\right)^n} * \frac{1}{C_S} + \frac{1}{\mu_m \left(\frac{1 - C_i}{C_i^*}\right)^n} = \frac{K_{S\ ABS}}{\mu_{m\ ABS}} * \frac{1}{C_S} + \frac{1}{\mu_{m\ ABS}}$$

Donde:

$rx$  = Velocidad de crecimiento de las células

$\mu_m$  = Velocidad específica máxima de crecimiento

$K_S$  = Constante de Monod

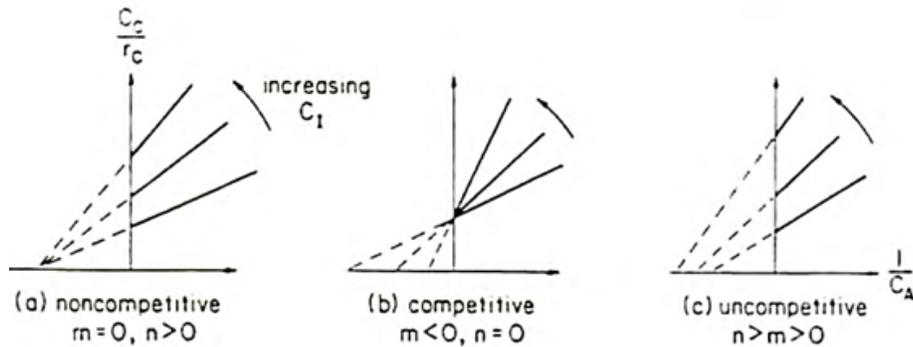
$C_i$  = Concentración de la sustancia inhibidora

$C_i^*$  = Concentración crítica de la sustancia inhibidora donde el crecimiento se detiene

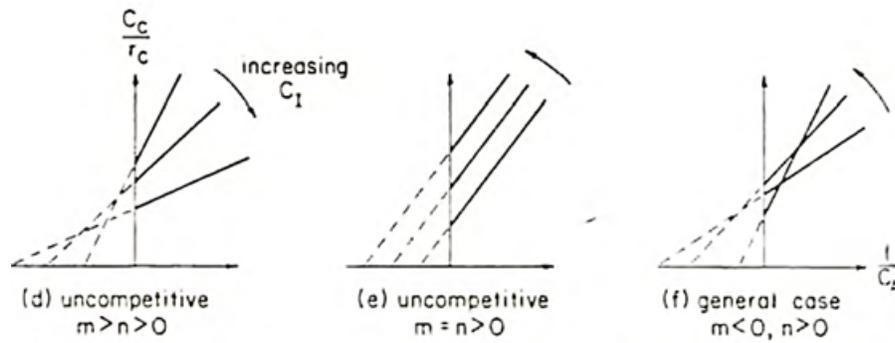
Después de emplear la ecuación 13 para un gráfico de Lineweaver-Burk se pueden obtener 6 patrones de inhibición representados a continuación:

**Figura 20.**

*Gráficas de Lineweaver-Burk para varias formas de inhibición de células o producto*



**Figura 20. Continuación**



**Nota.** La figura muestra las gráficas de Lineweaver-Burk para inhibición de células o producto basado en la ecuación 13, donde  $C_c$ ,  $C_A$  y  $r_c$  corresponden a  $C_x$ ,  $C_s$  y  $r_x$  respectivamente. Tomado de: K. Han and O. Levenspiel, “Extended monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition,” vol. 32, no. 4, pp. 430–447, Aug. 1988, doi: 10.1002/bit.260320404. Disponible: <http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/monroy/Articulos/keehyun1988.pdf> [Acceso: oct.24,2021].

La figura 20 muestra los 6 modelos de inhibición teniendo en cuenta las constantes  $m$  y  $n$  de Han-Levenspiel, dichos modelos representan los siguientes tipos de inhibición:

- Representa una inhibición no competitiva donde  $n > 0$  y  $m = 0$
- Representa una inhibición competitiva donde  $n = 0$  y  $m < 0$
- Representa una inhibición no competitiva generalizada donde  $n > m > 0$
- Representa una inhibición no competitiva generalizada donde  $m > n > 0$
- Representa una inhibición no competitiva donde  $n = m > 0$
- Representa el caso general, para cualquier  $n > 0$  y  $m < 0$

Los valores de  $K_{s,ABS}$  y  $\mu m_{ABS}$  se obtienen con los interceptos y abscisas de los gráficos de la figura 17, la equivalencia de estos valores se muestra a continuación:

**Ecuación 14.**

*Equivalencia de  $K_{S\text{ABS}}$  en la ecuación 13 [35]*

$$K_{S\text{ABS}} = K_S \left( \frac{1 - Ci}{Ci^*} \right)^m$$

Donde  $K_S$  y  $m$  son constantes, y con el logaritmo correspondiente se obtiene que:

**Ecuación 15.**

*Logaritmo natural de la ecuación 14 [35]*

$$\ln(K_{S\text{ABS}}) = m \ln \left( \frac{1 - Ci}{Ci^*} \right) + \ln(K_S)$$

**Ecuación 16.**

*Equivalencia de  $\mu_{m\text{ABS}}$  en la ecuación 13 [35]*

$$\mu_{m\text{ABS}} = \mu_m \left( \frac{1 - Ci}{Ci^*} \right)^n$$

Donde  $\mu_m$  y  $n$  son constantes, y con el logaritmo correspondiente se obtiene que:

**Ecuación 17.**

*Logaritmo natural de la ecuación 16 [35]*

$$\ln(\mu_{m\text{ABS}}) = n \ln \left( \frac{1 - Ci}{Ci^*} \right) + \ln(\mu_m)$$

Finalmente, para determinar el valor de las constantes de Han-Levenspiel se debe tener en cuenta la ecuación de la recta definida como  $y = px + b$  donde las constantes  $m$  y  $n$  de las ecuaciones 15 y 17 respectivamente, corresponden a la pendiente  $p$  de la ecuación de la recta.

#### 4.5.4 Modelo cinético Andrews

El modelo de Andrews es el más sencillo cuando el sustrato limitante produce inhibición en el crecimiento del microorganismo, la principal característica del modelo es el uso de una función de inhibición para relacionar la concentración de sustrato y la tasa de crecimiento específica.

Este modelo propone que el resultado principal de la inhibición por sustrato en un cultivo por lotes es un aumento del tiempo de retardo, mientras que en el cultivo continuo la inhibición por sustrato puede dar lugar a la inestabilidad del proceso. Por consiguiente, este modelo debería adecuarse en temas de investigación sobre la estabilidad de los procesos biológicos utilizados para el tratamiento de determinados residuos industriales, como los que contienen fenoles, tiocianatos, nitratos, amoníaco, ácidos volátiles, etc., que se sabe que son inhibidores para muchos de los organismos que los metabolizan La función de inhibición puede expresarse como se muestra en la siguiente ecuación[36]

#### **Ecuación 18.**

*Expresión de la función de inhibición en el modelo de Andrews[36]*

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + S^2 / K_I}$$

Donde,  $\mu$  = tasa de crecimiento específica, (tiempo-1),  $\mu_{\max}$  = tasa máxima de crecimiento específico en ausencia de inhibición, (tiempo-1),  $S$  = concentración de sustrato limitante, masa / volumen;  $K_s$  = constante de saturación, numéricamente es igual a la concentración más baja de sustrato a la que la tasa de crecimiento específico es igual a la mitad de la tasa de crecimiento específica máxima en ausencia de inhibición, masa / volumen;  $K_i$  = constante de inhibición,

numéricamente es igual a la concentración de sustrato más alta a la que la tasa de crecimiento específica es igual a la mitad de la tasa de crecimiento específica máxima [36]

#### **4.5.5 Modelo cinético Luedeking-Piret**

Modelo establecido por Robert Luedeking y Edgar L. Piret con el fin de establecer un enfoque más conveniente y efectivo para el desarrollo de ecuaciones cinéticas es una relación empírica ampliamente utilizada para evaluar las tasas de producción específicas de algunos metabolitos u otros productos en células cultivadas. Fue desarrollado inicialmente en 1959 para la producción de ácido láctico en cultivo discontinuo y continuo, luego se aplicó a muchos otros tipos de producción, tanto a procariotas como a eucariotas.[37]

En su investigación, Luedeking y Piret encontraron que la velocidad de formación del producto depende linealmente de la tasa de crecimiento microbiano y la concentración celular como se muestra en la ecuación 19

#### **Ecuación 19.**

*Ecuación cinética para crecimiento microbiano en el modelo de Luedeking-Piret[37]*

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

Donde las constantes  $\alpha$  y  $\beta$  están determinadas por el pH de la fermentación, y corresponden al crecimiento asociado y no asociado respectivamente. Esto implica entonces, que el primer término corresponde a la producción proporcional del metabolito con respecto al crecimiento celular; mientras que el segundo término, muestra como todos los microorganismos producen de manera constante una proporción de producto independientemente de la fase de crecimiento [37]

Según Garnier & Gaillet, para llegar a una solución analítica de la ecuación de Luedeking-Piret es necesario asumir que el crecimiento microbiano obedece el modelo Logístico.

**Ecuación 20.**

*Expresión del modelo logístico de crecimiento microbiano*

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

y que la velocidad específica de crecimiento está expresada como se muestra en la siguiente ecuación:

**Ecuación 21.**

*Expresión de la velocidad específica de crecimiento para el modelo de Luedeking-Piret*

$$\mu = K \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right)$$

Con lo anterior, por sustitución de la ecuación 20 en la ecuación 21 y la integración con las condiciones iniciales de  $t = 0$  h y  $X = 0$  g/L, se obtiene que la concentración celular en función del tiempo es:

**Ecuación 22.**

*Expresión de la concentración de biomasa en función del tiempo en el modelo de Luedeking-Piret*

$$X = \frac{X_0 e^{Kt}}{\left[ 1 - \frac{X_0}{X_{max}} (1 - e^{Kt}) \right]}$$

Por último, teniendo la ecuación 22 se sustituye en la ecuación 19 y se integra de nuevo con las condiciones iniciales de  $t = 0$  h y  $X = 0$  g/L, obteniendo finalmente una expresión para la producción de ácido hialurónico en función del tiempo:

**Ecuación 23.**

*Expresión de la solución analítica del modelo cinético de Luedeking-Piret*

$$P = P_0 + \alpha X_0 \left\{ \frac{e^{Kt}}{\left[ 1 - \frac{X_0}{X_{\max}} (1 - e^{Kt}) \right]} - 1 \right\} + \beta \frac{X_{\max}}{K} \ln \left[ 1 - \frac{X_0}{X_{\max}} (1 - e^{Kt}) \right]$$

**4.5.6 Modelo cinético Haldane**

La ecuación de Haldane, desarrollado en 1939, es una expresión matemática que se ha utilizado ampliamente en cinética de crecimiento para dar un ajuste adecuado a los datos experimentales en caso de inhibición del sustrato durante procesos enzimáticos. sistemas en discontinuo, estudia entre otras cosas, las capacidades de adaptación de microorganismos al medio.[30] Además de esto, es matemáticamente simple para su desarrollo y es una buena representación de la presencia de sustratos inhibitorios en el medio. El modelo de Haldane, se representa por medio de la Ecuación 24 .

**Ecuación 24**

*Modelo de Haldane*

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{k_m + S + k_I S^2}$$

Despejando S, en un balance de sustrato para acoplar a un balance de masa, da paso a la Ecuación 25.

### Ecuación 25

Modelo de Haldane para crecimiento microbiano

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}}}{K_s + S_0 + K_I \left( S_0 + \frac{X_0 - X}{Y_{XS}} \right)^2} X$$

Cuya expresión integrada, es una función independiente de la biomasa descrita mediante la ecuación 26.

### Ecuación 26.

Expresión integrada del modelo de Haldane

$$t = \frac{(S_0^2 K_I + S_0 + K_s) Y_{XS}^2 + ((2S_0 K_I + 1) X_0 Y_{XS} + K_I X_0^2) \ln\left(\frac{X}{X_0}\right)}{\frac{S_0 Y_{XS}^2 + X_0 Y_{XS}}{\mu_{m\acute{a}x}} + \frac{K_s Y_{XS} \ln(X - S_0 Y_{XS} - X_0)}{\frac{S_0 Y_{XS} + X_0}{\mu_{m\acute{a}x}}} - \frac{K_I X}{\frac{Y_{XS}}{\mu_{m\acute{a}x}}}}$$

Donde,

$\mu_{m\acute{a}x}$ : Crecimiento específico (h<sup>-1</sup>)

$S$ : Concentración de sustrato (g/mL)

$K_s$ : Constante de saturación (g/mL)

$K_I$ : Constante de inhibición por sustrato (g/mL)

### 3.5.7 Modelo cinético de la Ecuación Logística

Esta ecuación únicamente permite determinar el crecimiento de la biomasa en función del tiempo como se muestra a continuación

#### **Ecuación 27.**

*Expresión de la ecuación logística*

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left( 1 - \frac{X}{X_m} \right)$$

Donde:

$\mu$  = Tasa de crecimiento específica

$X_m$  = Concentración máxima de biomasa en el proceso

$X$  = Concentración de biomasa

Para obtener finalmente una ecuación que represente el crecimiento de biomasa se debe integrar la ecuación 27 con condiciones iniciales de  $X$  y  $t$  iguales a 0 [30], después de este procedimiento se obtiene:

#### **Ecuación 28.**

*Expresión del crecimiento de biomasa en función del tiempo integrando la ecuación logística*

$$X = \frac{X_0 X_m e^{\mu t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu t}}$$

#### 4.6 Ajuste de los modelos cinéticos

Para determinar el modelo que más se ajuste al crecimiento de la bacteria se deben tener en cuenta ciertos parámetros como el porcentaje de error de mínimos cuadrados (MSE) y el coeficiente de correlación o determinación  $R^2$ , en general, un modelo cinético se ajusta bien a los datos experimentales si hay poca diferencia entre los valores observados y los valores de predicción del modelo.

