



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO POR  
CULTIVO SUMERGIDO DE *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus***

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

***IBQ Ivana Cristina Peñuelas Silva***

Directora de Tesis:

**Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto<sup>1</sup>**

Asesoras:

**Dra. Zaizy Rocha Pino<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Bioprocesos de subproductos Agro-industriales y Alimenticios

**Dra. Isabel de la Luz Membrillo Venegas**

Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. División de Ingeniería Química y Bioquímica

Ciudad de México, a 03 de febrero de 2016

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto 10 del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT No. 237292).

Ciudad de México, a 03 de febrero de 2016

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**“Producción y caracterización de ácido hialurónico por cultivo sumergido de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*”**

Que presentó:

**IBQ Ivana Cristina Peñuelas Silva**

**Comité tutorial:**

**Directora de tesis:**

**Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto<sup>1</sup>**

**Asesores de tesis:**

**Dra. Zaizy Rocha Pino<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Bioprocesos de subproductos Agroindustriales y Alimenticios

**Dra. Isabel de la Luz Membrillo Venegas**

Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. División de Ingeniería Química y Bioquímica

**H. Jurado:**

**Presidente:**

Dr. Humberto Vázquez Torres

**Secretario:**

Dra. Isabel de la Luz Membrillo Venegas

**Vocal:**

Dra. Zaizy Rocha Pino

**Vocal:**

M. en B. Marco Polo Carballo Sanchez



The image shows three handwritten signatures in black ink, each placed over a horizontal line. The top signature is the most legible and appears to be 'H. Vázquez Torres'. The middle signature is more stylized and less legible. The bottom signature is also stylized and less legible.

## DEDICATORIAS

A mis padres, Alberto Peñuelas y Carmen Silva

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Keiko Shirai, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su valiosa dirección, apoyo y confianza para la realización de este proyecto.

A la Dra. Zaizy Rocha quien con gran amabilidad, disposición y paciencia me orientó y motivó durante la realización del trabajo experimental. Agradezco la revisión y sus observaciones al presente escrito, así como su sincera amistad.

Al Dr. Humberto Vázquez, por la revisión y sus observaciones al presente trabajo, así como por sus consejos y enseñanzas.

Al M. en B. Marco Polo Carballo, por la revisión de la tesis, sus observaciones y su amistad.

A la Dra. Isabel Membrillo, por sus observaciones y sugerencias al presente trabajo.

A la M. en B. Angélica Ramos, por las pruebas de SEC y  $^1\text{H-RMN}$  de las muestras, que realizó durante su estancia en la Universidad Claude Bernard Lyon 1.

A mis compañeros de laboratorio, por el apoyo brindado; en especial a Carmen, Rosario y Lety por su amistad.

A Joel, por todo su apoyo y cariño.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	4
2. MARCO TEÓRICO .....	6
2.1 Ácido hialurónico .....	6
2.2 Funciones biológicas del ácido hialurónico .....	7
2.3 Aplicaciones del ácido hialurónico .....	8
2.4 Producción de ácido hialurónico por <i>Streptococcus</i> .....	10
2.4.1 Condiciones de fermentación empleadas en la producción de ácido hialurónico .....	12
2.4.2 Medios de cultivo empleados en la producción de ácido hialurónico.....	14
3. JUSTIFICACIÓN .....	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVOS .....	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos particulares .....	18
6. METODOLOGÍA .....	19
6.1 Microorganismo.....	19
6.1.1 Conservación del microorganismo .....	19
6.2 Preparación del inóculo.....	19
6.2.2 Estandarización del inóculo .....	20
6.3 Establecimiento del método turbidimétrico de cuantificación del ácido hialurónico .....	20
6.4 CULTIVO SUMERGIDO.....	21

6.4.1	Determinación del efecto de la concentración de glucosa inicial en cultivo sumergido estático .....	21
6.4.2	Determinación del efecto de la agitación en cultivo sumergido aireado ....	22
6.5	ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS .....	22
6.5.1	Determinación del crecimiento bacteriano .....	22
6.5.2	Determinación del consumo de glucosa .....	23
6.5.3	Determinación del pH.....	23
6.5.4	Determinación de proteína soluble .....	24
6.5.5	Extracción del ácido hialurónico .....	24
6.5.6	Cuantificación del ácido hialurónico .....	24
6.6.	CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO .....	25
6.6.1	Análisis por espectroscopía de infrarrojo FTIR .....	25
6.6.2	Análisis por resonancia magnética nuclear de protón <sup>1</sup> H-NMR .....	25
6.6.3	Determinación del peso molecular del ácido hialurónico.....	26
6.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
7.1	Microorganismo .....	28
7.2	Estandarización del inóculo .....	28
7.3	Establecimiento del método de cuantificación de HA.....	29
7.4	CULTIVO SUMERGIDO .....	29
7.4.1	Efecto de la concentración de glucosa inicial en cultivo sumergido estático.....	29
7.4.1.1	Consumo de glucosa .....	30
7.4.1.2	Perfil de pH .....	32
7.4.1.3	Proteína soluble .....	33
7.4.1.4	Crecimiento bacteriano .....	33

7.4.1.5 Producción de ácido hialurónico.....	35
7.4.2 Efecto de la agitación en cultivo sumergido aireado .....	36
7.4.2.1 Consumo de glucosa .....	38
7.4.2.2 Perfil de pH .....	39
7.4.2.3 Proteína soluble .....	40
7.4.2.4 Crecimiento microbiano.....	41
7.4.2.5 Producción de HA.....	43
7.5 CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO .....	45
7.5.1 Caracterización de HA por espectroscopía de infrarrojo FTIR.....	45
7.5.2 Caracterización del HA por resonancia magnética nuclear de protón <sup>1</sup> H-NMR.....	46
7.5.3 Determinación del peso molecular del ácido hialurónico.....	48
VIII CONCLUSIONES .....	52
IX SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS.....	53
X REFERENCIAS .....	54
XI ANEXOS.....	59
11.1 Composición del caldo de infusión de cerebro y corazón.....	59
11.2. Composición del caldo de soya y tripticaseína .....	59
11.3 Cuantificación de ácido hialurónico por el método turbidimétrico CTAB (Método Turbidimétrico CTAB). Protocolo propuesto por Chen y Wang (2009).....	60
11.4 Cuantificación de ácido hialurónico por el método turbidimétrico CTM (Método Turbidimétrico CTAB). Protocolo propuesto por Di Ferrante (1956).....	61
11.5 Determinación de azúcares reductores por el método colorimétrico DNS (Miller, 1959).....	62
11. 6 Determinación de proteína soluble por el método colorimétrico Lowry-Peterson (Peterson, 1977).....	63



<b>11.7 Espectros de FTIR de las muestras de HA obtenidas en el cultivo de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>11.7.1 Espectros de FTIR de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> con CGI de 2.5 g/L.....</b>	<b>65</b>
<b>11.7.2 Espectros de FTIR de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> con CGI de 5 g/L.....</b>	<b>66</b>
<b>11.7.3 Espectros de FTIR de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> con CGI de 10 g/L.....</b>	<b>67</b>
<b>11.7.4 Espectros de FTIR de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> con agitación de 200 rpm .....</b>	<b>68</b>
<b>11.7.5 Espectros de FTIR de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> con agitación de 400 rpm .....</b>	<b>69</b>
<b>11.7.6 Espectros de FTIR de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> con agitación de 600 rpm .....</b>	<b>70</b>
<b>11.8 Cromatogramas de SEC de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido agitado 400 rpm de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>.....</b>	<b>71</b>
<b>11.8.1 Cromatograma de SEC del HA comercial.....</b>	<b>71</b>
<b>11.8.2 Cromatograma de SEC del HA producido a las 8 h de cultivo (HA8) .....</b>	<b>73</b>
<b>11.8.3 Cromatograma de SEC del HA producido a las 8 h de cultivo (HA9) .....</b>	<b>74</b>
<b>11.8.4 Cromatograma de SEC del HA producido a las 10 h de cultivo (HA10) ...</b>	<b>75</b>
<b>11.8.5 Cromatograma de SEC del HA producido a las 10 h de cultivo (HA11) ...</b>	<b>76</b>
<b>11.8.6 Cromatograma de SEC del HA producido a las 12 h de cultivo (HA12) ...</b>	<b>77</b>
<b>11.8.7 Cromatograma de SEC del HA producido a las 12 h de cultivo (HA13) ...</b>	<b>78</b>
<b>11.8.8 Cromatograma de SEC del HA producido a las 24 h de cultivo (HA14) ...</b>	<b>79</b>
<b>11.8.9 Cromatograma de SEC del HA producido a las 24 h de cultivo (HA15) ...</b>	<b>80</b>
<b>11.8.10 Cromatograma de SEC del HA producido a las 48 h de cultivo (HA16) .</b>	<b>81</b>