El  $R^2$  es una medida estadística que muestra qué tan cerca están los datos de la línea de regresión ajustada, este parámetro se define como el porcentaje de la variación en la variable de respuesta que es explicado por un modelo lineal como se muestra a continuación [38]

**Ecuación 29.**

*Expresión para determinar el parámetro  $R^2$*

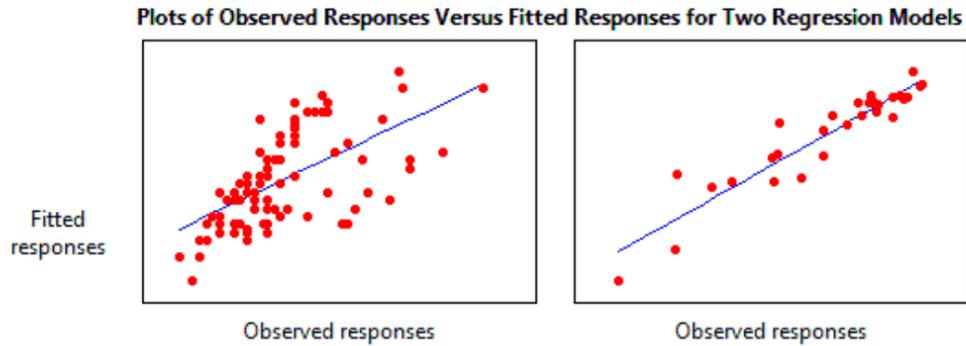
$$R^2 = \frac{\textit{Variación explicada}}{\textit{Variación total}}$$

Este valor adimensional siempre está entre 0 y 100% donde 0 indica que el modelo no explica ninguna porción de variabilidad de los datos de respuesta en torno a su medida y 100 indica que el modelo explica toda la variabilidad de los datos de respuesta en torno a su medida [38]

Generalmente, si se obtiene un valor mayor de  $R^2$  mejor se ajusta el modelo a los datos obtenidos, para observar la función de este parámetro a continuación se mostrará una representación gráfica de los valores observados y los valores ajustados del modelo

**Figura 21.**

*Representación gráfica de valores ajustados y obtenidos para determinar el  $R^2$*



**Nota.** La figura muestra la representación gráfica de datos observados identificados con color rojo y los datos ajustados del modelo con la función azul”. Tomado de: “Análisis de Regresión: ¿Cómo Puedo Interpretar el R-cuadrado y Evaluar la Bondad de Ajuste?”, 2019. Disponible: <https://blog.minitab.com/es/analisis-de-regresion-como-puedo-interpretar-el-r-cuadrado-y-evaluar-la-bondad-de-ajuste> [Acceso: oct.29,2021]

El modelo de regresión de la izquierda explica el 38% de la varianza, es decir, un  $R^2$  de 0.38, mientras que el modelo de la derecha explica el 87%, entonces cuanto mayor sea la varianza explicada por el modelo de regresión, más cerca estarán los puntos de los datos observados a los puntos que el modelo predice, en este caso los datos de la línea de regresión ajustada.

Para predecir el modelo cinético que mejor se ajuste al crecimiento de *Streptococcus zooepidemicus* se deben tener en cuenta el valor de ajuste  $R^2$  de cada uno de los modelos mencionados anteriormente, dicho valor será tomado de los artículos científicos descritos en la Tabla 9 y la información se presenta a continuación:

**Tabla 11.***Ajuste de los modelos cinéticos*

ARTÍCULO	MODELO CINÉTICO	AJUSTE (R2)	REFERENCIAS
Producción y caracterización de ácido hialurónico por cultivo sumergido de <i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i>	Gompertz	0.87	[15]
Modelización cinética de la producción de ácido hialurónico en un medio basado en palma de palma ( <i>Borassus flabellifer</i> ) por <i>Streptococcus zooepidemicus</i> MTCC 3523	Monod	0.96	[57]
Cinética de la producción de ácido hialurónico por <i>Streptococcus zooepidemicus</i> considerando el efecto de la glucosa	Han-Levenspiel	0.997	[39]
Production of Hyaluronic Acid by <i>Streptococcus zooepidemicus</i> on Protein Substrates Obtained from <i>Scylliorhinus canicula</i> Discards	Ecuación logística	0.986	[58]
Deciphering the role of dissolved oxygen and N-acetyl glucosamine in governing higher molecular weight hyaluronic acid synthesis in <i>Streptococcus zooepidemicus</i> cell factory	Andrew's	0.82	[59]
Hyaluronic acid production by <i>Streptococcus zooepidemicus</i> in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera	Luedeking-Piret	0.996	[60]
Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Haldane	0.995	[64]

*Nota.* La tabla muestra el ajuste de los modelos cinéticos que describen el comportamiento de *Streptococcus zooepidemicus* bajo distintas fuentes de sustrato.

En la Tabla 11 se observa que el modelo de mayor ajuste es el modelo de Han-Levenspiel, el cual permite evaluar el crecimiento microbiano teniendo en cuenta los factores que causan inhibición en el crecimiento celular y en la producción de biomasa, su desarrollo puede llevarse a cabo mediante las ecuaciones explicadas anteriormente con datos experimentales dado que se basa en el modelo de Monod pero no sólo evaluando la fase exponencial sino que también el efecto de la inhibición en la fase de muerte.

En el artículo “*Cinética de la producción de ácido hialurónico por Streptococcus zooepidemicus considerando el efecto de la glucosa*” donde se emplea el modelo de Han-Levenspiel, se realiza el experimento a escala laboratorio empleando un bioreactor fermentador de 2 litros con un volumen de trabajo de 1,5 litros de modo discontinuo [39], este estudio se realizó con el fin de validar el modelo cinético con los datos experimentales obtenidos teniendo en cuenta la concentración inicial de sustrato y las fases de crecimiento de la bacteria.

Se debe tener en cuenta que todos los modelos explicados describen el comportamiento de *Streptococcus zooepidemicus* bajo distintas fuentes de sustrato y condiciones iniciales, en este caso el modelo de Han-Levenspiel evalúa el crecimiento microbiano empleando como sustrato un medio preparado de glucosa, extracto de levadura, fosfato monopotásico, fosfato de sodio, sulfato de magnesio y agua, por lo tanto, para el crecimiento de este microorganismo en sustratos ricos en azúcares se puede emplear el modelo de Han-Levenspiel [39]. El sustrato que se utiliza para llevar a cabo la fermentación tiene gran influencia tanto en la velocidad de crecimiento como en los rendimientos y en las características del producto final, lo cual se explicará en el siguiente numeral

#### **4.7 Influencia del tipo de sustrato empleado**

Los *Streptococcus* generalmente utilizan glucosa o sacarosa como fuente de carbono, sin embargo, por la complejidad de su metabolismo también necesitan una fuente de nitrógeno ya sea orgánica o inorgánica, por ejemplo peptona, extracto de levadura, aminoácidos, entre otros, adicionalmente también requieren medios que contengan sales orgánicas de iones divalentes como magnesio o potasio [9]. La afinidad de la bacteria con la fuente de sustrato se ve reflejada en la velocidad de crecimiento específica, dado que entre mayor sea la afinidad, se incrementa la velocidad de crecimiento y esto favorece la producción de biomasa, sin embargo, se debe controlar la concentración de sustrato para evitar inhibición por exceso, a continuación, se mostrará la relación de las fuentes de sustrato descritas en la Tabla 9 con la velocidad de crecimiento específica.

**Tabla 12.***Sustratos empleados con la tasa de crecimiento obtenida*

SUSTRATO	TASA DE CRECIMIENTO	REFERENCIA
Caldo de soya	0.68 (h-1)	[15]
Azúcar de palma	0.54 (h-1)	[57]
Medio preparado de glucosa,extracto de levadura, fosfato monopotásico, fosfato de disodio, sulfato de magnesio y agua	1.14 (h-1)	[39]
Subproductos de las vísceras de <i>Scyllorhinus canicula</i>	1.10 (h-1)	[58]
Glucosa y Sulfato de amonio	0.36 (h-1)	[59]
Agua residual de mejillones(MPW)	1.32 (h-1)	[60]
Glucosa, extracto de levadura, fosfato dipotásico, Cloruro de sodio, Sulfato de magnesio heptahidratado.	0.58 (h-1)	[61]
Medio preparado de glucosa,extracto de levadura, fosfato monopotásico, fosfato de disodio, sulfato de magnesio heptahidratado y agua	0.81(h-1)	[62]
Glucosa , triptona,Fosfato monopotásico, Fosfato dipotásico	0.443(h-1)	[63]
Medio preparado de glucosa,extracto de levadura, sacarosa, sulfato de potasio,sulfato de magnaseio heptahidratado, fosfato de hidrogeno disodico,sulfato ferroso heptahidratado.	1.21 (h-1)	[64]
Monosacáridos en hidrolizados, extracto de levadura,Cloruro de sodio,Fosfato dipotásico,sulfato de magnesio heptahidratado	0.24 (h-1)	[65]
Mezcla de extracto de levadura y triptona	0.539 (h-1)	[66]

*Nota:* La tabla muestra la influencia de los sustratos en la tasa de crecimiento específica de *Streptococcus zooepidemicus*.

Como se puede observar en la Tabla 12 los sustratos que emplean medios preparados de diferentes nutrientes y azúcares son los que presentan mayor tasa de crecimiento específica, como por ejemplo el agua residual de mejillones o el medio preparado de glucosa, extracto de levadura, fosfato monopotásico, fosfato de disodio, sulfato de magnesio y agua el cual se emplea en el

modelo de Han-Levenspiel, esta afinidad por el sustrato puede influenciar en el buen ajuste que tiene el modelo sobre el comportamiento de la bacteria.

Para llevar a cabo la fermentación de forma adecuada se debe controlar la concentración inicial de sustrato, de modo que sea la cantidad necesaria para que la bacteria lleve a cabo su metabolismo pero sin tener un exceso de sustrato, puesto que esto podría provocar la sobreproducción de metabolitos que no son de interés y que por el contrario podrían afectar el crecimiento celular. Si la concentración de sustrato es muy baja, esto haría que el crecimiento celular compita con la producción de HA por la fuente de carbono, lo cual provocaría una menor producción de HA [9]. La concentración y el tipo de sustrato también afectan las características del HA producido; la fuente de carbono influye directamente en el peso molecular del ácido hialurónico obtenido, por ejemplo, medios con lactosa y sacarosa producen HA con mayor peso molecular en comparación con medios que contienen glucosa como fuente de carbono [9], el peso molecular es un factor importante al momento de elegir el método de purificación puesto que de esta propiedad dependen las aplicaciones del HA obtenido, lo cual se profundizará en el siguiente capítulo. En el modelo cinético elegido se emplea una concentración inicial de 40 g/L de glucosa, obteniendo una productividad de 0.354 g/L de HA.[9]

#### **4.8 Características del suero de leche como sustrato**

Como se debe garantizar que el sustrato cumpla con los requerimientos nutricionales para la bacteria, se propone emplear suero de leche que puede ser recuperado de los residuos de la industria láctea, este subproducto puede variar en cuanto a sus condiciones físicas dependiendo de su obtención. Por ejemplo, si este suero proviene de la leche después de la precipitación de la caseína se presenta como un líquido translúcido verde y se clasifica como suero de leche ácido, mientras que si proviene de la separación de la cuajada en la fabricación de quesos se presenta como un líquido color amarillo y se conoce como suero de leche dulce por las enzimas involucradas en el proceso [40]. Este microorganismo puede producir tanto ácido hialurónico como ácido láctico, este producto se puede controlar reduciendo la eficiencia para la conversión del sustrato a ácido hialurónico [41]

El suero de leche se define como un sustrato complejo dado que no se conoce la composición exacta de sus nutrientes, en la literatura se encuentra que está compuesto por cuatro proteínas principales:  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La), albúmina de suero sanguíneo (BSA) e inmunoglobulina (Ig), también se compone de una gran variedad de iones (Ca, K, Fe, Mg) y vitaminas como tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, cobalamina, ácido ascórbico [42] A continuación se muestra una composición aproximada de los tipos de suero de leche:

**Tabla 13.**

*Composición aproximada del suero de leche dulce y ácido*

COMPONENTE	SUERO DE LECHE DULCE (g/L)	SUERO DE LECHE ÁCIDO (g/L)
Sólidos totales	60-70	60-70
Lactosa	45 - 50	40 - 45
Grasa	0 - 5.0	0 - 5.0
Proteína	5.0 - 10	5.0 - 10
Calcio	0.4 - 0.6	1.0 - 1.5
Fósforo	0.4 - 0.6	0.5 - 0.8
Potasio	1.5 - 2.0	1.5 - 2.0
Cloruros	2.0 - 2.5	2.0 - 2.5

**Nota:** La tabla muestra la composición aproximada de los tipos de suero de leche. Elaboración propia. Información tomada de: L. Urribarrí, A. Vielma, G. Páez, J. Ferrer, “Producción de ácido láctico a partir de suero de leche utilizando *lactobacillus helveticus* en cultivo continuo”, 2004 Disponible: <https://www.redalyc.org/pdf/959/95914403.pdf> Acceso: [oct. 30.,2021].

Para garantizar el crecimiento microbiano y poder emplear el modelo de Han - Levenspiel se debe emplear un sustrato rico en nutrientes como el suero de leche que contiene aminoácidos a base de azufre como la cisteína y la metionina para ser empleados como fuente de nitrógeno, además contiene calcio, potasio, sodio y magnesio, estas sales orgánicas también son necesarias para el metabolismo de la bacteria, la fuente principal de carbono en este caso sería la lactosa y por ende se podría obtener ácido hialurónico con altos pesos moleculares después del proceso de purificación.

Realizando una búsqueda bibliográfica se encuentra el trabajo de grado “*Ajuste de un modelo matemático para el crecimiento de Streptococcus pyogenes en 2 sustratos para la producción de ácido hialurónico a escala de laboratorio*” del año 2016, donde se emplea suero de leche y se da un soporte de la afinidad del sustrato con *Streptococcus*, sin embargo, en este documento se emplea el modelo cinético de Monod para describir los parámetros cinéticos, pero como ya se ha mencionado anteriormente este modelo sólo estudia la fase exponencial y no incluye el comportamiento real de la bacteria.

#### **4.9 Propuesta para el proceso de fermentación**

Para validar el ajuste del modelo de Han-Levenspiel al crecimiento de *Streptococcus zooepidemicus* empleando suero de leche, se recomienda llevar a cabo el proceso de fermentación experimentalmente con dicho sustrato para validar todas las condiciones y la influencia del sustrato en la calidad del producto obtenido. En el **Anexo 2** se describe el proceso de fermentación que se propone para llevar a cabo el estudio a nivel laboratorio y validar el comportamiento de la bacteria según el modelo cinético.

#### **4.10 Conclusión**

Se realizó un análisis de la literatura científica más referenciada sobre los modelos cinéticos en los bioprocesos para la obtención de HA por medio de fermentación, utilizando diferentes sustratos que garantizan el crecimiento de la bacteria *Streptococcus zooepidemicus* donde los diferentes autores recurren a distintas ecuaciones cinéticas para poder explicar el comportamiento de esta misma.

Debido a la complejidad de modelar cinéticamente la relación que existe entre el medio ambiente y el material celular en este tipo de procesos, esta relación afecta directamente a todas las cinéticas, las que hasta el momento han sido formuladas de relaciones empíricas. Sin embargo, aunque existe un gran avance en el modelado de bioprocesos, el empirismo seguirá estando en la mayoría de los modelos que se realizan en la industria por la necesidad de tener un control y optimización. Es por esto que se decidió hacer un análisis de los modelos expuestos en la Tabla 9 para comprender la relación entre cada uno de los artículos y así poder concluir que el modelo de Han-Levenspiel presentó el mejor ajuste con un  $R^2$  de 0,997 empleando sustratos ricos en azúcares y que a pesar de basarse en el modelo de Monod es capaz de incluir el efecto de inhibición en la fase de muerte.

El uso de suero de leche es una buena fuente de carbono ya que cumple con los requerimientos nutricionales como lactosa y aminoácidos a base de azufre como la cisteína y la metionina, calcio, potasio, sodio y magnesio, se debe tener un estricto control de la concentración inicial de este sustrato para no causar inhibición por exceso ni competencia por la falta de éste. Se describe la composición del suero de leche con el fin de demostrar la afinidad de *Streptococcus zooepidemicus* con este tipo de sustrato para la obtención de ácido hialurónico con altos pesos moleculares que sea ideal para la aplicación en la industria cosmética.

## **5. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO OBTENIDO POR FERMENTACIÓN MICROBIANA**

Durante el proceso de fermentación microbiana, la bacteria *Streptococcus zooepidemicus* produce el HA como una membrana que encapsula la célula, para obtener este producto con el mayor porcentaje de pureza posible y con las características que se deseen según su aplicación se debe llevar a cabo un proceso de purificación donde se garantice la eliminación de residuos bacterianos, proteínas, endotoxinas, ácidos nucleicos y otras impurezas que puedan estar presentes en el caldo de fermentación que contiene el HA.

En el proceso de obtención de ácido hialurónico por vía química a partir de tejidos animales se emplean disolventes compuestos en su mayoría por cloroformo y existe riesgo de contaminación con proteínas y virus característicos de los animales [9], mientras que por fermentación microbiana se puede llevar a cabo un proceso de purificación más simple y con solventes orgánicos, en este capítulo se definen diversos métodos de purificación que se ajustan al HA obtenido por fermentación y la finalidad es elegir el que además de lograr las características deseadas del producto final también sea eficiente, que no se requiera emplear químicos peligrosos y que se obtenga un alto porcentaje de pureza, este método se selecciona teniendo en cuenta que se desea obtener HA de alto peso molecular para aplicaciones en productos cosméticos y que se debe someter a un proceso de secado para obtenerlo en forma granular.

### **5.1 Métodos de purificación de ácido hialurónico**

Como se ha mencionado anteriormente, el ácido hialurónico es un glicosaminoglicano de alto peso molecular y tiene diversas propiedades fisicoquímicas y biológicas como lubricidad, viscoelasticidad, retención de agua, reparación de heridas, entre otras [6]. El HA purificado puede ser empleado en diversos productos comerciales como cosméticos, aditivos alimentarios, productos farmacéuticos e hidrogeles para aplicaciones biomédicas. Como su obtención se lleva a cabo mediante fermentación microbiana se debe realizar una purificación de HA en el medio que lo contiene, para esto se pueden emplear métodos de filtración y absorción, los cuales dan como resultado la purificación de ácido hialurónico con pesos moleculares que oscilan entre  $10^4$  y  $10^7$  Da

[43]. A continuación se realizará una descripción de los procesos de purificación de HA, con el fin de determinar el método que más se ajuste a las necesidades del proceso.

### ***5.1.1 Purificación de HA mediante filtraciones***

Este proceso se realiza con el fin de eliminar las cepas bacterianas restantes y las impurezas insolubles que contiene el caldo de fermentación que es altamente viscoso, este método se lleva a cabo en dos etapas como se describe a continuación:

5.1.1.a Eliminación de bacterias e impurezas insolubles. Este paso se realiza filtrando el caldo de fermentación con hojas de filtro de fibras de celulosa fibriladas y la adición de diferentes concentraciones de tierra. Este filtro tiene tres tamaños de retención diferentes de 0.6, 1.0, y 1.5  $\mu\text{m}$  y en cada uno se emplea una concentración de tierra de 1, 3 y 5% p/v respectivamente [44] y cada filtración se realiza por triplicado con diferentes concentraciones y se debe tener en cuenta que al aumentar las dichas concentraciones de tierra los caudales también aumentan significativamente. Para verificar que la filtración se llevó a cabo correctamente, se mide la densidad óptica del caldo de fermentación antes y después de la filtración, generalmente la solución fermentada tiene una densidad óptica de 5.30, y después de la filtración se obtendrían densidades inferiores a 0.1 [44]. Estos resultados pueden representarse en la siguiente tabla:

**Tabla 14.***Resultados de la filtración con hojas de filtro de celulosa fibrilada*

TAMAÑO DE RETENCIÓN NOMINAL ( $\mu\text{m}$ )	CONCENTRACIÓN DE TIERRA (%)	DENSIDAD ÓPTICA (260nm)	CAUDALES (L/h)
ANTES DE LA FILTRACIÓN			
-	-	5.30	-
DESPUÉS DE LA FILTRACIÓN			
0.6	1	0.06	2.5
0.6	3	0.05	5.3
0.6	5	0.03	10
1.0	1	0.05	3.7
1.0	3	0.07	6.2
1.0	5	0.03	9.3
1.5	1	0.06	5.8
1.5	3	0.02	8.5
1.5	5	0.02	13.3

**Nota.** La tabla muestra los datos obtenidos de densidades ópticas y caudales después de realizar la filtración con diferentes tamaños de retención y concentraciones de tierra.. Tomado de: S. Choi, W. Choi, S. Kim, S.-Y. Lee, I. Noh, and C.-W. Kim, "Purification and biocompatibility of fermented hyaluronic acid for its applications to biomaterials," vol. 18, no. 1, p. 6, 2014, doi: 10.1186/2055-7124-18-6. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549129/#CR14> [Acceso: oct.26,2021].

5.1.1.1.b Purificación de HA con adsorbentes. Este método se realiza porque el caldo de fermentación que se obtiene después de la filtración aún contiene cantidades significativas de impurezas, así que se emplean varios adsorbentes para conseguir la purificación de HA y eliminar endotoxinas\* [32], proteínas, ácidos nucleicos y los adsorbentes usados en el proceso como se muestra a continuación:

- Eliminación de endotoxinas: Para este proceso se emplean adsorbentes como carbón activado y alúmina, los cuales permiten la eliminación de endotoxinas presentes en el caldo de fermentación que generalmente presentan una concentración de 67.44 UE/ml (Unidades de Endotoxina por mililitro) [44]. Para este proceso se emplean adsorbentes de carbón activado como Norit C Extra USP, Norit CN1 y Darco KB-B, sin embargo, la alúmina es el adsorbente que elimina la mayor cantidad de endotoxinas como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 15.**

*Resultados de la eliminación de endotoxinas por adsorbentes de carbón activado y alúmina*

ENDOTOXINA INICIAL (67.44 UE/ml)	
Adsorbentes (2%)	Eliminación (%)
Norit C Extra USP	91.99
Norit CN1	90.07
Darco KB-B	88.30
Alúmina	99.70

**Nota.** La tabla muestra el porcentaje de endotoxinas eliminadas por cada uno de los adsorbentes empleados en el proceso de purificación. Tomado de: S. Choi, W. Choi, S. Kim, S.-Y. Lee, I. Noh, and C.-W. Kim, “Purification and biocompatibility of fermented hyaluronic acid for its applications to biomaterials,” vol. 18, no. 1, p. 6, 2014, doi: 10.1186/2055-7124-18-6. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549129/#CR14> [Acceso: oct.26,2021].

\*La endotoxina es un lipopolisacárido liberado por las bacterias con el fin de mantener la integridad de la pared celular y son una fuente de pirogenicidad en humanos [32]

- Eliminación de proteínas: En los procesos de fermentación se obtienen proteínas de alto peso molecular como subproductos metabólicos, generalmente están presentes en el caldo de fermentación con una concentración de 77.73 µg/ml [44] las cuales también deben ser eliminadas empleando adsorbentes como en el caso de las endotoxinas, sin embargo, también se puede emplear otro tipo de carbón activado como Norit A Supra EUR y a diferencia de las endotoxinas, en este caso la alúmina es el adsorbente que elimina la menor cantidad de proteínas de alto peso molecular, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 16**

*Resultados de la eliminación de proteínas por adsorbentes de carbón activado y alúmina*

PROTEÍNAS INICIAL (77.73 µg/ml)	
Adsorbentes (2%)	Eliminación (%)
Norit C Extra USP	97.32
Norit CN1	97.41
Darco KB-B	96.37
Norit A Supra EUR	96.57
Alúmina	87.89

*Nota.* La tabla muestra el porcentaje de proteínas eliminadas por cada uno de los adsorbentes empleados en el proceso de purificación. Tomado de: S. Choi, W. Choi, S. Kim, S.-Y. Lee, I. Noh, and C.-W. Kim, “Purification and biocompatibility of fermented hyaluronic acid for its applications to biomaterials,” vol. 18, no. 1, p. 6, 2014, doi: 10.1186/2055-7124-18-6. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549129/#CR14> [Acceso: oct.26,2021].

- Eliminación de ácidos nucleicos: Para este proceso también se emplean los adsorbentes mencionados anteriormente, donde se elimina hasta el 99.7% de ácidos nucleicos con carbón activado mientras que la alúmina elimina sólo el 85%, esto se debe a que los carbonos activados

tienen relaciones de superficie de masa más altas (1200 a 2050 m<sup>2</sup>/g) [44] mientras que la alúmina presenta un valor de 103 m<sup>2</sup>/g. Para verificar la eliminación de ácidos nucleicos se realiza una espectroscopía UV con longitud de onda de 260 nm donde se puede evidenciar que los ácidos nucleicos se pueden eliminar independientemente del estado de los carbones activados (polvos o granulares) [44]

- Eliminación de adsorbentes usados: En este paso se llevan a cabo procesos de agitación de las muestras que contienen el caldo fermentado con las partículas de adsorbentes durante aproximadamente 5 horas dado que bajo el efecto de la agitación los carbones activados granulares se descomponen [44] y luego se filtran para eliminar los adsorbentes y obtener HA purificado, para esto se emplea un filtro de 0.45µm dependiendo del tamaño de partícula el cual generalmente es inferior a 5µm [44].

En este método se obtiene HA en forma de polvo blanco, la solidificación de la muestra de HA se logra usando un procesamiento secuencial de precipitación de HA con acetona agregando 3 litros aproximadamente a la solución procesada por adsorción, el polvo se recupera y se seca después de filtrar la muestra de HA con una malla de 100 µm [44] . Se obtiene aproximadamente un rendimiento del 60% cuando se compara el peso de HA seco con el del peso fermentado y en las muestras se obtiene un peso molecular cercano a 1000 kDa el cual puede medirse utilizando un detector de dispersión de luz láser de múltiples ángulos y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [44]

### ***5.1.2 Purificación de HA por tratamiento con ácido tricloroacético, carbón activado y centrifugación***

Con este proceso se busca eliminar los ácidos nucleicos y las proteínas derivadas de bacterias presentes en el caldo de fermentación. Este método permite caracterizar el HA purificado mediante la técnica de espectroscopía de infrarrojo FTIR explicada en el capítulo 3.

Inicialmente, el caldo debe ser precipitado con alcohol isopropílico en una relación 1:3 v/v, después de la precipitación el caldo se disuelve en una solución de cloruro de sodio 0.15 M con la

finalidad de reducir la viscosidad y concentración de HA [45]. Luego se debe reducir el pH del caldo hasta un valor aproximado de 2 para eliminar los ácidos nucleicos y las proteínas de las bacterias aún presentes, para lo cual se adiciona ácido tricloroacético al 0.1% y posteriormente la solución pasa a un tratamiento con carbón vegetal [45]

Antes de filtrar la muestra, se debe realizar una centrifugación a 7000 rpm durante 30 minutos a 4°C, para después pasar el caldo a través de filtros de 0.45µm. La solución filtrada se diluye cinco veces y se purifica mediante ultrafiltración en modo de diafiltración empleando un cassette de corte de 300 kDa y finalmente la muestra que contiene el HA se concentra al volumen original (un litro y se precipita con alcohol isopropílico 1:3) [45] Este paso es importante porque el alcohol isopropílico elimina cualquier residuo de endotoxinas que quedan de la etapa de fermentación y purificación. El retenido que contiene HA se concentra a la mitad del volumen original con una recuperación del 72.2% y una pureza hasta del 99.2% libre de ADN y proteínas [45]. A continuación, se muestra una tabla que relaciona los valores aproximados antes y después de la purificación tanto del ácido hialurónico como de las proteínas presentes en el caldo.

**Tabla 17.**

*Resultados de la eliminación de proteínas del caldo de fermentación con ácido tricloroacético*

	<b>ANTES DE LA PURIFICACIÓN</b>	<b>DESPUÉS DE LA PURIFICACIÓN</b>
<b>HA (g/L)</b>	2.320 ± 0.091	1.675 ± 0.075
<b>OD (260)</b>	3.800 ± 0.060	0.032 ± 0.008
<b>PROTEÍNAS (mg/mL)</b>	356.00 ± 1.701	1.181 ± 0.142

**Nota.** La tabla muestra los resultados después de precipitar el caldo de fermentación con alcohol isopropílico y suspendido en cloruro de sodio para el posterior tratamiento con carbón activado, centrifugación y filtración. Tomado de: K. J. Reddy and K. T. Karunakaran, “Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain 3523-7,” vol. 2, no. 3, pp. 173–179, Jan. 2013 [Online]. Disponible: <https://doaj.org/article/0e6c3e5772d345e29a3b9954a4b4975a>. [Acceso: oct.24 ,2021].