11.8.11 Cromatograma de SEC del HA producido a las 48 h de cultivo (HA17) ..	82
11.8.12 Cromatograma de SEC del HA producido a las 48 h de cultivo (HA48) ..	83
11.9 Análisis estadístico.....	84
11.9.1 Efecto del tiempo en la concentración de glucosa en el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> .....	84
11.9.2 Efecto de la CGI en el consumo de glucosa en el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> .....	86
11.9.3 Efecto del tiempo en la concentración de proteína soluble en el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> .....	87
11.9.4 Efecto de la CGI en el rendimiento de producto a partir de sustrato ( $Y_{HA/S}$ ) y la productividad volumétrica ( $P_{HA}$ ), en el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> .....	88
11.9.5 Efecto del tiempo en la concentración de glucosa en el cultivo sumergido agitado de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> .....	88
11.9.6 Efecto de la agitación en el consumo de glucosa en el cultivo sumergido de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> .....	91
11.9.7 Efecto del tiempo en la concentración de proteína soluble en el cultivo sumergido agitado de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> . .....	91
11.9.8 Efecto de la agitación en el rendimiento de producto a partir del sustrado ( $Y_{HA/S}$ ) y productividad volumétrica de HA ( $P_{HA}$ ), en el cultivo sumergido de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> .....	93

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones médicas del ácido hialurónico. Tomada y adaptada de Tamer (2013).....	8
Tabla 2. Aplicaciones del ácido hialurónico en la liberación controlada de fármacos. Tomada y adaptada de Tamer (2013) .....	9
Tabla 3. Consumo de glucosa respecto al nivel de CGI empleado en el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i> .....	31
Tabla 4. Parámetros cinéticos estimados para el crecimiento de <i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i> en cultivo sumergido estático respecto al nivel de CGI. ....	34
Tabla 5. Parámetros cinéticos estimados para la producción de HA por cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i> respecto al nivel de CGI....	36
Tabla 6. Consumo de glucosa respecto al nivel de agitación en el cultivo sumergido <i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i> .....	39
Tabla 7. Parámetros cinéticos estimados para el crecimiento de <i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i> en cultivo sumergido respecto al nivel de agitación.....	42
Tabla 8. Parámetros cinéticos estimados para la producción de HA por cultivo sumergido de <i>S. equi</i> subsp. <i>zoepidemicus</i> respecto al nivel de agitación. ....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estructural del ácido hialurónico (Boeriu et al., 2013) .....	6
Figura 2. Ruta de biosíntesis de ácido hialurónico en estreptococos. Tomada y adaptada de Fong Chong <i>et al.</i> , 2005.....	11
Figura 3. Tinción Gram de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , observada al microscopio óptico (1000 X).....	28
Figura 4. Cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> con una CGI de 2.5 g/L. Glucosa (●), pH (○), D.O. <sub>560</sub> (▲) y HA (◆). .....	30
Figura 5. Concentración de glucosa durante el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> . CGI 2.5 (●), CGI 5 (●), CGI 10 (●).....	31
Figura 6. Cambio de pH durante el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> . CGI 2.5 (○), CGI 5 (○), CGI 10 (○).....	32
Figura 7. Concentración de proteína soluble durante el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> . CGI 2.5 (■), CGI 5 (■), CGI 10 (■). .....	33
Figura 8. Biomasa producida durante el cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> . CGI 2.5 (x), CGI 5 (x), CGI 10 (x).....	34
Figura 9. Producción de ácido hialurónico en cultivo sumergido estático de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> . CGI 2.5 (◆), CGI 5 (◆), CGI 10 (◆). .....	35
Figura 10. Cultivo sumergido de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> con una agitación de 400 rpm y 1 vvm de aireación. Glucosa (●), pH (○), D.O. <sub>560</sub> (▲) y HA (◆). .....	37
Figura 11. Concentración de glucosa durante el cultivo sumergido agitado de ....	38
Figura 12. Cambio de pH durante el cultivo sumergido agitado de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> . 0 rpm (○), 200 rpm (○), 400 rpm (○), 600 rpm (○).....	40
Figura 13. Concentración de proteína soluble determinada durante el cultivo sumergido agitado de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> . 0 rpm (■), 200 rpm (■), 400 rpm (■), 600 rpm (■).....	41
Figura 14 Biomasa producida durante el cultivo sumergido agitado de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> . 0 rpm (x), 200 rpm (x), 400 rpm (x), 600 rpm (x). .....	42
Figura 15. Producción de ácido hialurónico en cultivo sumergido agitado de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> . 0 rpm (◆), 200 rpm (◆), 400 rpm (◆), 600 rpm (◆).....	43

Figura 16. Espectros de FTIR del HA producido en este trabajo y del HA comercial.....	45
Figura 17. Espectro <sup>1</sup> H-NMR del HA comercial.....	47
Figura 18. Espectro <sup>1</sup> H-NMR del HA producido en cultivo sumergido de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> .....	48
Figura 19. Cromatograma de SEC correspondiente a un reactivo comercial de HA. (-) Detector de dispersión de luz, (-) Detector de índice de refracción. ....	49
Figura 20. Cromatograma de SEC del HA producido por cultivo sumergido de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> con una agitación de 400 rpm. (-) Detector de dispersión de luz, (-) Detector de índice de refracción. ....	50
Figura 21. Perfil del peso molecular ( $M_w$ ) del HA obtenido en el cultivo sumergido de <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , con CGI de 5 g/L, agitación de 400 rpm y aireación de 1 vvm. ....	51

## ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>ATR</b>	Reflectancia total atenuada
<b>BHI</b>	Infusión de cerebro y corazón
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>CGI</b>	Concentración de glucosa inicial
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetiltrimetilamonio
<b>Da</b>	Dalton
<b>DNS</b>	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>FTIR</b>	Infrarrojo por Transformada de Fourier
<b>h</b>	Hora
<b>HA</b>	Ácido hialurónico
<b>HasA</b>	Hialuronato sintasa
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	Resonancia magnética nuclear de protón
<b>min</b>	Minuto
<b>M<sub>w</sub></b>	Peso molecular ponderal promedio
<b>P<sub>HA</sub></b>	Productividad volumétrica de HA
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SEC</b>	Cromatografía de exclusión por tamaño
<b>SSI</b>	Solución salina isotónica

<b>TS</b>	Soya y tripticaseína
<b>v/v</b>	Volumen/volumen
<b>vvm</b>	Volumen de aire por volumen de medio por minuto
<b>UDP</b>	Uridina difosfato
<b>UTP</b>	Uridina trifosfato
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>Y<sub>HAS</sub></b>	Rendimiento de producto a partir del sustrato

## RESUMEN

El ácido hialurónico (HA) es un biopolímero lineal que se encuentra presente en todos los vertebrados y es producido por algunas bacterias como *Pasteurella multocida* y ciertas cepas de *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Este biopolímero y sus derivados poseen diversas aplicaciones en las áreas médica y cosmética.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la concentración de glucosa inicial o CGI (2.5, 5 y 10 g/L), así como de la agitación (0, 200, 400 y 600 rpm) en la producción de HA por cultivo sumergido de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* en caldo de soya y tripticaseína.

En la primera etapa de este trabajo se encontró que había una mayor producción de biomasa al aumentar la concentración de sustrato inicial. Asimismo, se incrementó la producción de HA al modificar la CGI de 2.5 a 5 g/L, pero no hubo diferencia en la producción del biopolímero para los niveles más altos de glucosa inicial. En el cultivo con una CGI de 5 g/L se obtuvieron 0.24 g/L de HA, con un rendimiento ( $Y_{HA/S}$ ) de  $0.069 \pm 0.006$  g<sub>HA</sub>/g<sub>glucosa</sub>.

En la segunda etapa de este estudio, se observó que la agitación incrementó la producción y rendimiento del biopolímero, obteniéndose los mejores resultados con los niveles de agitación de 400 y 600 rpm, con una producción de biopolímero de 0.54 y 0.55 g/L de HA, respectivamente. En el cultivo agitado a 400 rpm, el rendimiento del biopolímero ( $Y_{HA/S}$ ) fue 2.26 veces mayor en comparación con el cultivo estático correspondiente.

El biopolímero obtenido en cada experimento fue extraído y purificado, encontrándose que presentaba las bandas características del HA en los espectros de FTIR. Asimismo, el biopolímero producido en cultivo sumergido agitado 400 rpm de agitación presentó un espectro de <sup>1</sup>H-NMR similar al del HA comercial. Por



otro lado, los pesos moleculares de las muestras de biopolímero obtenidas en el cultivo sumergido con agitación de 400 rpm se encontraron en el intervalo de  $8.95 \times 10^5$  -  $1.89 \times 10^6$  Da y presentaron un bajo índice de polidispersidad (1.04-1.21).

## ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) is a linear biopolymer that is present in all vertebrates and is produced by some bacteria such as *Pasteurella multocida* and certain strains of *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. This biopolymer and its derivatives have important applications in medical and cosmetic fields.