Como se mencionó anteriormente, con este proceso se logra una pureza del 99.2% de HA, la calidad de este producto obtenido cumpliría con las especificaciones de la Farmacopea Británica (BP) para uso médico, la cual es oficialmente aceptada en Colombia según el artículo 22 del Decreto 677 de 1995 [104]. El HA obtenido es libre de ADN y de grado médico con un peso molecular de 25.000 kDa [45]

### 5.1.3 Purificación de HA por precipitación con solventes orgánicos y filtración tangencial

Las proteínas contenidas en el caldo de fermentación son las principales fuente de impurezas en la producción de ácido hialurónico por vía microbiana, por lo tanto se emplea un proceso de precipitación que por su eficacia asegura la eliminación de proteínas y otros contaminantes [46]. El principio de implementar solventes orgánicos se basa en que estos promueven la deshidratación y reducen la constante dieléctrica del medio, provocando un aumento de las interacciones electrostáticas lo que conduce a la segregación intra e intermolecular [47], para este método se emplean solventes como etanol, metanol, acetona y propanol, sin embargo, es preferible el uso de etanol y propanol porque presentan menor grado de toxicidad en comparación al metanol y la acetona. [46]. La siguiente figura ilustra el efecto que tienen los solventes orgánicos en la precipitación de HA con presencia de proteínas

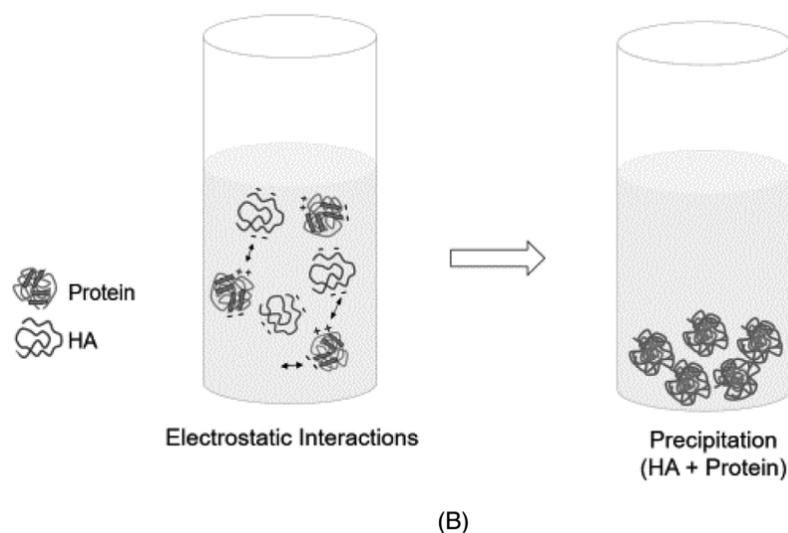
**Figura 22.**

*Efecto de los solventes orgánicos sobre la precipitación de HA*



(A)

**Figura 22. Continuación**



**Nota.** La figura muestra los efectos de los solventes orgánicos en la precipitación de ácido hialurónico, en la parte A) se observa la deshidratación de HA y en la parte B) Se representan las interacciones electrostáticas con las proteínas debido a la disminución de la constante dieléctrica. Tomado de A. D. D. Cavalcanti, B. A. G. de Melo, B. A. M. Ferreira, and M. H. A. Santana, “Performance of the main downstream operations on hyaluronic acid purification,” vol. 99, pp. 160–170, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.procbio.2020.08.020. [Online]. Disponible: <https://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.020>. [Acceso: oct.29 ,2021].

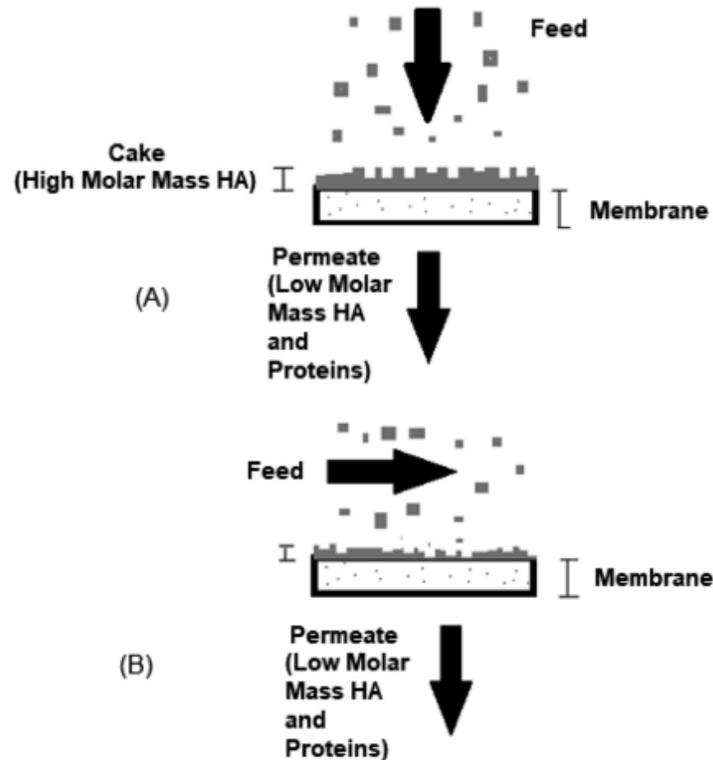
En el caso de la purificación del ácido hialurónico obtenido por fermentación microbiana se utiliza más comúnmente el etanol como solvente orgánico debido a su bajo costo comparado con otros alcoholes y cetonas. Empleando una proporción 2:1 v/v a pH 4 en la precipitación se puede obtener una pureza del 55% y una recuperación del 85% de HA [46] lo que nos permite inferir que este primer paso es significativo en la secuencia de purificación.

Después se realiza un proceso de filtración, el cual consiste en retener las partículas según su tamaño en una membrana porosa, sin embargo, el ensuciamiento de esta membrana es una limitación en el proceso por la obstrucción de los poros a medida que transcurre el tiempo y en consecuencia aumenta la resistencia al flujo y la caída de presión [46]. Por este motivo, se lleva a cabo una filtración tangencial, y como su nombre lo indica el flujo va en dirección tangencial a la

membrana evitando la obstrucción de los poros, a continuación se muestra un esquema donde se observa la diferencia entre un flujo perpendicular y un flujo tangencial a la membrana.

**Figura 23.**

*Ilustración de los tipos de filtración a través de la membrana*



**Nota.** La figura muestra los efectos de los solventes orgánicos en la precipitación de ácido hialurónico, en la parte A) se observa la deshidratación de HA y en la parte B) Se representan las interacciones electrostáticas con las proteínas debido a la disminución de la constante dieléctrica. Tomado de A. D. D. Cavalcanti, B. A. G. de Melo, B. A. M. Ferreira, and M. H. A. Santana, “Performance of the main downstream operations on hyaluronic acid purification,” vol. 99, pp. 160–170, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.procbio.2020.08.020. [Online]. Disponible: <https://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.020>. [Acceso: oct.29 ,2021].

En este paso se realiza una diafiltración, donde el retenido se recircula continuamente mientras se agrega agua a la alimentación para reemplazar el líquido permeado perdido. Esta técnica evita la sobreconcentración y el ensuciamiento de la membrana aumentando la eficiencia de la purificación

[46]. Para la purificación de HA se emplean membranas de fluoruro de polivinilideno con cortes de 0.2 y 0.45 $\mu$ m, con este proceso se logra una pureza del 90% y un rendimiento de recuperación de aproximadamente 90% con siete diavolúmenes [46].

#### ***5.1.4 Purificación de HA por microperlas impresas con DGA (D-ácido glucurónico)***

Teniendo en cuenta que el ácido hialurónico está formado por unidades repetitivas de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina, se pueden emplear microperlas impresas con ácido glucurónico para la purificación del HA a partir de cultivos celulares, estas microperlas se sintetizan mediante un proceso convencional de polimerización en suspensión [48].

La impresión molecular es un método para crear sitios de unión selectivos en polímeros sintéticos utilizando una plantilla molecular, en este caso el ácido glucurónico, y se crean polímeros reticulados más selectivos, dicha selectividad depende de diversos factores ya sea el tamaño, la forma de la cavidad o las interacciones de unión [48]. Los grupos hidroxilos que se encuentran en la estructura del DGA interactúan con los iones metálicos y se crea una interacción metal-quelato [49]

Para la purificación del medio de fermentación que contiene HA, se debe añadir al cultivo al menos 0.01% de dodecilsulfato de sodio (SDS) para liberar HA de las células. Después de 15 minutos el cultivo que contiene SDS se titula para la formación de flóculos después de la adición de cantidades variables de una solución al 10% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio [48]. El precipitado que se obtiene se solubiliza en CaCl<sub>2</sub> 2M de 1/10 a 1/20 del volumen original, esta solución resultante se centrifuga y se recoge el sobrenadante que contiene el HA. Las partículas impresas con DGA se tratan con 10 ml de solución sobrenadante durante 2 h mediante agitación magnética a 150 rpm, después las partículas se centrifugan y se lavan para eliminar las moléculas no unidas y la cantidad de HA adsorbido en las partículas impresas se determina midiendo la concentración inicial y final de HA dentro del medio de adsorción. Las partículas impresas con DGA se deben colocar en el medio de desorción y llevar a cabo un proceso de agitación durante 2 horas a 25°C a 600 rpm, la desorción de HA se debe realizar con microperlas con NaOH 1M, este proceso puede ser repetitivo para conseguir mayor recuperación de HA, sin embargo, se debe tener en cuenta que la capacidad de adsorción de las microperlas se reduce en un 11% después de 10 ciclos de adsorción-desorción [48]

### ***5.1.5 Purificación de HA mediante cloruro de sodio y cloruro de hexadecilpiridinio monohidrato***

En este proceso, el cultivo microbiano obtenido se debe llevar a un proceso de centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos, esto se hace con el fin de eliminar el contenido de *Streptococcus zooepidemicus* en el caldo de fermentación y al sobrenadante que se obtiene se le agrega el doble de su volumen de etanol [50] como se mencionó anteriormente, este solvente permite la precipitación del ácido hialurónico en el medio, sin embargo, se debe realizar otra centrifugación a 8000 rpm y la mezcla obtenida se disuelve en una solución de NaCl 0.01M, se agita uniformemente hasta que el precipitado desaparece y se añade a la solución de cloruro de hexadecilpiridinio monohidrato al 5% [50] dado que éste compuesto funciona como bactericida se asegura la eliminación de endotoxinas o bacterias aún presentes en el medio. Para mayor purificación, el producto se redisuelve en una solución de NaCl al 10% después de la centrifugación, y se emplean diferentes volúmenes de etanol como 70, 80 y 90% a 4°C para la precipitación durante 24 horas hasta que el sólido pueda observarse [50]

Para determinar la concentración de HA obtenido se puede emplear el método de medición turbidimétrica CTAB descrito en el capítulo 3 teniendo en cuenta que la cantidad de turbidez que pueda observarse es proporcional a la cantidad de HA en el medio. El peso molecular se determina usando un viscosímetro y se realiza por triplicado, para después poder realizar un análisis de varianza unidireccional y garantizar la precisión de los datos [50] obteniendo un peso molecular aproximado de 1360 kDa.

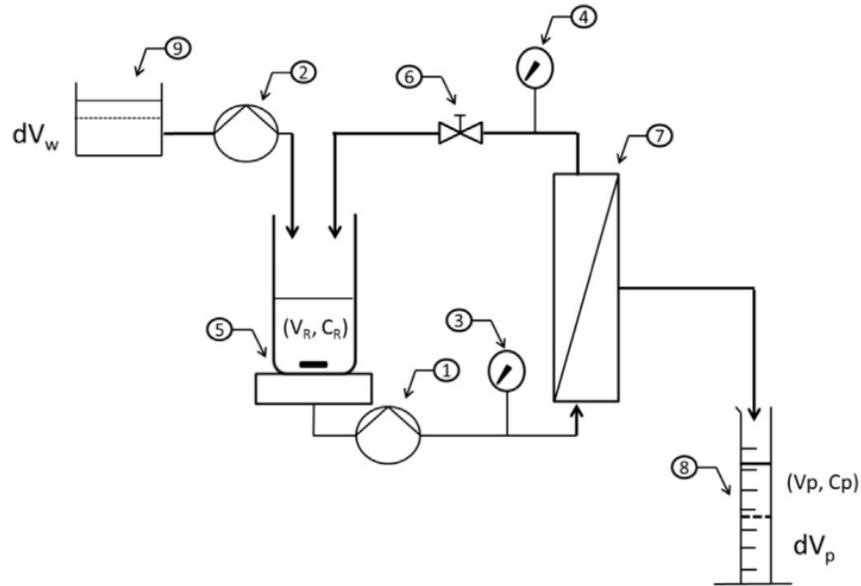
### ***5.1.6 Purificación de HA por ultrafiltración tangencial***

Este proceso se puede llevar a cabo sin disolventes y es ampliamente utilizado para la separación de microsolutos en mezclas biológicas complejas, además se pueden alcanzar un mayor nivel de pureza si este proceso se realiza en modo de diafiltración lo cual consiste en alimentar el tanque de arranque con agua desionizada [51]. La membrana que se emplea en este proceso es una membrana plana de polietersulfona (PES) con un MWCO de 100 kDa, y tanto la presión transmembranal como el caudal retenido se mantienen constantes a 2.5 bar y 36 ml/min respectivamente, teniendo en cuenta que el proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente donde

se implementan 200ml de la solución que contiene el HA y se realiza la diafiltración a volumen constante con agua desionizada, a continuación, se presenta un diagrama de proceso:

**Figura 24.**

*Diagrama de proceso del sistema de filtración por membrana*



**Nota.** La figura muestra el diagrama esquemático del sistema de filtración por membrana, donde los equipos 1 y 2 corresponden a bombas peristálticas, los equipos 3 y 4 representan manómetros, el equipo 5 es un agitador magnético, el 6 es una válvula, el 7 el módulo de membrana, el 8 corresponde al tanque de permeado y el 9 al tanque de agua. Tomado de: N. Oueslati et al., “A simple methodology for predicting the performances of hyaluronic acid purification by diafiltration,” vol. 490, pp. 152–159, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.memsci.2015.04.024. [Online]. Disponible : <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-02343235>. [Acceso: oct.30 ,2021].