The objective of this work was to evaluate the effect of the initial glucose concentration or CGI (2.5, 5 and 10 g/L), as well as the agitation (0, 200, 400 and 600 rpm) in the production of HA by submerged culture of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in trypticase soy broth.

In the first stage of this work, it was found that there was a greater biomass production with the increase of the initial substrate concentration. Moreover, the production of HA was increased when the CGI was modified from 2.5 to 5 g/L; however, there was no difference in the production of the biopolymer within the highest levels of CGI. In the cultivation with 5 g/L of initial glucose, 0.24 g/L of HA were produced, with a yield ( $Y_{HA/S}$ ) of  $0.069 \pm 0.006$  g<sub>HA</sub>/g<sub>glucose</sub>.

In the second stage of this study, it was found that agitation increased the production and yield of the biopolymer; the best results were obtained with impeller speeds of 400 and 600 rpm, with 0.54 and 0.55 g/L of HA produced, respectively. In the culture with an impeller speed of 400 rpm, the yield of the biopolymer ( $Y_{HA/S}$ ) was 2.26 times greater than that of the corresponding static culture.

The biopolymer produced in each experiment was extracted and purified, showing the characteristic peaks of HA in the FTIR spectra. Moreover, the biopolymer produced in submerged cultivation with an impeller speed of 400 rpm showed a similar  $^1\text{H-NMR}$  spectrum to that of the commercial HA. On the other hand, the molecular weights of the samples obtained via submerged cultivation at 400 rpm were in the range of  $8.95 \times 10^5$  -  $1.89 \times 10^6$  Da and showed a low polydispersity index (1.04-1.21).

## 1. INTRODUCCIÓN

En 1934, Karl Meyer y John Palmer aislaron un nuevo polisacárido del humor vítreo de bovinos, compuesto por un ácido urónico y un aminoazúcar. Lo llamaron ácido hialurónico. El ácido hialurónico (HA) es un biopolímero lineal, compuesto por unidades de disacárido de *N*-acetil-*D*-glucosamina y ácido *D*-glucurónico, unidos por enlaces glucosídicos  $\beta(1\rightarrow3)$  y  $\beta(1\rightarrow4)$  (Fong Chong *et al.*, 2005). Este biopolímero se encuentra presente en el tejido conectivo, siendo el componente principal de la matriz extracelular. El HA está presente en todos los vertebrados, encontrándose en altas concentraciones en el cordón umbilical, en el fluido sinovial, en la piel y en el humor vítreo, además de ser producido por bacterias, como *Pasteurella multocida* y algunas cepas de los géneros de *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Vázquez *et al.*, 2013; Boeriu *et al.*, 2013; DeAngelis *et al.*, 1998; Lee Ching *et al.*, 2013).

El HA y sus derivados poseen diversas aplicaciones en las áreas médica y cosmética (Fong Chong *et al.*, 2005). Las funciones biológicas del HA dependen de su peso molecular, siendo los polímeros de alto peso molecular los preferidos para las aplicaciones biomédicas y dermatológicas, por sus propiedades de relleno, anti-angiogénicas e inmunosupresoras. El HA y sus derivados se emplean en la viscosuplementación de pacientes con artritis, en cirugías oculares, en la regeneración de tejidos, así como en cosméticos anti-edad y en cirugía plástica (Kogan *et al.*, 2007).

La fuente tradicional de obtención del HA son las crestas de gallo, siendo el tejido animal con mayor contenido de este biopolímero (7.5 mg/mL) (Kogan *et al.*, 2007). La extracción de HA de alto peso molecular y con una alta pureza a partir de fuentes animales es un proceso difícil, debido a que suele encontrarse presente en forma de complejos con otros biopolímeros (como los proteoglicanos). Los métodos de extracción de HA requieren el uso de enzimas proteolíticas, precipitación con cloruro de cetilpiridinio, con disolventes acuosos u orgánicos, uso

de detergentes, además de ultrafiltración y cromatografía para eliminar impurezas. De este modo, la extracción de HA de fuentes animales es un proceso costoso, laborioso, que consume una gran cantidad de tiempo y que genera una importante cantidad de residuos (Boeriu *et al.*, 2013; Vázquez *et al.*, 2013). Además, el HA obtenido de esta forma, puede inducir reacciones alérgicas en los usuarios, debido a su origen avícola (Kogan *et al.*, 2007).

El HA también puede obtenerse por fermentación microbiana, ya que es sintetizado como una cápsula extracelular de algunas cepas bacterianas del género *Streptococcus*, del grupo A y C de Lancefield (Fong Chong *et al.*, 2005). La cepa más comúnmente empleada es *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (Liu *et al.*, 2011). El HA producido vía bacteriana es idéntico al de los animales, lo que lo hace ideal para aplicaciones en el área biomédica (Boeriu *et al.*, 2013).

El objetivo del presente trabajo fue la producción de HA por cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, en caldo soya tripticaseína, evaluando el efecto de la concentración de glucosa inicial (CGI), así como de la agitación en el rendimiento y características químicas del producto obtenido.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Ácido hialurónico

El HA (Figura 1) es un biopolímero compuesto por unidades repetidas del disacárido *N*-acetil-*D*-glucosamina y ácido *D*-glucurónico, unidos por enlaces glucosídicos  $\beta(1\rightarrow3)$  y  $\beta(1\rightarrow4)$ . Ambos azúcares están en la configuración  $\beta$ , lo que permite que todos los grupos voluminosos (carboxilo, hidroxilos y el carbono anomérico del azúcar adyacente) se encuentren en posición ecuatorial, mientras que los pequeños átomos de hidrógeno ocupan las posiciones axiales. De este modo, la estructura del disacárido es muy estable energéticamente (Tamer, 2013).

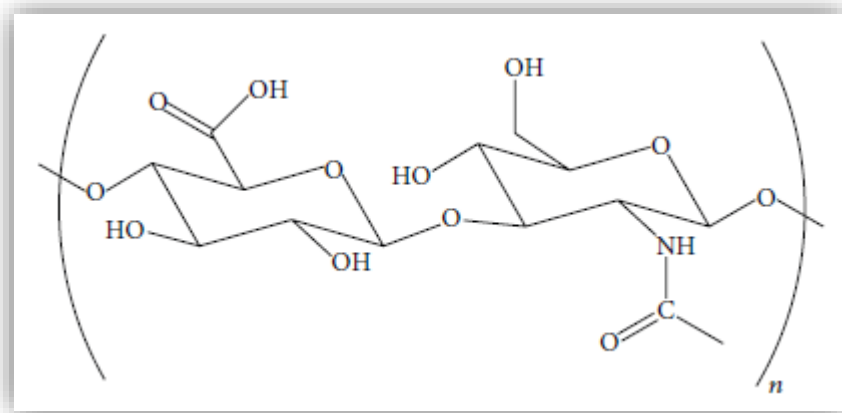


Figura 1. Fórmula estructural del ácido hialurónico (Boeriu *et al.*, 2013)

Este biopolímero es miembro de la familia de los glicosaminoglicanos, que incluye al sulfato de condroitina, sulfato de queratina y sulfato de heparina, siendo estructuralmente el más simple de ellos, ya que no se encuentra covalentemente asociado a un núcleo proteico, ni es sintetizado en el aparato de Golgi, además de ser el único que no está sulfatado (Boeriu *et al.*, 2013; Kogan *et al.*, 2007).

Los pesos moleculares del HA de diferentes fuentes son variables, encontrándose entre  $10^4$  y  $10^7$  Da (Liu *et al.*, 2011). El HA en soluciones acuosas, la molécula ocupa un gran volumen hidrodinámico, e incluso a bajas concentraciones ( $< 1$  mg/L) 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 (Armstrong y Johns, 1997).

## **2. 2 Funciones biológicas del ácido hialurónico**

En el cuerpo humano, el HA se encuentra en la forma de sal de hialuronato, (Liu *et al.*, 2011). El HA permite inmovilizar el agua de los tejidos, cambiando su volumen y compresibilidad. Además de servir como matriz celular, este biopolímero influye también en la proliferación y diferenciación celular, así como en la reparación de tejidos. En la piel, el HA presenta una función antioxidante, neutralizando los radicales libres generados por la radiación ultravioleta. En el fluido sinovial, el HA ayuda a lubricar las articulaciones y actúa como amortiguador de impactos mecánicos. En el cartílago, el HA es un elemento importante de la matriz, formando parte del agregado, un proteoglicano de gran tamaño de sulfato de condroitina, cuyo arreglo macromolecular es posible gracias a interacciones específicas de proteínas con HA (Kogan *et al.*, 2007).