Después de dos etapas de separación se obtiene un factor de purificación de 1000 asociado a un rendimiento de HA del 77% [51] y se obtienen altos pesos moleculares, además se puede emplear la técnica de caracterización con reactivo CTAB midiendo la absorbancia a 600nm.

### ***5.1.7 Purificación de HA por métodos combinados de centrifugación, precipitación, adsorción, filtración y diafiltración***

Este proceso reúne diferentes métodos establecidos para reunir las ventajas de cada uno y obtener un producto con las mejores características y pureza posible, dichos métodos se describen a continuación:

5.1.7.a Centrifugación. El caldo de fermentación que contiene el HA debe ser clarificado, para esto se diluye en agua libre de pirógenos para disminuir su viscosidad en una relación 1:1, luego se somete a un proceso de centrifugación a 9000 rpm durante 15 minutos aproximadamente y esto permite separar las células microbianas [9] y evitar la presencia de endotoxinas.

5.1.7.b Precipitación. El HA presente en el líquido clarificado se debe precipitar con la adición de solventes orgánicos, en los métodos anteriores se describe el efecto de estos solventes en la purificación de HA, por lo tanto se puede emplear etanol para la precipitación en una relación 1:1 v/v y después se lleva a cabo otra centrifugación a 9000 rpm durante 15 minutos para separar el precipitado y luego redissolver en una solución de acetato de sodio al 3% hasta el volumen original con la ayuda de un homogeneizador mecánico a 3000 rpm aproximadamente durante 10 minutos[9]

5.1.7.c Adsorción. En el método 5.1.1 se describe el efecto de emplear carbones activados para la purificación de HA, en este caso la solución homogeneizada se trata con carbón activado al 2% en modo batch durante 1 hora con una agitación de 120 rpm para obtener la adsorción de proteínas y ácidos nucleicos [9], después se debe separar el carbón activado con impurezas de solución de hialuronato por medio de una centrifugación a 9000 rpm durante 10 minutos.

5.1.7.d Filtración. La solución obtenida pasa por un proceso de filtración para remover parte de la proteína remanente por adsorción, esta solución se diluye en agua libre de pirógenos en una relación 1:1 v/v para reducir su concentración y viscosidad [9] como se explicó en el método 5.1.1 esta filtración depende del tamaño de partícula, por ende se emplean filtros con tamaño de poro de 0.45 $\mu$ m donde se remueven restos celulares y proteínas.

5.1.7.e Diafiltración. Para obtener una mayor pureza se realiza una ultrafiltración en modo de diafiltración, esto se lleva a cabo a volumen constante adicionando agua libre de pirógenos a la solución que contiene HA a medida que esta se hace circular en flujo cruzado con una membrana de PES, la adición de solvente se realiza a la misma velocidad a la que fluye el permeado con las impurezas y la presión de entrada de flujo cruzado puede mantenerse entre 0.5 a 1.5 bar [9], al finalizar esta filtración se recogen por separado el permeado que se descarta y el retenido que contiene el HA, esta solución se concentra nuevamente con isopropanol, se centrifuga y se seca.

Este proceso tiene un rendimiento de HA del 73% y se obtienen elevados pesos moleculares [9]

## **5.2 Determinación del método de purificación de HA**

Para poder establecer un método de purificación acorde al proceso se debe tener en cuenta el tipo de ácido hialurónico que se desea obtener, sus características, el nivel de pureza y la aplicación que se le dará, bien puede ser a nivel de cosmetología, medicina, farmacéutica, entre otros. A continuación se describirán las principales propiedades del ácido hialurónico y posteriormente los tipos de HA que se conseguirían después del proceso de purificación según su estructura, peso molecular y usos respectivos.

### ***5.2.1 Propiedades del ácido hialurónico***

Como se ha mencionado anteriormente, el ácido hialurónico es un polímero natural compuesto por unidades repetitivas de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico, este polímero posee gran importancia en funciones estructurales, fisiológicas y biológicas [ gracias a una combinación de propiedades que lo caracterizan [9]

5.2.1.a Alta higroscopicidad. Hace referencia a la capacidad de este polímero para retener agua por su naturaleza hidrófila y debido a los grupos carboxilos presentes en su estructura se comporta como un polielectrolito[9]

5.2.1.b Naturaleza viscoelástica. Este polímero reúne las características de la elasticidad de un gel y la viscosidad de un fluido, por lo que las soluciones de HA pueden comportarse como un material pseudoplástico donde su viscosidad disminuye al aumentar el esfuerzo de corte pero esta se

incrementa con el aumento del peso molecular del polímero debido al entrecruzamiento en su molécula [9]

5.2.1.c No presenta inmunogenicidad. Todas las moléculas de HA poseen la misma estructura tanto en los tejidos como en todas sus especies, por lo que no altera el sistema inmunológico [9]

5.2.1.d Degradación en productos seguros. Este polímero es degradado in vivo a través de hidrólisis catalizada por enzimas hialuronidasas, por lo tanto se obtienen productos seguros que no presentan alto nivel de toxicidad [9]

### ***5.2.2 Tipos de ácido hialurónico***

Actualmente existen tres formulaciones comerciales de ácido hialurónico, donde cada una de ellas tiene aplicaciones específicas debido a la modificación y mejora de sus propiedades

5.2.2.a Ácido hialurónico lineal. Es la forma natural en la que se presenta el ácido hialurónico, su principal aplicación es en la industria cosmética donde se aprovecha su naturaleza hidrofílica para ser empleado como hidratante.

Los productos que contienen este tipo de HA ayudan no sólo a hidratar la piel, sino que también a restaurar la elasticidad disminuyendo la profundidad de las arrugas[9]. En medicina estética se inyecta este tipo de HA en pequeñas dosis para restaurar la piel y darle un aspecto saludable, además favorece la curación de irritaciones o lesiones en la piel porque provee un efecto cicatrizante [9]. La degradación in vivo también es más rápida gracias a las enzimas hialuronidasas y el tiempo de residencia en la piel es aproximadamente de 24 horas, una ilustración del HA lineal se muestra a continuación.

**Figura 25.**

*Representación de la forma lineal del HA*

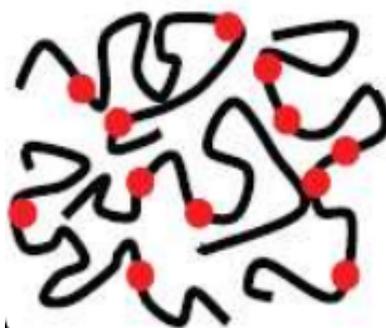


**Nota.** La figura muestra la representación de un HA con estructura lineal el cual tiene pocas propiedades mecánicas. Tomado de: M. Allasia , P. Sarmiento. “Producción de ácido hialurónico por fermentación microbiana”. Trabajo de grado, Universidad Tecnológica Nacional, Buenos aires, Argentina, 2016. Disponible: <https://n9.cl/v157q> [Acceso: nov.1 ,2021].

5.2.2.b Ácido hialurónico derivatizado. En esta forma de HA se modifica la cadena lineal con el fin de hacerlo menos susceptible a la hidrólisis química y enzimática, obteniendo como resultado una mejoría en las propiedades mecánicas [9]. Generalmente se emplea más en ingeniería médica para la reparación de tejidos y regeneración de nervios y cartílagos, dentro de los derivados del HA se encuentra el éster bencílico de hialuronano, el cual se presenta en forma de gasas para la regeneración de tejidos, a continuación se muestra una representación de la estructura de HA derivatizado

**Figura 26.**

*Representación de la forma derivatizada del HA*



**Nota.** La figura muestra la representación de un HA derivatizado el cual es menos susceptible a la degradación enzimática. Tomado de: M. Allasia , P. Sarmiento. “Producción de ácido hialurónico por fermentación microbiana”. Trabajo de grado, Universidad Tecnológica Nacional, Buenos aires, Argentina, 2016. Disponible: <https://n9.cl/v157q> [Acceso: nov.1 ,2021].

5.2.2.c **Ácido hialurónico reticulado.** En esta estructura se forman enlaces covalentes entre las cadenas de HA para obtener redes de HA tridimensionales, este tipo de HA generalmente se aplica en forma de inyecciones intradérmicas, las cuales están compuestas por partículas micrométricas de ácido hialurónico reticulado que se encuentra en suspensión en una solución fisiológica [9], sin embargo, en ocasiones también contienen HA lineal para facilitar la capacidad de inyección. Los productos que contienen este tipo de HA se diferencian en el mercado porque tienen mayor concentración de HA, el agente de reticulación, el tamaño de la partícula y la cantidad de HA soluble presente en la formulación [9]

**Figura 27.**

*Representación de la forma reticulada del HA*



**Nota.** La figura muestra la representación de un HA reticulado el cual tiene un prolongado tiempo de residencia in vivo, desde unos meses hasta un año y posee mejores propiedades mecánicas. Tomado de: M. Allasia , P. Sarmiento. “Producción de ácido hialurónico por fermentación microbiana”. Trabajo de grado, Universidad Tecnológica Nacional, Buenos aires, Argentina, 2016. Disponible: <https://n9.cl/v157q> [Acceso: nov.1 ,2021].

### **5.2.3 *Peso molecular del ácido hialurónico***

Otro factor importante para determinar el mejor método de purificación es el peso molecular del HA producido, puesto que entre mayor peso molecular tenga el compuesto también se incrementa su viscosidad, y como se explicó anteriormente esta es una de las propiedades más significativas del ácido hialurónico y una de las que más influye en sus aplicaciones.

Una de las ventajas del proceso de obtención de HA por fermentación es que las células microbianas pueden ser adaptadas fisiológica o metabólicamente para producir mayor cantidad de HA con altos pesos moleculares [9]. Este parámetro es el que más afecta las propiedades físicas de los productos que contienen HA, y las condiciones del proceso están estrictamente relacionadas con la variación del peso molecular del polímero, por ejemplo los factores como la temperatura, aireación y concentración inicial de sustrato influyen sobre el PM, mientras que el pH o la agitación no lo hacen, generalmente cuando el cultivo está a bajas temperaturas en presencia de aireación y altas concentraciones de sustrato se obtiene un PM alto [9]. Esta variación del peso molecular se debe a la variación en la longitud de la cadena de hialuronano, lo cual depende del método de obtención y purificación.

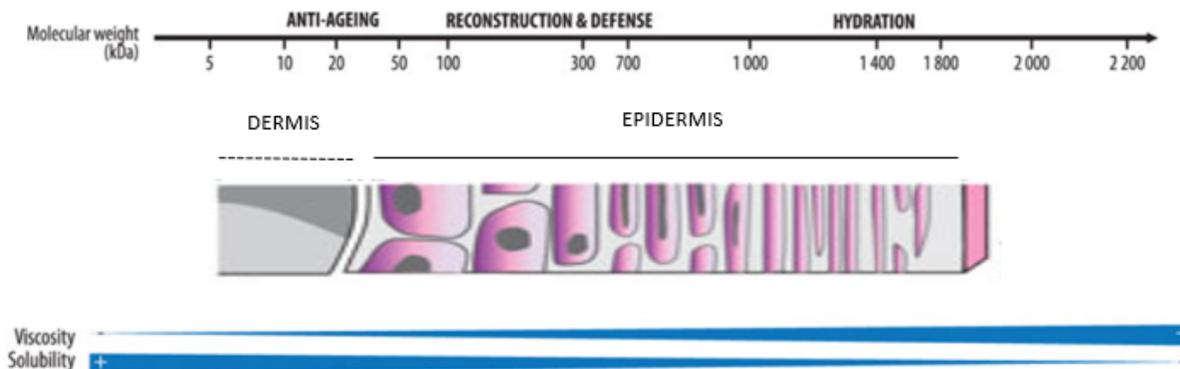
5.2.3.a Características del ácido hialurónico de alto peso molecular. Es utilizado para fabricar diferentes cosméticos, su función es proteger la capa más externa de la piel porque no llega a penetrarla [52], tiene una masa molar promedio de 2000000 Dalton, a modo de comparación el agua tiene una masa molar de 18 [53]. El HA de alto peso molecular interviene en la retención de agua, por lo tanto se emplea en productos altamente hidratantes y como se mencionó anteriormente, por su peso molecular sólo actúa a nivel de la epidermis [54]

5.2.3.b Características del ácido hialurónico de bajo peso molecular. Este ácido es capaz de penetrar la piel de forma más profunda por el menor tamaño que posee, usualmente es inyectado para fines estéticos [52], su masa molar promedio es de aproximadamente de 20000 hasta 50000 Dalton [53]. El HA de bajo peso molecular potencia las actividades biológicas y por su tamaño es capaz de llegar a la dermis [54]

A continuación se muestra un esquema que representa la relación del peso molecular con el efecto de penetración en la piel, teniendo en cuenta la relación entre el peso molecular, la viscosidad y la solubilidad.

**Figura 28.**

*Actividad en la piel del ácido hialurónico en función de su peso molecular*



**Nota.** La figura muestra la relación entre el peso molecular del ácido hialurónico y la penetración de este en la piel, además se muestra la relación entre el peso molecular, la viscosidad y la solubilidad. Tomado de P. Espitia, “Ácido hialurónico: Influencia del peso molecular en las funciones fisiológicas de la piel”,2020. Disponible: <https://www.perfumeriamoderna.com/expresion-id/acido-hialuronico-influencia-peso-molecular-funciones-fisiologicas-piel/>[Acceso: nov.1 ,2021].

#### **5.2.4 Selección del método según las características del HA deseado**

Se define que el propósito es obtener ácido hialurónico lineal de alto peso molecular donde se aprovechen sus cualidades hidratantes y naturaleza hidrofílica para aplicaciones a nivel de cosmetología, por ende se debe seleccionar un método de purificación que nos asegure que el producto final cumpla con las características deseadas.

Teniendo en cuenta que el sustrato empleado es suero de leche y su principal fuente de carbono es la lactosa se puede obtener HA de alto peso molecular como se explica en el capítulo 4, sin embargo, el método de purificación define la calidad y la pureza del producto final. Según la descripción de cada uno de los métodos propuestos en este capítulo se llevará a cabo una secuencia combinada de técnicas para conseguir la purificación; centrifugación, precipitación, adsorción, filtración y diafiltración. Basándose en la descripción de este método en el numeral 5.1.7 a

continuación se muestran las ventajas y desventajas de este proceso y las características del producto final obtenido:

**Tabla 18.**

*Ventajas y desventajas del método de purificación*

MÉTODO DE PURIFICACIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Purificación de HA por métodos combinados de centrifugación, precipitación, adsorción, filtración y diafiltración.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. No emplea detergentes o surfactantes como agentes precipitantes</li> <li>2. No se emplean condiciones ácidas de pH</li> <li>3. La remoción de proteínas no requiere químicos peligrosos</li> <li>4. Se emplean diluciones menores</li> <li>5. Los solventes empleados no son de alto costo</li> <li>6. Por combinar distintos métodos se puede alcanzar mayor pureza de HA</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se requieren varias etapas para la purificación</li> <li>2. Para obtener alto peso molecular en el proceso de diafiltración se necesitan volúmenes mayores de solvente orgánico</li> </ol>
<b>CARACTERÍSTICAS FINALES DEL HA</b>	Se obtiene ácido hialurónico de alto peso molecular con una pureza del 99.7% y un rendimiento del 73% y puede ser empleado para aplicaciones cosméticas	

**Nota.** La tabla muestra las ventajas y desventajas de la purificación de HA por métodos combinados de centrifugación, precipitación, adsorción, filtración y diafiltración, dando a conocer el peso molecular del HA obtenido. Tomado de: M. Allasia , P. Sarmiento. “Producción de ácido hialurónico por fermentación microbiana”. Trabajo de grado, Universidad Tecnológica Nacional, Buenos aires, Argentina, 2016. Disponible: <https://n9.cl/v157q> [Acceso: nov.1 ,2021].

Como se ha descrito anteriormente, después del proceso de diafiltración se debe realizar una centrifuga y secado, esto se hace con el fin de obtener el producto en forma granulada y que este polvo pueda ser empleado en cremas y productos cosméticos tópicos, en el **Anexo C** se describe el proceso para llevar a cabo el secado y las condiciones que se deben emplear para obtener el HA con las características mencionadas.

Finalmente se muestra una tabla donde se ven los porcentajes de recuperación HA y la remoción de proteínas en cada etapa

**Tabla 19.**

*Porcentaje de recuperación de HA en cada una de las etapas*

<b>ETAPA</b>	<b>%HA</b>	<b>%PROTEÍNAS</b>
Fermentación	100	100
Centrifugación	98	15
Adsorción	83	1.65
Filtración	78	1.5
Diafiltración	73	0.005

**Nota.** La tabla muestra el porcentaje de recuperación de HA y el porcentaje de las proteínas eliminadas en cada etapa del proceso. Tomado de: M. Allasia , P. Sarmiento. “Producción de ácido hialurónico por fermentación microbiana”. Trabajo de grado, Universidad Tecnológica Nacional, Buenos aires, Argentina, 2016. Disponible: <https://n9.cl/v157q> [Acceso: nov.1 ,2021].

### **5.3 Conclusiones**

El peso molecular del ácido hialurónico es la principal característica que influye en sus aplicaciones, ya sean cosméticas, farmacéuticas o biomédicas. Para obtener HA lineal de alto peso molecular se deben llevar a cabo métodos combinados de centrifugación, precipitación, adsorción, filtración y diafiltración, donde se consigue un rendimiento de 73% y una pureza de 99.7% para después someter el producto a un proceso de secado y molino donde se consigue un menor tamaño de partícula y el producto granular final puede ser aplicado en productos cosméticos con fines hidratantes.

## 6. CONCLUSIONES

Por medio de un análisis estadístico de referencias con artículos encontrados en la base de datos Scopus, se logran definir las condiciones óptimas de crecimiento de la bacteria *Streptococcus zooepidemicus*, garantizando que la fermentación se lleve a cabo correctamente y se obtenga el producto deseado. Por ser un microorganismo mesófilo su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, se debe mantener un pH neutro de 7, el proceso se puede llevar a cabo con una aireación de 0.5 v/v/min, se define un tiempo de 24 horas donde se debe mantener una agitación de 150 rpm para mantener la concentración de nutrientes de manera uniforme en todo el reactor. Como el proceso se realiza con un caldo de fermentación su  $A_w$  será mayor a 0.9.

Para caracterizar la bacteria se emplea una clasificación taxonómica y morfológica, donde se especifica el género, la familia, la forma y el diámetro de los *Streptococcus*. Para cuantificar el ácido hialurónico obtenido y determinar su concentración se emplean dos métodos principales, el primero es un método turbidimétrico CTAB y el segundo es una espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR), para caracterizar el HA y asegurar la presencia de éste, también se emplean dos métodos principales, el primero es una espectroscopía de infrarrojo FTIR y el segundo es una resonancia magnética nuclear de protón  $^1\text{H-NMR}$  donde por medio de un espectro se logran observar picos que corresponden a los grupos funcionales propios del HA.

Los modelos cinéticos permiten predecir el comportamiento de los microorganismos y por medio de una revisión bibliográfica se logran describir los modelos que se ajustan al crecimiento de *Streptococcus zooepidemicus* empleando diversos sustratos ricos en azúcares. Se evidencia que el modelo de Han-Levenspiel presenta un mayor ajuste  $R^2$  de 0.997, por lo tanto, se propone emplear este modelo usando como sustrato suero de leche dulce, cuya composición cumple con las necesidades metabólicas de la bacteria y se obtiene un HA de elevado peso molecular.

Para purificar el HA obtenido se emplean métodos combinados de purificación: centrifugación, precipitación, adsorción, filtración y diafiltración. Con este proceso se puede obtener una pureza del 99.7% y un rendimiento del 73%, además se obtiene ácido hialurónico con elevado peso molecular así que se somete a un proceso de secado y molienda para quietar el exceso de humedad y disminuir el tamaño de partícula para que el HA obtenido pueda ser empleado en productos cosméticos.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. Snetkov, K. Zakharova, S. Morozkina, R. Olekhovich, and M. Uspenskaya, "Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer," vol. 12, no. 8, p. 1800, Aug. 2020, doi: 10.3390/polym12081800. [Online]. Available: <https://search.proquest.com/docview/2434361052>.
- [2] J. Zhang, X. Ding, L. Yang, and Z. Kong, "A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01," vol. 72, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, p. 168, 2006.
- [3] A. B. Csoka and R. Stern, "Hypotheses on the evolution of hyaluronan: A highly ionic acid," vol. 23, no. 4, pp. 398–411, 2013, doi: 10.1093/glycob/cws218. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1093/glycob/cws218>. [Accessed: 2021].
- [4] K. J. Reddy and K. T. Karunakaran, "Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain 3523-7," vol. 2, no. 3, pp. 173–179, Jan. 2013 [Online]. Available: <https://doaj.org/article/0e6c3e5772d345e29a3b9954a4b4975a>.
- [5] P. Heldin, "Chemistry and Biology of Hyaluronan. Edited by Hari G. Garg and Charles A. Hales," vol. 6, no. 7. WILEY-VCH Verlag, Weinheim, pp. 1288–1289, 04-Jul-2005 [Online]. Available: <https://api.istex.fr/ark:/67375/WNG-88MQQMR6-G/fulltext.pdf>.
- [6] L.M Mendoza, G. Cremata, J. A. y C. Valdés, G. "Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones". Tesis doctoral en ciencias, Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, La Habana, Cuba, 2007.
- [7] C. Schiraldi, Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. IntechOpen, 2010 [Online]. Available: <https://openresearchlibrary.org/viewer/da17b9db-86eb-4489-af12-ec17a18a2994>.
- [8] E. Yatmaz and İ. Turhan , "HYALURONİK ASİT VE FERMANTASYONLA ÜRETİLMESİ", Gıda, vol. 40, no. 4, pp. 233-240, Aug. 2015.

- [9] M. Allasia , P. Sarmiento. “Producción de ácido hialurónico por fermentación microbiana”. Trabajo de grado, Universidad Tecnológica Nacional, Buenos aires, Argentina, 2016.
- [10] B. Chong, L. Blank, R. Mclaughlin, and L. Nielsen, “Microbial hyaluronic acid production,” vol. 66, no. 4, pp. 341–351, Jan. 2005, doi: 10.1007/s00253-004-1774-4. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15599518>
- [11] S. Jagannath and K. Ramachandran, “Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*,” vol. 48, no. 2, pp. 148–158, 2010, doi: 10.1016/j.bej.2009.09.003. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.09.003>
- [12] M. R. Johns, L.-T. Goh, and A. Oeggerli, “Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*,” vol. 16, no. 5, pp. 507–512, May 1994, doi: 10.1007/BF01023334.
- [13] INSST, “D DATABiO Streptococcus spp,” DATABIO, 28-12-2018 [Online]. Available: <https://www.insst.es/documents/94886/353165/Streptococcus+spp++A%C3%B1o+2019.pdf/0d0f069d-e46c-4596-a5ab-79a4221bcb30>.
- [14] Z. Ma et al., “Complete Genome Sequence of *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* Strain ATCC 35246,” vol. 193, no. 19, pp. 5583–5584, Oct. 2011, doi: 10.1128/JB.05700-11. [Online]. Available: <http://j.b.asm.org/content/193/19/5583.abstract>
- [15] C. Peñuelas “Producción y caracterización de ácido hialurónico por cultivo sumergido de *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*”. Trabajo de grado, Universidad autónoma metropolitana, Ciudad de México, 2016.
- [16] M. Madigan, J. Martinko, K. Bender, D. Buckley , D. Stahl, “*Brock Biology of Microorganisms*”. 14ava edición. Estados Unidos. 2014 , pp. 29-30.
- [17] “PROBIOTEK (Productos y Equipos Biotecnológicos S. A. de C. V.) .” [Online]. Available: <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/detergentes/ctab/>

- [18] Y.-H. Chen and Q. Wang, “Establishment of CTAB Turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth,” vol. 78, no. 1, pp. 178–181, 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.04.037. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.04.037>.
- [19] Q. Dong, H. Zang, L. Zang, A. Liu, Y. Shi, and H. Zhang, “Rapid determination of hyaluronic acid concentration in fermentation broth with near-infrared spectroscopy,” vol. 7, no. 6, pp. 1450012-1450012–7, Nov. 2014, doi: 10.1142/S1793545814500126. [Online]. Available: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S1793545814500126>.
- [20] ANDREAH, “Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).” [Online]. Available: [https://www.fisica.unam.mx/andreahtecnicas\\_equipos/ftir.html](https://www.fisica.unam.mx/andreahtecnicas_equipos/ftir.html).
- [21] S. Laurella , “*Resonancia magnética nuclear, una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares*”, Editorial de la Universidad de la Plata, Buenos Aires, Argentina. 2017, pp. 12-23.
- [22] E. Pretsch, P. Bühlmann, M Badertscher. “*Structure Determination of Organic Compounds*”, 4ta ed. Alemania, 2010, pp. 423.
- [23] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, and A. Nudelman, “NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities,” vol. 62, no. 21, pp. 7512–7515, Oct. 1997, doi: 10.1021/jo971176v. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1021/jo971176v>.
- [24] W. Park, K. sub Kim, B. Bae, Y.-H. Kim, and K. Na, “Cancer cell specific targeting of nanogels from acetylated hyaluronic acid with low molecular weight,” vol. 40, no. 4, pp. 367–375, 2010, doi: 10.1016/j.ejps.2010.04.008. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2010.04.008>.
- [25] A. Almudena, “Desarrollo de Modelos Cinéticos para bioprocesos: Aplicación a la Producción de Xantano”, Trabajo de grado, Universidad Complutense de Madrid, España, 1999.
- [26] A. E. Rodrigues and M. Minceva, “Modelling and simulation in chemical engineering: Tools for process innovation,” vol. 29, no. 6, pp. 1167–1183, May 2005, doi:

10.1016/j.compchemeng.2005.02.029. [Online]. Available:  
<https://dx.doi.org/10.1016/j.compchemeng.2005.02.029>.