Las funciones biológicas del HA dependen de su peso molecular. Los polímeros de HA de alto peso molecular ( $M_w > 5 \times 10^5$  Da) son rellenos de espacio, antiangiogénicos e inmunodepresivos; las cadenas de HA de mediano peso ( $M_w$  entre  $2 \times 10^4 - 10^5$  Da) se encuentran involucradas en la ovulación, la embriogénesis y la reparación de heridas; los oligosacáridos con 15-50 unidades repetidas de disacárido ( $M_w$  entre  $6 \times 10^3 - 2 \times 10^4$  Da) son inflamatorios, inmunoestimuladores y angiogénicos, mientras que los pequeños oligómeros de HA ( $M_w$  de 400 a 4000 Da) son antiapoptóticos e inductores de proteínas de choque térmico (Boeriu *et al.*, 2013).

### 2.3 Aplicaciones del ácido hialurónico

El uso de HA en aplicaciones médicas fue posible gracias a Endre Balazs, quien en 1979 reportó un método que permitía obtener por primera vez HA no inflamatorio, altamente purificado y de alto peso molecular a partir de cordón umbilical y crestas de gallo (Liu et al., 2011). Ese mismo año salió a la venta el primer producto comercial de HA, Healon de Pharmacia (ahora Pfizer), empleándose en diversas cirugías oculares como la extracción de cataratas y el trasplante de córnea (Fong Chong *et al.*, 2005).

En la Tabla 1 se presentan algunas de las aplicaciones médicas del HA, así como los productos comerciales empleados.

Tabla 1. Aplicaciones médicas del ácido hialurónico. Tomada y adaptada de Tamer (2013)

Condición	Aplicación	Producto comercial
Osteoartritis	Lubricación y soporte mecánico para las articulaciones	Hyalgan (Fidia, Italia) Artz (Seikagaku, Japón) ORTHOVISC (Anika, Estados Unidos) Healon, Opegan y Opelead
Recuperación quirúrgica y de heridas	Implantación de lentes intraoculares artificiales, gel viscoelástico	Bionect, Connecttivina y Jossalind
Implantación de embriones	Medio de cultivo para el uso de la fertilización <i>in vitro</i>	Embryogluue (Vitrolife, Estados Unidos)

En dermatología, se emplean algunas preparaciones de HA ligeramente entrecruzado, con la finalidad de rellenar arrugas faciales y cicatrices (Kogan *et al.*, 2007). En cirugía cosmética, el HA, en forma estabilizada o en combinación

con otros polímeros, es utilizado como componente de rellenos dérmicos (como Hylaform, Restylane y Dermalive). Se ha reportado que la inyección de estos productos en la dermis puede reducir las arrugas y líneas faciales a largo plazo, con menos efectos secundarios y una mejor tolerancia comparado con el uso de colágeno (Tamer, 2013).

Además, se ha estudiado la aplicación en la liberación controlada de fármacos, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Aplicaciones del ácido hialurónico en la liberación controlada de fármacos. Tomada y adaptada de Tamer (2013)

Ruta	Justificación	Agente terapéutico
Oftálmica	Mayor residencia ocular del fármaco, lo que puede llevar a un aumento en la biodisponibilidad	Pilocarpina, tropicamida, timolol, tobramicina, poliéster de arecaidina, aceclidina
Nasal	Bioadhesión resultante en una mayor biodisponibilidad	Xilometazolina, vasopresina, gentamicina
Pulmonar	Mejor absorción y modificación de la tasa de disolución	Insulina
Parenteral	Acarreador de fármacos y facilitador del entrapamiento liposomal	Taxol, superóxido dismutasa, factor de crecimiento recombinante tipo insulina, doxorubicina
Implante	Modificación de la tasa de disolución	Insulina
Génica	Modificación y protección de la tasa de disolución	DNA plasmídico/ anticuerpos monoclonales



## 2.4 Producción de ácido hialurónico por *Streptococcus*

Las bacterias del género *Streptococcus* son células Gram positivas, con forma esférica que se encuentran formando pares o cadenas. Estas bacterias son catalasa negativa, no esporulan y no presentan motilidad; la gran mayoría son anaerobias facultativas o anaerobias aerotolerantes y obtienen su energía mediante un metabolismo anaerobio (Hardie y Whiley, 1997, Gobetti y Calasso, 2014). Los estreptococos de los grupos A y C de Lancefield producen HA como una cápsula extracelular, misma que los protege de la fagocitosis y podría facilitar la adherencia e invasión de tejidos (Marcellin *et al.*, 2009). Además, la cápsula extracelular de HA, así como la enzima superóxido dismutasa, ayudan a estas bacterias a protegerse del oxígeno (Cleary y Larkin, 1979).

La fermentación microbiana para la obtención de HA se lleva a cabo con las bacterias del grupo C del género *Streptococcus*, que tienen una alta productividad y no son patógenos humanos. Las cepas más comúnmente empleadas son *S. equi* subsp. *equi* y *S. equi* subsp. *zooepidemicus* (Boeriu *et al.*, 2013).

La biosíntesis de HA es un proceso que compete con el crecimiento celular (Boeriu *et al.*, 2013). La ruta biosintética del HA en estreptococos se presenta en la Figura 2. El ácido *D*-glucurónico y la *N*-acetilglucosamina del HA provienen de la glucosa-6-fosfato y de la fructosa-6-fosfato, respectivamente (Fong Chong *et al.*, 2005). La ruta de biosíntesis de HA puede dividirse en dos series de reacciones. En la primera serie, la glucosa-6-fosfato se convierte en glucosa-1-fosfato por la  $\alpha$ -fosfoglucomutasa. Luego, la UDP-glucosa pirofosforilasa agrega UTP a la glucosa-1-fosfato, produciendo UDP-glucosa. Finalmente, la oxidación del alcohol primario de la UDP-glucosa es catalizada por la UDP-glucosa deshidrogenasa, obteniéndose el primer precursor del HA. En la segunda serie de reacciones, la glutamina fructosa-6-fosfato amidotransferasa transfiere un grupo amino de la glutamina a la fructosa-6-fosfato, produciendo glucosamina-6-fosfato. Posteriormente, la fosfoglucoamutasa cataliza un rearrreglo del grupo

fosfato, formándose la glucosamina-1-fosfato. En la siguiente reacción, la fosfoglucoammina acetil transferasa produce *N*-acetilglucosamina. Finalmente, la *N*-acetilglucosamina-1-fosfato pirofosforilasa produce el segundo precursor del HA, la UDP-*N*-acetilglucosamina (Liu *et al.*, 2011).