- [27] L. Ljung. “System identification: Theory for the user” USA: Editorial Prentice-Hall; 1987.
- [28] M. G. Aguilar Uscanga, P. Strehaiano, M. L. Delia, and B. Escudero, “Influencia de la concentración inicial de glucosa en la producción de etanol y biomasa de *Brettanomyces bruxellensis*.”
- [29] A. Queiruga Dios and I. Visus Ruiz, Proyecto fin de carrera. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca, 2014 [Online]. Available:  
[https://ebookcentral.proquest.com/lib/\[SITE\\_ID\]/detail.action?docID&#61;3221233](https://ebookcentral.proquest.com/lib/[SITE_ID]/detail.action?docID&#61;3221233).
- [30] J. Calderón, “Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de un sustrato complejo”, Trabajo de grado, Facultad de ingeniería, Universidad de América, Bogotá Colombia, 2017.
- [31] G. C. Okpokwasili and C. O. Nweke, “Microbial growth and substrate utilization kinetics,” vol. 5, no. 4, p. 305, Dec. 2006 [Online]. Available: <http://www.bioline.org.br/abstract?id&#61;jb06050>.
- [32] W. Fujifilm, “El Impacto de las Endotoxinas en el Cuerpo Humano,” 2014. [Online]. Available:  
<https://www.wakopyrostar.com/blog-es/post/el-impacto-de-las-endotoxinas-en-el-cuerpo-humano/>
- [33] P. F. Hooker, “Benjamin Gompertz, 5 March 1779–14 July 1865,” vol. 91, no. 2, pp. 203–212, Sep. 1965, doi: 10.1017/S0020268100038786. [Online]. Available:  
<https://dx.doi.org/10.1017/S0020268100038786>.
- [34] E. Modelo De Gompertz, S. Aplicación En, S. Alimentaria, and J. C. Castro, “TFG-M-N520.”
- [35] K. Han and O. Levenspiel, “Extended monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition,” vol. 32, no. 4, pp. 430–447, Aug. 1988, doi: 10.1002/bit.260320404. [Online]. Available:  
<https://api.istex.fr/ark:/67375/WNG-DL5XLBZF-2/fulltext.pdf>

- [36] J. F. Andrews, “A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates,” vol. 10, no. 6, pp. 707–723, Nov. 1968, doi: 10.1002/bit.260100602. [Online]. Available: <https://api.istex.fr/ark:/67375/WNG-NH9GTKK8-Z/fulltext.pdf>.
- [37] T. Jacques, “Luedeking-Piret Related Method for Enhancement of Butyrate Production by a Crabtree-positive-like Bacterial Consortium Cultivated in a Chemostat” University of Brussels, Belgium, 2015.
- [38] M. tag blog, “Análisis de Regresión: ¿Cómo Puedo Interpretar el R-cuadrado y Evaluar la Bondad de Ajuste?,” 2019. [Online]. Available: <https://blog.minitab.com/es/analisis-de-regresion-como-puedo-interpretar-el-r-cuadrado-y-evaluar-la-bondad-de-ajuste>.
- [39] M. M. Don and N. F. Shoparwe, “Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose” vol. 49, no. 1, pp. 95–103, 2010, doi: 10.1016/j.bej.2009.12.001. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.001>
- [40] M. Hernández-Rojas and J. F. Vélez-Ruíz, “Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales.”.
- [41] S. Cordon, J. Pérez. “Ajuste de un modelo matemático para el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* en 2 sustratos para la producción de ácido hialurónico a escala de laboratorio”, Trabajo de grado, Facultad de ingenierías, Universidad de América, Bogotá Colombia, 2016.
- [42] E. Poveda E, “Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad,” vol. 40, no. 4. Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología, pp. 397–403, 01-Dec-2013 [Online]. Available: [https://explore.openaire.eu/search/publication?articleId&#61;od\\_\\_\\_\\_\\_3056::a6ca7bae897f8c49ffa75b3f290fe2b8](https://explore.openaire.eu/search/publication?articleId&#61;od_____3056::a6ca7bae897f8c49ffa75b3f290fe2b8).
- [43] V. Rangaswamy and D. Jain, “An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*,” vol. 30, no. 3, pp. 493–496, Oct. 2007, doi: 10.1007/s10529-007-9562-8. [Online]. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-007-9562-8>.

- [44] S. Choi, W. Choi, S. Kim, S.-Y. Lee, I. Noh, and C.-W. Kim, “Purification and biocompatibility of fermented hyaluronic acid for its applications to biomaterials,” vol. 18, no. 1, p. 6, 2014, doi: 10.1186/2055-7124-18-6. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26331057>.
- [45] K. J. Reddy and K. T. Karunakaran, “Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain 3523-7,” vol. 2, no. 3, pp. 173–179, Jan. 2013 [Online]. Available: <https://doaj.org/article/0e6c3e5772d345e29a3b9954a4b4975a>.
- [46] A. D. D. Cavalcanti, B. A. G. de Melo, B. A. M. Ferreira, and M. H. A. Santana, “Performance of the main downstream operations on hyaluronic acid purification,” vol. 99, pp. 160–170, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.procbio.2020.08.020. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.020>.
- [47] R. K. Scopes, “Protein Purification”, 2<sup>a</sup> ed., Springer-verlag New York Inc, Nueva York, 1988, págs. 41–71.
- [48] H. A. Akdamar, N. Y. Sariözlü, A. A. Özcan, A. Ersöz, A. Denizli, and R. Say, “Separation and purification of hyaluronic acid by glucuronic acid imprinted microbeads,” vol. 29, no. 4, pp. 1404–1408, 2009, doi: 10.1016/j.msec.2008.10.038. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.038>.
- [49] A. Denizli, B. Garipcan, A. Karabakan, R. Say, S. Emir, S. Patır, septiembre Purif. Technol. 30 (2003) 3
- [50] J. Wang, W. He, T. Wang, M. Li, and X. Li, “Sucrose-modified iron nanoparticles for highly efficient microbial production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*,” vol. 205, p. 111854, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111854. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111854>.
- [51] N. Oueslati et al., “A simple methodology for predicting the performances of hyaluronic acid purification by diafiltration,” vol. 490, pp. 152–159, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.memsci.2015.04.024. [Online]. Available: <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-02343235>.

- [52] Fisiovigo, “Diferencias entre el ácido hialurónico de alto y bajo peso molecular,” 2020. [Online]. Available: [https://www.fisiovigo.es/diferencias-entre-el-acido-hialuronico-de-alto-y-bajo-peso-molecular\\_fb32967.html](https://www.fisiovigo.es/diferencias-entre-el-acido-hialuronico-de-alto-y-bajo-peso-molecular_fb32967.html).
- [53] T. I. A. for A. Corneotherapy, “El ácido hialurónico,” 2020. [Online]. Available: <https://dermaviduals.es/acido-hialuronico-de-alto-y-bajo-peso-molecular-acido-hialuronano-nag/>.
- [54] P. Espitia, “Ácido hialurónico: Influencia del peso molecular en las funciones fisiológicas de la piel”,2020. [Online]. Available: <https://www.perfumeriamoderna.com/expresion-id/acido-hialuronico-influencia-peso-molecular-funciones-fisiologicas-piel/>.
- [55] D. Becton, “Patrón de turbidez BBL preparado Mcfarland turbidity standard0.5”, 2005 [Online]. Available: [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421\(0205\)\\_es.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421(0205)_es.pdf).
- [56] P. M. Doran, “Bioprocess Engineering Principles,” vol. 1, pp. 265–289, Jan. 1994 [Online]. Available: [http://site.iugaza.edu.ps/mwhindi/files/ebooksclub.org\\_\\_Bioprocess\\_Engineering\\_Principles.pdf](http://site.iugaza.edu.ps/mwhindi/files/ebooksclub.org__Bioprocess_Engineering_Principles.pdf)
- [57] R. S. Ghodke, J. P. Kakati, S. R. Reddy, N. Mohan y S. Sivaprakasam, “Modelado cinético de la producción de ácido hialurónico en un medio basado en palma de palma (*Borassus flabellifer*) por *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523,” 2018, doi: :<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.011> [Online] Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X18301943?via%3Dihub>
- [58] J. A. Vázquez, L. Pastrana, C. Piñeiro, J. A. Teixeira, R. Pérez and I. R. Amado, “Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* on Protein Substrates Obtained from *Scyllorhinus canicula* Discards” 2015 doi:10.3390/md13106537 [Online] Available: <https://www.mdpi.com/1660-3397/13/10/6537>
- [59] N. Mohan, S. R. Reddy, S. S. Pavan and S. Sivaprakasam, “ Deciphering the role of dissolved oxygen and N-acetyl glucosamine in governing higher molecular weight hyaluronic acid synthesis in *Streptococcus zooepidemicus* cell factory”, 2019 Applied Microbiology and Biotechnology doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10445-x> [Online] Available: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-020-10445-x>

- [60] J. A. Vázquez, M. I. Montemayor, J. Fraguas and M. A. Murado, “*Hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera” 2010, [Online] Available: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-9-46>
- [61] S. Chen, J. Chen, W. Huang and H. Chen, “Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920” 2009, [Online] Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11814-009-0072-3>
- [62] N. F. Shoparware, W. S. Kew, M. Mohamad, N. Ameram and M. M. Zaini, “ Optimization And Kinetic Analysis On The Production Of Hyaluronic Acid By *Streptococcus zooepidemicus* In A Batch System” 2020, doi:10.1088/1755-1315/596/1/012046 [Online] Available: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/596/1/012046>
- [63] Z. Lai, R. A. Rahim, A. B. Ariff and R. Mohamad, “Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using oxygen vector and optimum impeller tip speed” vol. 114. no. 4 pp. 286-291, 2011, doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.04.011 [Online] Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22608992/>
- [64] L. Liu, G. Du, J. Chen, M. Wang and J. Sun “Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*” 2008 doi: 10.1016/j.biortech.2008.02.035. [Online] Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18397825/>
- [65] D. A. Flores, J. R. Ramos, G. Toriz, E. Arriola, G. Guatemala and R. I. Corona, “Bored Coffee Beans for Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus*” 2021, doi://doi.org/10.3390/fermentation7030121 [Online] Available: <https://www.mdpi.com/2311-5637/7/3/121>
- [66] Z. Lai, R.A. Rahim, A. Ariff and R. Mohamad, “Medium formulation and impeller design on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920” vol. 5, pp. 2114-2123, 2011, doi: 10.5897/AJMR11.305 [Online] Available: [https://www.researchgate.net/publication/279904132\\_Medium\\_formulation\\_and\\_impeller\\_design](https://www.researchgate.net/publication/279904132_Medium_formulation_and_impeller_design)

on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920

- [67] J. Sheng et al., “Use of induction promoters to regulate hyaluronan synthase and UDP-glucose-6-dehydrogenase of *Streptococcus zooepidemicus* expression in *Lactococcus lactis*: a case study of the regulation mechanism of hyaluronic acid polymer,” vol. 107, no. 1, pp. 136–144, Jul. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04185.x.
- [68] L. Serna Cock and C. E. Enriquez Valencia, “Actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* y sus metabolitos frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*,” vol. 15, no. 2, pp. 63–69, Dec. 2013, doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.34979.
- [69] N. F. Shoparwe, W. S. Kew, M. Mohamad, N. Ameram, and M. M. Zaini Makhtar, “Optimization And Kinetic Analysis On The Production Of Hyaluronic Acid By *Streptococcus Zooepidemicus* In A Batch System,” vol. 596, no. 1, p. 12046, Dec. 2020, doi: 10.1088/1755-1315/596/1/012046. [Online]. Available: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/596/1/012046>.
- [70] I. R. Amado, J. A. Vázquez, L. Pastrana, and J. A. Teixeira, “Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*,” vol. 198, pp. 54–61, May 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.062. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.062>.
- [71] S. Hernández, G. Morales, . Mendoza et al., “Método de aislamiento de bacterias con potencial para producir ácido hialurónico.” .
- [72] C. Saraiva, M. Helena, A. Santana, and Sc, “Universidade estadual de campinas faculdade de engenharia química área de concentração desenvolvimento de processos biotecnológicos produção de ácido hialurônico por *Streptococcus*: Estudo da Fermentação e Caracterização do Produto”.
- [73] M. Fin, “Da Zara alla British Library: il curioso viaggio del Vocabolario dei tre nobilissimi linguaggi di Ivan Tanzlingher Zanotti,” vol. 2019, no. Speciale, pp. 83–94, 2019, doi: 10.18485/italbg.2019.ns\_zogovic.6.

- [74] N. Pourzardosht and M. J. Rasaee, “Improved Yield of High Molecular Weight Hyaluronic Acid Production in a Stable Strain of *Streptococcus zooepidemicus* via the Elimination of the Hyaluronidase-Encoding Gene,” vol. 59, no. 6, pp. 192–199, May 2017, doi: 10.1007/s12033-017-0005-z. [Online]. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12033-017-0005-z>.
- [75] A. Zakeri, M. J. Rasaee, and N. Pourzardosht, “Enhanced hyaluronic acid production in *Streptococcus zooepidemicus* by over expressing HasA and molecular weight control with Niscin and glucose,” vol. 16, pp. 65–70, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.btre.2017.02.007. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2017.02.007>.
- [76] N. C. Pan, J. A. Vignoli, C. Baldo, H. C. B. Pereira, R. S. D. S. F. Silva, and M. A. P. C. Celligoi, “Effect of fermentation conditions on the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920,” vol. 37, no. 4, pp. 411–417, Oct. 2015, doi: 10.4025/actasciobiolsci.v37i4.28176. [Online]. Available: <https://search.proquest.com/docview/1807327119>.
- [77] L. J. Benedini and M. H. A. Santana, “Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid,” vol. 130, pp. 798–800, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.161. [Online]. Available: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.161>.
- [78] X. Zhang, M. Wang, T. Li, L. Fu, W. Cao, and H. Liu, “Construction of efficient *Streptococcus zooepidemicus* strains for hyaluronic acid production based on identification of key genes involved in sucrose metabolism,” vol. 6, no. 1, pp. 1–9, Nov. 2016, doi: 10.1186/s13568-016-0296-7. [Online]. Available: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13568-016-0296-7>.
- [79] L. Liu, M. Wang, G. Du, and J. Chen, “Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy,” vol. 46, no. 3, pp. 383–388, Mar. 2008, doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02325.x. [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1472-765X.2008.02325.x>.
- [80] J. Zhang, X. Ding, L. Yang, and Z. Kong, “A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01,” vol. 72, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, p. 168, 2005.

- [81] X. Sun, D. Yang, Y. Wang, H. Geng, X. He, and H. Liu, “Development of a markerless gene deletion system for *Streptococcus zooepidemicus*: functional characterization of hyaluronan synthase gene,” vol. 97, no. 19, pp. 8629–8636, Jun. 2013, doi: 10.1007/s00253-013-5058-8. [Online]. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-013-5058-8>.
- [82] N. C. Pan, G. Biz, C. Baldo, and M. A. P. C. Celligoi, “Factorial design in fermentation medium development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*,” vol. 42, p. e42729, Oct. 2019, doi: 10.4025/actascitechnol.v42i1.42729. [Online]. Available: <https://search.proquest.com/docview/2439588712>.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1.

### COLORACIÓN DE GRAM

Por medio de este método se va realizar la caracterización del microorganismo con el fin de determinar la cantidad de peptidoglucano que contiene la pared celular, según la coloración obtenida se puede clasificar como gram positiva o gram negativa.