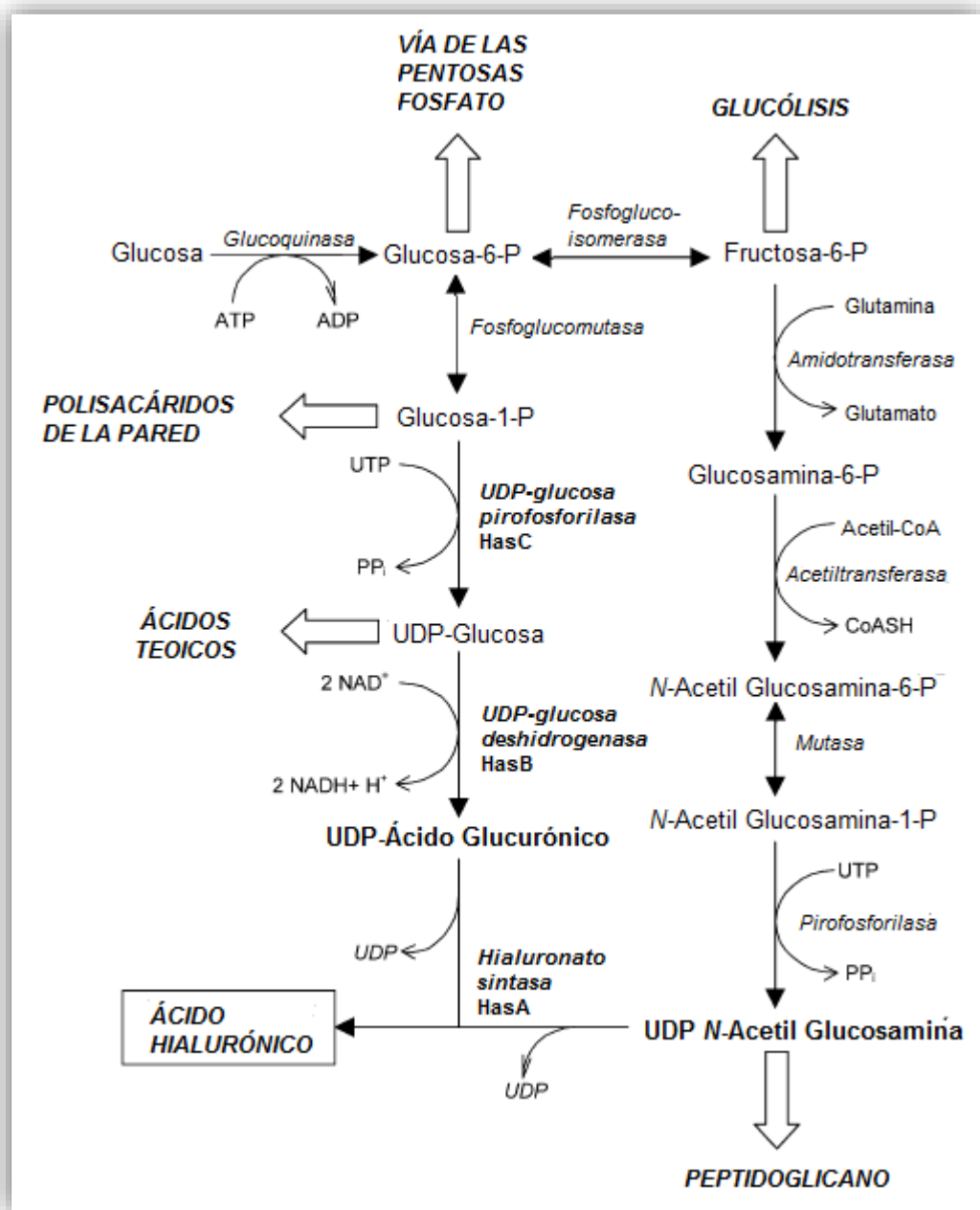


Figura 2. Ruta de biosíntesis de ácido hialurónico en estreptococos. Tomada y adaptada de Fong Chong *et al.*, 2005.

La participación del UTP en estas reacciones genera donadores glicosilo activados que pueden ser polimerizados en HA por la hialuronato sintasa (HasA). Un total de 4 moles de ATP son consumidos para producir 1 mol del disacárido que constituye la unidad repetida del HA; dos moles son consumidos para producir los precursores de hexosa fosforilados en la reacción catalizada por la glucoquinasa, y otros dos moles de ATP utilizados para regenerar las especies donadoras UTP (Fong Chong *et al.*, 2005).

Además de proporcionar los precursores para la síntesis de HA, en esta ruta metabólica se producen otros intermediarios involucrados en la síntesis de la pared celular, específicamente del peptidoglicano, los ácidos teicoicos y los polisacáridos antigénicos de la pared; estos tres componentes principales de la pared celular constituyen un 20 % en masa del peso seco de la célula y representan una desviación importante de las reservas de precursores para la síntesis del HA (Fong Chong *et al.*, 2005).

#### **2.4.1 Condiciones de fermentación empleadas en la producción de ácido hialurónico**

Las condiciones de cultivo, como el pH, la temperatura, la tasa de agitación y el tipo de biorreactor son factores que influyen en la producción microbiana de HA (Liu *et al.*, 2011).

En la producción de HA por *S. zooepidemicus* se emplea un pH cercano a la neutralidad y una temperatura de 37 °C (Fong Chong *et al.*, 2005).

Johns *et al.* (1994), reportaron que el pH óptimo para la producción de HA era de 6.7, ya que a este pH se obtuvo un buen rendimiento y la mayor tasa de producción volumétrica del biopolímero. Además, el pH al que se presentó la tasa de crecimiento específica más alta fue de 6.5 y mientras más alcalino era el pH del medio, la tasa de crecimiento específica de la bacteria disminuía. Por otro lado,

Armstrong y Johns (1997) encontraron que el pH no afectaba el peso molecular ni la ploidispersidad del HA obtenido por fermentación de *S. zooepidemicus* en un rango de pH de 6.3 a 8.0.

En 2010, Jagannath y Ramachandran estudiaron el efecto de la temperatura en la producción de HA por *S. zooepidemicus*, cultivando la bacteria en un rango de temperaturas de 27 a 37 °C. Encontraron que la mayor tasa de crecimiento específica de la bacteria se obtuvo en el cultivo a 37 °C, pero fue en el cultivo a 35 °C en el que se produjo la mayor cantidad de biopolímero. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Armstrong y Johns (1997), que produjeron HA por cultivo sumergido de *S. zooepidemicus* a temperaturas de 32 a 40 °C, encontrando que los cultivos a bajas temperaturas producían más biopolímero, pero crecían más lento que aquellos a 40 °C.

La aireación, por su parte, también presenta un efecto significativo en el rendimiento de HA, obteniéndose una mayor producción y un mayor rendimiento del biopolímero en medio aireado en relación con el medio anaerobio (Johns *et al.*, 1994).

En 2006, Huang *et al.*, encontraron que al suministrar oxígeno a un cultivo de *S. zooepidemicus*, la producción de HA aumentó de 1.5 a 2.3 g/L, comparado con un cultivo de la bacteria en condiciones anaeróbicas. Este resultado fue atribuido a un posible efecto estimulante del oxígeno, respecto al cual concluyeron que debía ser suministrado al medio en al menos un 5% de la saturación del aire para poder obtener el máximo efecto estimulante. Por otro lado, en un estudio realizado por Duan *et al.* (2008), se encontró que la expresión del gen *has*, que codifica cinco enzimas que participan en la biosíntesis de HA, así como la actividad de la enzima HasA aumentaban alrededor de nueve y dos veces, respectivamente, en condiciones aerobias comparado con condiciones anaerobias, en el cultivo sumergido de *S. zooepidemicus* G1. Además, estos mismos autores reportaron

que la aireación contribuía a la producción de ATP, posiblemente debido a una alta formación de acetato.

La producción de HA se realiza principalmente en lote, obteniéndose un biopolímero con un peso molecular que suele estar en el intervalo de  $1 \times 10^6$  a  $2.5 \times 10^6$  Da (Armstrong y Johns, 1997). También se ha explorado la producción de este biopolímero en lote alimentado; en 2009, Vázquez *et al.* produjeron ácido láctico y HA en lote y lote alimentado por cultivo sumergido de *S. zooepidemicus* en un medio complejo, logrando una mayor producción en el sistema de lote alimentado.

La fermentación de HA en modo continuo no ha logrado desarrollarse aún, debido a la inestabilidad del fenotipo productor de HA en los estreptococos a altas tasas de dilución, obteniéndose una baja productividad volumétrica (Fong Chong *et al.*, 2005).

#### **2.4.2 Medios de cultivo empleados en la producción de ácido hialurónico**

Los estreptococos son bacterias nutricionalmente exigentes en cuanto a sus requerimientos, por lo que necesitan cultivarse en un medio complejo (Fong Chong *et al.*, 2005).

La fuente de carbono empleada en la producción de HA por estreptococos suele ser glucosa (Boeriu *et al.*, 2013), aunque algunos autores reportaron la utilización de sacarosa y almidón (Liu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006).

En 2009, Im *et al.*, estudiaron la producción de HA por *Streptococcus* sp. ID9102, empleando nueve fuentes de carbono diferentes (glucosa, fructosa, galactosa, manosa, lactosa, sacarosa, xilosa, dextrina y almidón soluble). Se encontró que esta bacteria podía crecer y producir HA en todas las fuentes de carbono

empleadas y que la mayor producción del biopolímero se obtuvo con el medio que contenía glucosa.

Don y Shoparwe (2009) estudiaron el efecto de la concentración de glucosa en la producción de HA, en lote aireado y agitado, encontrando que al incrementar la concentración inicial de glucosa de 10 a 40 g/L, se obtenía una mayor producción de este biopolímero, pero a concentraciones de sustrato superiores a 50 g/L había un descenso en la producción de HA, lo cual fue atribuido a un efecto de inhibición por sustrato.

Por otro lado, Pires y Santana (2010), encontraron que la concentración de glucosa no presentaba un efecto significativo en la producción de biomasa y HA en cultivo por lotes, no aireados, salvo cuando el medio no tenía glucosa, en cuyo caso se presentó una menor producción de HA.

En la producción de HA se han empleado diversas fuentes de nitrógeno complejas como extracto de levadura, triptona, peptona de soya y polipeptona (Vázquez *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2011; Pires *et al.*, 2010; Don y Shoparwe, 2009, Duan *et al.*, 2008).

En 2011, Zee-Wei *et al.*, estudiaron el efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de HA por *S. zooepidemicus*, empleando extracto de levadura, triptona y una mezcla de extracto de levadura con triptona como fuentes de nitrógeno complejas, así como  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  y  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  como fuentes de nitrógeno inorgánicas. Ellos encontraron que las fuentes de nitrógeno complejas favorecían el crecimiento y la producción de HA por la bacteria, mientras que los peores rendimientos de biomasa y HA se obtuvieron al emplear  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ . Además, la bacteria presentó muy bajo crecimiento y no produjo HA en el medio que contenía  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ .

En 2009, Im *et al.*, estudiaron el efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de HA por *Streptococcus* sp. ID9102, usando fuentes orgánicas complejas y fuentes inorgánicas. Ellos encontraron que la bacteria no creció en ningún medio que contenía fuentes de nitrógeno inorgánicas, pero que la bacteria sí fue capaz de crecer y producir el biopolímero en los medios con fuentes de nitrógeno complejas. Fueron de especial importancia los medios que contenían extracto de levadura y peptona de caseína, ya que permitieron obtener la mayor producción de HA.

En 2012, Benedini estudió la producción de HA en cultivo sumergido suplementado con peptonas vegetales (peptona de trigo, de papa, de soya y una mezcla de peptonas vegetales), obteniendo la mayor producción de este biopolímero en el medio que contenía peptona de soya.

También se ha explorado el uso de algunos desechos agroindustriales en la producción de este biopolímero. En el trabajo de Vázquez *et al.* (2010) se produjo HA en un medio que contenía aguas residuales del procesamiento de mejillones y peptona de vísceras de atún, como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, reduciendo el costo de producción en más de 50%, en relación al medio control que contenía glucosa y triptona.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El HA es un biopolímero de alto valor, ya que éste y sus derivados poseen importantes aplicaciones en el área médica y cosmética (Kogan *et al.*, 2007).

En la actualidad, el HA se extrae tanto de tejidos animales (crestas de gallo) como por fermentación microbiana. Sin embargo, el HA extraído de fuentes animales requiere una purificación extensiva, siendo un proceso costoso, laborioso y que genera una gran cantidad de residuos químicos (Boeriu *et al.*, 2013; Vázquez *et al.*, 2013).

El HA producido por vía microbiana se extrae con relativa facilidad y con altos rendimientos. Además de que, al ser idéntico al HA animal, no es inmunogénico, por lo que representa una excelente fuente de HA de grado médico (Boeriu *et al.*, 2013).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la producción y caracterización de HA por cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920, en caldo de soya y tripticaseína, ya que este medio de cultivo no ha sido utilizado en la producción de este biopolímero.



#### **4. HIPÓTESIS**

La concentración de glucosa inicial y la agitación tienen un efecto en el rendimiento de HA producido por cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

Estudio de la producción de ácido hialurónico mediante el cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*.

##### **5.2 Objetivos particulares**

- Determinación del efecto de la concentración de glucosa inicial en la producción de HA.
- Determinación del efecto de la agitación en la producción del biopolímero.
- Caracterización química del HA obtenido.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Microorganismo

Se empleó la cepa *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 39920, de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, Estados Unidos).

La bacteria se adquirió en forma de un *pellet* liofilizado, el cual fue rehidratado con 0.5 mL de caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) (Anexo 11.1), y transferido a un tubo con 5 mL del mismo medio, incubándose a 37°C por 24 h, según las recomendaciones del proveedor. Posteriormente, se hizo una tinción Gram de la bacteria para verificar su pureza y morfología.

#### 6.1.1 Conservación del microorganismo

La cepa se conservó en un cultivo *stock* en caldo BHI (15% v/v de glicerol) a -20°C. Se agregaron 700 µL de un cultivo fresco de la bacteria (12 a 16 h de incubación, 37 °C) a un criovial con 300 µL de glicerol al 50 % v/v.

### 6.2 Preparación del inóculo

Se transfirieron 0.100 mL de un cultivo *stock* de la bacteria (en caldo BHI, 15 % v/v de glicerol) a un tubo con 5 mL de caldo BHI, mismo que se incubó a 37 °C por 24 h. Posteriormente, este cultivo se transfirió por estriado a un tubo de agar de soya y tripticaseína (TS) inclinado, el cual fue incubado a 37°C por 24 h. El inóculo se preparó transfiriendo asadas cargadas del cultivo en agar TS inclinado a un matraz Erlenmeyer con 200 mL de caldo TS (Anexo 11.2), incubándose a 37°C por 24 h.

### 6.2.2 Estandarización del inóculo

Con la finalidad de estandarizar el inóculo, se determinó la D.O.<sub>560</sub> (Densidad Óptica a 560 nm) y las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) del mismo, por triplicado. Las UFC se determinaron por el método de dilución y cuenta en placas. Se transfirió 1.0 mL del inóculo a un tubo con 9.0 mL de solución salina isotónica (SSI), obteniéndose así la dilución  $10^{-1}$ , a partir de la cual se prepararon diluciones centesimales ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-9}$ ), se transfirieron 100  $\mu$ L de cada dilución a placas de agar TS y se esparció el volumen uniformemente por toda la superficie de la placa con ayuda de una varilla de vidrio en forma de “L”. Las placas fueron incubadas de forma invertida a 37 °C por 24 h y se realizó la cuenta en las placas que contenían de 30 a 300 colonias. Finalmente, las UFC presentes en cada placa se calcularon mediante la ecuación (1).

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{número de colonias}}{(\text{Dilución})(0.1 \text{ mL})} \quad (1)$$

### 6.3 Establecimiento del método turbidimétrico de cuantificación del ácido hialurónico

Se probaron dos modificaciones del método turbidimétrico del bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para la cuantificación de HA, de acuerdo con Chen y Wang (2009) y con Di Ferrante (1956).

En la modificación del método propuesta por Chen y Wang (2009), se agregó 1.0 mL de reactivo CTAB a 0.5 mL de la solución de HA (en agua desionizada), se homogeneizaron los tubos y se incubaron a 30 °C por 10 minutos. Se midió inmediatamente la D.O. de los tubos a 400 nm (Genesys 6, Thermo Spectronic, Estados Unidos), usando como blanco agua desionizada (tratada de la misma forma que las muestras). Las determinaciones se hicieron por triplicado (Anexo 11.1).

En el método propuesto por Di Ferrante (1956), se prepararon soluciones de HA en buffer de acetatos 0.2 M, a pH 6, con NaCl a una concentración de 0.15 M. Posteriormente, se colocaron 0.5 mL de las soluciones de HA en tubos de ensayo y estos se pusieron a incubar en baño de agua a 37 °C (Bio Rad, Estados Unidos) por 15 min. Luego, se agregó 1 mL del reactivo CTAB (previamente atemperado a 37 °C) y se mezcló el contenido del tubo por inversión. Finalmente, se determinó la D.O. a 400 nm, dentro de los primeros 10 min de haber agregado el reactivo CTAB. Las determinaciones se hicieron por triplicado y se empleó buffer de acetatos como blanco (tratado de la misma forma que las muestras) (Anexo 11.2).

Las curvas de calibración de ambos métodos de cuantificación se prepararon con HA comercial de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* (Sigma Aldrich, Estados Unidos).

## **6.4 CULTIVO SUMERGIDO**

La producción de HA se realizó en cultivo sumergido de la bacteria *S. equi subsp. zooepidemicus*, con la finalidad de estudiar el efecto de la concentración de glucosa inicial, así como de la agitación y la aireación en el rendimiento y las características químicas del biopolímero obtenido.

### **6.4.1 Determinación del efecto de la concentración de glucosa inicial en cultivo sumergido estático**

Como una primera etapa, se determinó el efecto de la concentración de glucosa inicial (CGI) en cultivo sumergido estático, en matraces Erlenmeyer de 125 mL. El volumen de trabajo fue de 50 mL, con un 10 % v/v de inóculo. Se utilizó caldo TS, con un pH inicial de 7.5, el cual se ajustó con una solución de NaOH 1 M. Se estudiaron tres niveles de CGI: 2.5, 5 y 10 g/L. Los matraces con caldo TS y una solución de glucosa fueron esterilizados por separado a 121°C por 15 min, y la glucosa se agregó asépticamente al medio de cultivo antes de la inoculación. Los cultivos se incubaron a 37 °C, sin control de pH, tomándose muestras a las 0, 2, 4,

6, 8, 10, 12, 18, 24 y 48 h, por duplicado, a las cuales se les determinó la producción de biomasa, la D.O. <sub>560</sub>, el consumo de glucosa, el pH, la concentración de proteína soluble y la producción de HA.

#### **6.4.2 Determinación del efecto de la agitación en cultivo sumergido aireado**

Con la finalidad de determinar el efecto de la agitación y la aireación en la producción de HA, se realizaron cultivos sumergidos en un biorreactor de 3 L con consola de control (Applikon, Holanda), empleándose un volumen de trabajo de 1.6 L. Los niveles de agitación probados fueron 200, 400 y 600 rpm, utilizando caldo TS con una CGI de 5 g/L, se ajustó el pH inicial del medio a 7.5 con una solución de NaOH 1 M. La glucosa se esterilizó por separado y se agregó asépticamente al medio previo a la inoculación. Las fermentaciones se efectuaron a 37 °C, sin control de pH y con una aireación de 1 vvm. Se tomaron muestras de 50 mL por duplicado a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 h, a las cuales se les determinó la producción de biomasa, la D.O. <sub>560</sub>, el consumo de glucosa, el pH, la concentración de proteína soluble y la producción de HA. Los resultados fueron comparados con el cultivo sumergido correspondiente al nivel de CGI de 5 g/L del sistema estático (0 rpm de agitación).