Procedimiento:

- Tomar una gota de agua con una punta azul previamente esterilizada y extenderla por todo el portaobjeto.
- Tomar el asa y someterla a una llama para garantizar condiciones asépticas en el proceso.
- Realizar un frotis con el asa de la muestra de *Streptococcus Zooepidemicus* sobre el portaobjetos y fijarla con ayuda del mechero.
- Adicionar 3 gotas de cristal violeta sobre toda la muestra y dejar actuar por 1 minuto el colorante y lavar.
- Adicionar Lugol (fijador de violeta) sobre la muestra lavada, esto permite que ambos reactivos formen un complejo insoluble en agua el cual es capaz de penetrar la pared de las células.
- Dejar actuar por 1 minuto y lavar nuevamente el porta objetos con alcohol acetona durante 30 segundos y remover, ya que tiene la función de retirar el complejo que se formó de colorante.
- Adicionar colorante de contraste (fucsina) y dejar actuar por 1 minuto y lavar, esto permitirá distinguir la presencia de bacteria gram negativas.
- Ya se puede observar la muestra al microscopio donde se visualizarán de color violeta las gram positivas y de color rosa-rojizo las gram negativas.

#### **Reactivos**

- Cristal Violeta: Empleado para la técnica de reconocimiento de coloración de Gram como colorante que permite la visibilidad de la bacteria.
- Lugol de Gram: Se utiliza para fijar el cristal violeta en la coloración de Gram.
- Alcohol acetona: Se usa como decolorante en la coloración de Gram puesto que se encarga de deshidratar la pared bacteriana y cierra los poros de la misma.
- Fucsina de Gram: Es un colorante de contraste en la tinción de Gram.
- Etanol: Utilizado como bactericida.

- **Equipos**

Cajas de Petri: Se utilizan principalmente para la siembra de las cepas, ya sea para activarla o para realizar las pruebas de temperatura. También son usadas para la técnica de recuento en placa. Son redondas de diferentes diámetros generalmente hechas en vidrio.

**Figura 29.**

*Caja de petri*



**Nota.** En la figura se puede visualizar las cajas de petri. Tomado de :  
“Caja de petri.” [Online]. Available:  
[https://kitlab.exa.unicen.edu.ar/caja\\_de\\_petri.html](https://kitlab.exa.unicen.edu.ar/caja_de_petri.html) [Acceso: oct.29,2021]

Rastrillo: Es un elemento utilizado para extender y homogenizar las siembras de las disoluciones en las cajas de Petri, generalmente tiene una punta curva o doblada y se emplea en la técnica de cuantificación de UFC.

**Figura 30.**

*Rastrillo*



**Nota.** La imagen muestra como es la apariencia física del suero de leche. Tomado de: “Rastrillo bacteriológico” [Online] <https://www.kasalab.com/producto/r-1-espatula-drigalsky-o-rastrillo-bacteriologico-en-vidrio/> [Acceso: oct.29,2021].

## ANEXO 2.

### FERMENTACIÓN MICROBIANA

Las condiciones de operación que fueron definidas en el capítulo 2 garantizan que la fermentación se lleve a cabo de manera adecuada para obtener los resultados deseados.

- Adecuación de la incubadora: Se debe garantizar condiciones adiabáticas para evitar la transferencia de calor hacia el exterior y poder mantener la temperatura constante (37°C).
- pH del caldo de fermentación: Se debe trabajar con un pH de 7, de no ser así la bacteria se sometería a condiciones que no permitirán obtener los resultados deseados.
- Agitación: Este proceso se lleva a cabo con el agitador de manera constante durante todo el proceso a una velocidad de 150rpm para garantizar que la concentración de sustrato sea homogénea en todo el reactor.
- Tiempo de fermentación: 24 horas.
- Volumen de sustrato: 700ml con un inóculo de 11% v/v. [39]

7.2.3.a. Preparación del inóculo. Antes de la fermentación se debe preparar un inóculo que garantice la cantidad necesaria de bacterias que pueden llevar a cabo el proceso, como se definió anteriormente la concentración de este inóculo será del 11% v/v así que tendrá que preparar 77ml de este para ser agregado al medio de cultivo (suero de leche).

Para la preparación de esta disolución se tendrán en cuenta los patrones de McFarland los cuales se emplean como patrones de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. En este caso el patrón 0.5 es ideal para la preparación de inóculos bacterianos para garantizar una concentración inicial de fermentación de  $10^7$  [9]

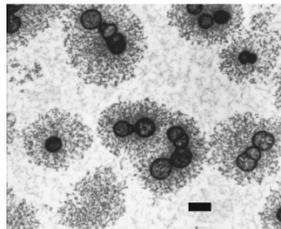
7.2.3.b Fermentación. Para la fermentación se va a usar un Schott de 1 L con 700 ml de sustrato el cual está previamente esterilizado en un autoclave que operó a 100°C durante 3 horas, después se debe ambientar el sustrato y el inóculo hasta la temperatura óptima (37°C) antes de mezclarlos, posteriormente se añaden 77ml de inóculo a los 700ml de sustrato y se empieza la fermentación durante 24 horas manteniendo la agitación de 150 RPM , sellando bien el Schott para evitar posibles derrames y contaminaciones en el proceso.

### Materias primas

- Cepa bacteriana: Se va a emplear la bacteria *Streptococcus Zooepidemicus* la cual se mantiene conservada e inactiva a bajas temperaturas (4°C).

**Figura 31.** Cepa de *Streptococcus zooepidemicus* bajo microscopio

*Cepa de Streptococcus zooepidemicus bajo microscopio*



**Nota.** En la figura se puede visualizar las características microscópicas de la cepa de *Streptococcus zooepidemicus*. Tomado de: “Cepa de *Streptococcus zooepidemicus* bajo microscopio” [Online] [https://www.researchgate.net/figure/Electron-micrograph-section-of-Streptococcus-equi-subsp-zooepidemicus-S-zooepidemicus\\_fig2\\_260989406](https://www.researchgate.net/figure/Electron-micrograph-section-of-Streptococcus-equi-subsp-zooepidemicus-S-zooepidemicus_fig2_260989406). [Acceso: oct.29,2021].

- Medio de cultivo:
  - Suero de leche: Se obtiene como un subproducto en el proceso de fabricación de queso o leche.

**Figura 32.**

*Suero de leche*



**Nota.** La imagen muestra la apariencia física del suero de leche. Tomado de: “Principales componentes del suero de leche” [ Online] <https://www.hsnstore.com/blog/nutricion/proteinas/principales-componentes-del-suero-de-leche/> . [Acceso: oct.29,2021].

**Equipos**

Elementos de medición volumétrica. Estos elementos se emplean para medir con gran exactitud volúmenes determinados de reactivos que se utilizan en la preparación de otros. Por ejemplo, vasos precipitados, Beaker, probeta, pipeta, entre otros.

**Figura 33.**

*Elementos de medición volumétrica*



**Nota.** La imagen muestra los elementos de medición volumétrica. Tomado de: “Material volumétrico” [Online] <https://www.lifeder.com/material-volumetrico-laboratorio-clinico/> [Acceso: oct.29,2021].

- Schott de vidrio: Se emplea para llevar a cabo la fermentación puesto que es un instrumento que se puede esterilizar fácilmente ya que resiste altas temperaturas por las características de los materiales empleados en su fabricación.

**Figura 34.**

*Schott de vidrio*



**Nota.** La imagen muestra un Schott de vidrio. Tomado de: “Schott graduado” [Online] <https://www.equicient.com.ar/frasco-tipo-schott-graduado-tapa-rosca-azul-250-ml-autoclavable---det--0166>. [Acceso: oct.29,2021].

### **ANEXO 3.**

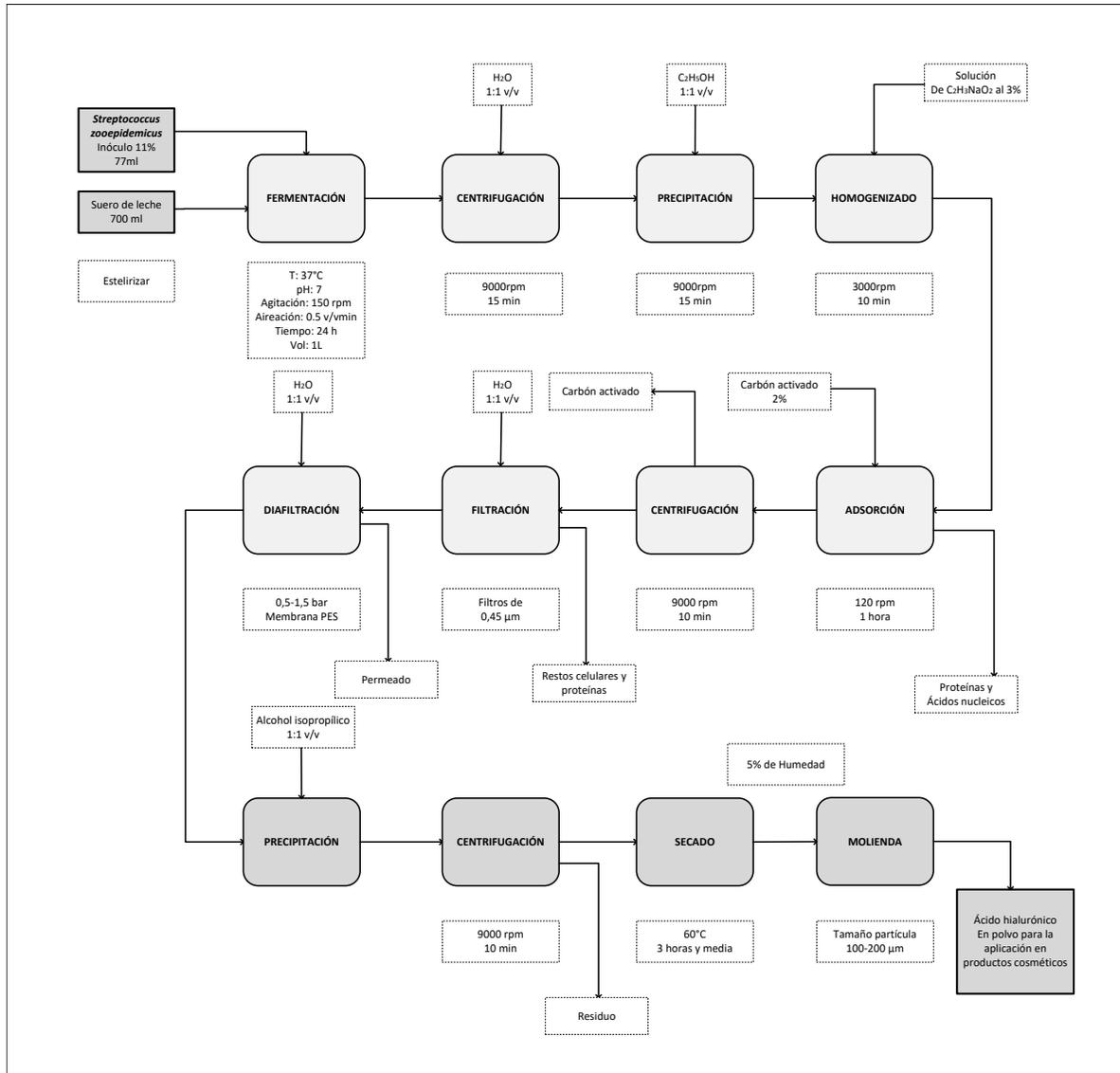
#### **PROCESO DE SECADO PARA LA OBTENCIÓN DE HA GRANULAR**

El HA retenido en la diafiltración se lleva a un proceso de precipitación adicionando alcohol isopropílico en una relación 1:1 v/v. Esta solución se centrifuga a 800 rpm para separar el sólido y luego se trata en un horno de bandejas [55] donde la pasta obtenida en la centrifugación se distribuye uniformemente en capas de 3 mm aproximadamente sobre las bandejas de aluminio, esto se realiza a 60°C durante 3 horas y media [55] El producto granulado que se obtiene del horno posee un 5% de humedad y se lleva a un molino pulverizador para disminuir su tamaño de partícula entre 100 y 200µm y mejorar la solubilidad en agua [55]

**ANEXO 4.**  
**DIAGRAMA DE BLOQUES DE LA PROPUESTA PARA LA OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE HA**

**Figura 35.**

Diagrama de bloques de la propuesta para la obtención y purificación de HA.



**Nota.** La imagen muestra un diagrama de flujo que describe la propuesta desde la fermentación hasta la obtención del HA final.

## ANEXO 5.

### ADECUACIÓN DEL SUSTRATO

En el proceso de fabricación de queso se obtiene un residuo denominado suero de leche dulce, el cual debe ser tratado con un proceso de filtración y pasteurizado a temperaturas cercanas a los 70°C por 15 segundos aproximadamente [70] y debe ser almacenado en condiciones de salubridad a temperaturas menores de 6°C.

En el artículo “*Kinetics of hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus considering the effect of glucose*” se obtiene la mayor tasa de crecimiento específica con un sustrato compuesto por un medio preparado de glucosa, extracto de levadura, fosfato monopotásico, fosfato de disodio, sulfato de magnesio y agua. Esta composición garantiza el crecimiento microbiano y la formación del ácido hialurónico.

Nutricionalmente hablando, los *Streptococcus* se encuentran dentro de las bacterias más exigentes, así que no sólo requieren una fuente de carbono sino que también una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas. Según la composición del suero de leche dulce **Tabla 13**, la fuente de carbono es proveniente de la lactosa, la cual es el principal nutriente de este sustrato. Las sales inorgánicas requeridas son suministradas por los cloruros presentes y la fuente de nitrógeno es proporcionada por las proteínas para garantizar la formación de enzimas y el producto de interés. Estos componentes se encuentran en mayor cantidad para asegurar el cumplimiento nutricional de la bacteria. Por ende, no se requiere añadir algún otro nutriente al suero de leche ya que gracias a su composición también puede garantizar el crecimiento celular al igual que si se emplea una fuente de sustrato rica en azúcares como en el estudio del modelo cinético de Han-levenspiel evidenciado en la **Tabla 20**.

**Tabla 20.***Comparación nutricional de sustrato preparado y suero de leche*

Sustrato		
	Medio preparado de glucosa, extracto de levadura, fosfato monopotásico, fosfato de disodio, sulfato de magnesio y agua.	Suero de leche
Fuente de Carbono	Glucosa	Lactosa
Fuente de Nitrógeno	Extracto de levadura	Proteínas
Sales inorgánicas	Sulfato de magnesio	Cloruros

*Nota.* La tabla muestra las fuentes de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas presentes en el sustrato que proporciona la mayor tasa de velocidad específica de crecimiento y donde se emplea el modelo de Han-Levenspiel, junto a la composición del suero de leche propuesto para la fermentación.