### **6.5 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS**

#### **6.5.1 Determinación del crecimiento bacteriano**

Se determinó la biomasa del cultivo por el método gravimétrico. La biomasa se separó del medio líquido por centrifugación a baja temperatura (4 °C). Los cultivos del sistema estático fueron centrifugados a 8,000 rpm por 20 min (modelo Sorvall Legend XTR, Thermo Fisher Scientific, Alemania), mientras que la biomasa de los cultivos del sistema agitado se separó mediante una centrifugación a 12,000 rpm por 20 min (modelo J2-M1, Beckman, Estados Unidos), y el *pellet* fue lavado con

agua destilada. Finalmente, la biomasa se secó 110°C por 24 h. Además, se determinó la D.O.<sub>560</sub> de las muestras, con un espectrofotómetro.

### **6.5.2 Determinación del consumo de glucosa**

Los azúcares reductores se determinaron en el medio de cultivo libre de biomasa mediante el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

La técnica se llevó a cabo adicionando 0.5 mL de reactivo DNS a 0.5 mL de muestra (o una dilución de la misma), dentro de tubos de ensayo. Las soluciones se homogeneizaron con un vórtex y los tubos se incubaron a baño maría durante siete minutos. Finalmente, los tubos se enfriaron mediante un baño de agua con hielo y el contenido de los mismos se diluyó con 4 mL de agua destilada. Se midió la absorbancia de las muestras a 575 nm, después de homogeneizar el contenido de los tubos y se empleó agua destilada como blanco (tratada de la misma manera que las muestras). La concentración de azúcares reductores en la muestra se calculó con base en una curva de calibración con glucosa (Anexo 11.3).

### **6.5.3 Determinación del pH**

El pH de las muestras del sistema estático fue determinado con un potenciómetro (modelo pH 210 Microprocessor pH Meter, Hanna Instruments, Estados Unidos) y el pH de las muestras del sistema agitado fue determinado *in situ* con un electrodo de pH acoplado a la consola del biorreactor (Applisens, Holanda).

#### **6.5.4 Determinación de proteína soluble**

La proteína soluble se determinó en el medio de cultivo libre de biomasa por el método de Lowry-Peterson (Peterson, 1977).

Para este análisis, se añadió 1 mL del reactivo A de Lowry a 1 mL de muestra (o una dilución de la misma), dentro de tubos de ensayo. Estos tubos fueron homogeneizados en un vórtex e incubados a 30 °C por 10 min. Posteriormente, se agregaron 0.5 mL del reactivo B de Lowry, homogeneizando nuevamente e incubando a 30 °C por 30 min. Finalmente, se midió la absorbancia de las soluciones a 750 nm. Las determinaciones se hicieron por triplicado y se empleó agua destilada (con el mismo tratamiento que las muestras) como blanco. La concentración de proteína en la muestra se calculó con base en una curva de calibración con Seroalbúmina bovina (BSA) (Anexo 11.4).

#### **6.5.5 Extracción del ácido hialurónico**

La extracción de HA se efectuó de acuerdo al procedimiento descrito por Pires y Santana (2010). El HA del medio libre de biomasa fue precipitado con etanol absoluto, en una proporción 1:1.5 (medio:etanol), dicha solución fue refrigerada a 4 °C durante 1 h. El HA se separó del medio por centrifugación a 8,000 rpm por 20 min y el *pellet* se redisolvió en una solución de NaCl 0.15 M. Se efectuaron tres pasos de precipitación y redisolución del HA. El *pellet* correspondiente a la tercera precipitación con etanol fue liofilizado (LABCONCO, Estados Unidos) para análisis posteriores.

#### **6.5.6 Cuantificación del ácido hialurónico**

La concentración del HA se determinó por el método turbidimétrico CTAB reportado por Di Ferrante (1956). (Anexo 11.2).

## **6.6. CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO**

El biopolímero producido en este trabajo se caracterizó mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H-NMR}$ ) con el objetivo de verificar la pureza y existencia de los grupos funcionales característicos del HA. Además, se determinó el peso molecular (Mw) y el índice de polidispersidad, que son parámetros importantes de calidad, mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

### **6.6.1 Análisis por espectroscopía de infrarrojo FTIR**

Las muestras liofilizadas se sometieron a un análisis de espectroscopía de FTIR, para detectar la presencia de los diferentes grupos amino, carboxilo e hidroxilo característicos del HA. Las muestras se pulverizaron y se obtuvieron los espectros de las mismas y del HA comercial, en un sistema de espectroscopía de FTIR con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) equipado con un cristal de selenuro de zinc (modelo Spectrum 100 ATR-FTIR, Perkin Elmer, Estados Unidos) aplicando 16 escaneos por muestra, de 650 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### **6.6.2 Análisis por resonancia magnética nuclear de protón $^1\text{H-NMR}$**

Se obtuvo el espectro  $^1\text{H-NMR}$  de una muestra de HA producida en el cultivo agitado a 400 rpm, así como de un reactivo comercial de HA. Para la obtención de los espectros, se disolvieron 10 mg de cada muestra en 800  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ , por 12 h a temperatura ambiente. La muestra de HA fue analizada en un espectrómetro Bruker AVANCE III 500 y el reactivo comercial de HA en un espectrómetro Bruker-Ultrashield 300, a 300 K, realizándose al menos 32 barridos de la muestra. Los espectros fueron analizados en el software SpinWorks 4.



### 6.6.3 Determinación del peso molecular del ácido hialurónico

Se empleó la técnica de SEC para determinar el peso molecular del HA obtenido en cada tiempo de muestreo del cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* con agitación de 400 rpm. Se prepararon soluciones con una concentración de 1 mg/mL de muestra en buffer de fosfatos 1 M (pH=7), las cuales fueron filtradas en membranas de 0.25 µm. Posteriormente, las muestras fueron analizadas en un equipo HPLC Waters con automuestreador (Rev 3.1), con un detector multiángulo de dispersión de luz láser (Wyatt Technology DAWN EOS) y un detector de índice de refracción (Shimadzu/ UFCL RID – 10 A). Se emplearon las columnas PL aquagel OH mixed M 8 µm y PL aquagel OH mixed H 8 µm (Agilent, Estados Unidos), las cuales fueron dispuestas en serie y mantenidas a temperatura ambiente, el flujo de la fase móvil fue de 0.5 mL/min. La calibración del equipo se hizo con un estándar de pululano (200 KDa) y el análisis de los datos se realizó en el software Astra 6.1.

### 6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianza (ANOVA), empleando un nivel de significancia ( $\alpha$ ) igual a 0.05. En los casos en que las variables estudiadas fueron significativas ( $p \leq 0.05$ ), se utilizó el método de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer, con un  $\alpha = 0.05$ , a fin de conocer qué tratamientos presentaban diferencia significativa. Los análisis estadísticos se hicieron con el paquete NCSS 2007.

Por otro lado, los datos de producción de biomasa y de HA fueron modelados por Gompertz, como se muestra en la ecuación (2).

$$Y = Ae(-be^{(-\mu t)}) \quad (2)$$

Donde  $A$  es la máxima producción de biomasa o HA estimada por el modelo,  $b$  es un parámetro no biológico relacionado con las condiciones iniciales del cultivo,  $\mu$  es la tasa de crecimiento o producción del biopolímero y  $t$  es el tiempo de cultivo (Zwietering et al., 1990). Se empleó el programa STATISTICA 7 para ajustar los datos al modelo.

## VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Microorganismo

El microorganismo fue propagado y se verificó su pureza mediante un análisis microscópico haciendo una tinción Gram del cultivo. Se observó que *S. equi* subsp. *zoepidemicus* era una bacteria Gram positiva, con forma de coco, con agrupaciones típicas de estreptococos, encontrándose como pares o cadenas (Figura 3).

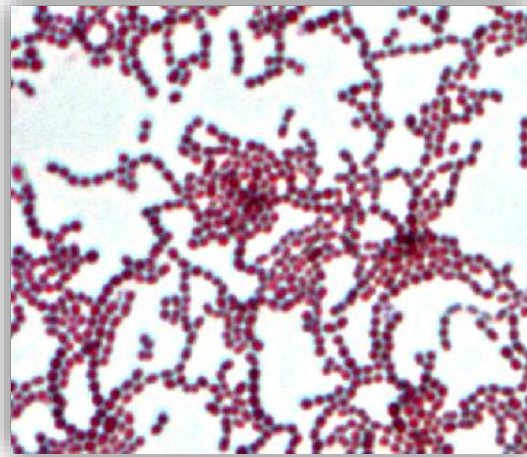


Figura 3. Tinción Gram de *S. equi* subsp. *zoepidemicus*, observada al microscopio óptico (1000 X).

### 7.2 Estandarización del inóculo

Se determinó que el inóculo preparado a partir de agar TS inclinado presentaba una D.O.<sub>560</sub> de  $0.823 \pm 0.032$  y  $6.63 \times 10^7$  UFC/mL.

### **7.3 Establecimiento del método de cuantificación de HA**

El método turbidimétrico CTAB se basa en la formación de complejos relativamente insolubles entre el HA y el reactivo CTAB. La cantidad de turbidez desarrollada cuando el CTAB es añadido a una solución de este biopolímero es proporcional a la cantidad de HA presente en el sistema (Di Ferrante, 1956).

Con el método turbidimétrico CTAB propuesto por Di Ferrante (1956) se determinaron concentraciones más altas dentro del intervalo lineal de la curva de calibración en comparación con la modificación propuesta por Chen y Wang (2009). Es por esto que se decidió seguir trabajando con el método turbidimétrico reportado por Di Ferrante (1956).

### **7.4 CULTIVO SUMERGIDO**

#### **7.4.1 Efecto de la concentración de glucosa inicial en cultivo sumergido estático**

La primera etapa de este trabajo consistió en determinar el efecto de la CGI en la producción de HA por cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* en caldo TS, para lo cual se estudiaron tres niveles de CGI, que fueron 2.5, 5 y 10 g/L.

A continuación, se presentan los perfiles de biomasa (D.O.<sub>560</sub>), glucosa, HA y pH durante el cultivo estático con el nivel más bajo de CGI probado (Figura 4). El crecimiento de la bacteria se dividió en tres fases: una fase lag (0-2 h), una fase exponencial (2-8 h) y una fase estacionaria (8-48 h). Durante la fase exponencial hubo un rápido incremento de biomasa y de la concentración del producto (HA), lo cual se realizó a expensas de la fuente de carbono, que fue consumida durante las primeras 8 h de cultivo. Una vez que la bacteria entró en la fase estacionaria, la concentración de HA permaneció constante, lo cual concuerda con lo obtenido por

Duan *et al.* (2008), quienes mencionan que durante esta fase de crecimiento se pierde la capacidad de síntesis del biopolímero.

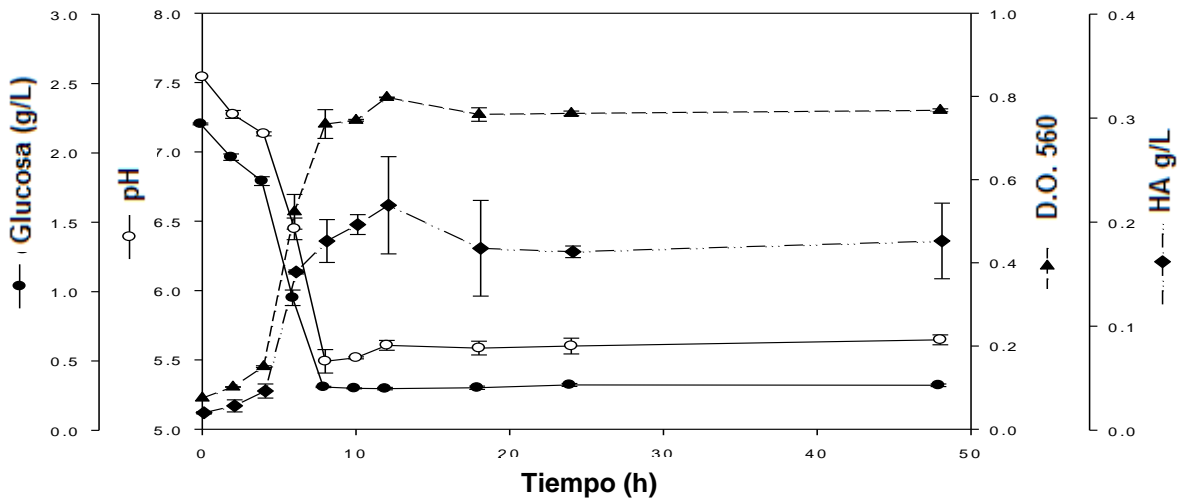


Figura 4. Cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* con una CGI de 2.5 g/L. Glucosa (●), pH (○), D.O.<sub>560</sub> (▲) y HA (◆).

#### 7.4.1.1 Consumo de glucosa

La glucosa fue el sustrato limitante empleado por la bacteria para su crecimiento y producción de HA. Como puede observarse, la fuente de carbono fue consumida durante las primeras 8-10 h de cultivo y después de este tiempo su concentración permaneció constante (Figura 5) ( $p < 0.0001$ , Anexo 11.9.1).

Se encontró que el consumo de glucosa fue afectado por la CGI y que dicho consumo fue mayor al aumentar el nivel de la misma (Tabla 3) ( $p = 0.0003$ , Anexo 11.9.2).

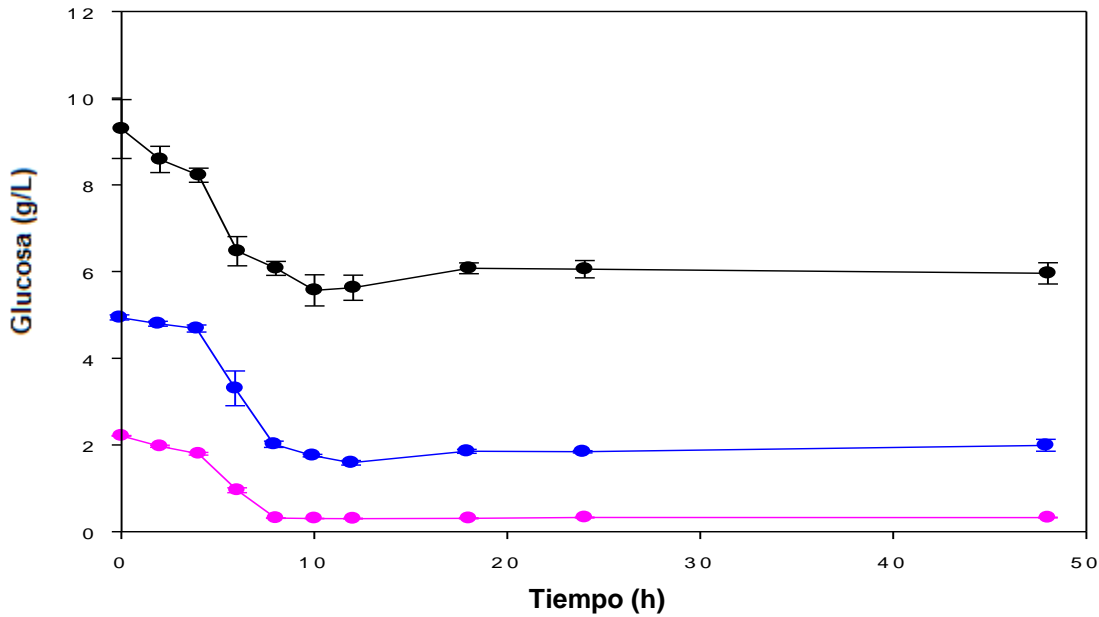


Figura 5. Concentración de glucosa durante el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. CGI 2.5 (●), CGI 5 (●), CGI 10 (●).

Tabla 3. Consumo de glucosa respecto al nivel de CGI empleado en el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*.

CGI (g/L)	Consumo de glucosa (g/L)*
2.5	1.88 ± 0.01 <sup>a</sup>
5	2.92 ± 0.04 <sup>b</sup>
10	3.32 ± 0.08 <sup>c</sup>

\*Consumo de glucosa a las 48 h de cultivo

\*\*Las letras denotan grupos significativamente diferentes (ANOVA y prueba de Tukey-Kramer,  $\alpha = 0.05$ )

A pesar de que se incrementó el consumo de glucosa al aumentar la CGI, quedó una cantidad considerable de sustrato sin consumir, en los cultivos con CGI de 5 y 10 g/L. En 2010, Pires *et al.*, reportaron un comportamiento similar en cultivo sumergido de esta bacteria (en matraces con agitación), la cual sólo consumió de 3.61 a 19.9 g/L de fuente de carbono, a pesar de que ésta fue suministrada al

medio en una concentración inicial de 45 g/L. Esto podría atribuirse a una deficiente transferencia de masa de los nutrientes hacia las células, pues se ha encontrado que conforme se produce el HA, aumenta la viscosidad del medio (Huang *et al.*, 2006).

#### 7.4.1.2 Perfil de pH

Se presentó una disminución en el pH del medio (Figura 6), como consecuencia del metabolismo homoláctico fermentativo que presenta *S. equi* subsp. *zooepidemicus* en cultivo anaerobio (Johns *et al.*, 1994). Además, el pH final del cultivo correspondiente a la CGI de 2.5 g/L fue menor al pH final de los otros dos cultivos, posiblemente por una menor producción de ácido láctico debido a la limitación de la fuente de carbono comparado con los otros dos niveles de CGI.

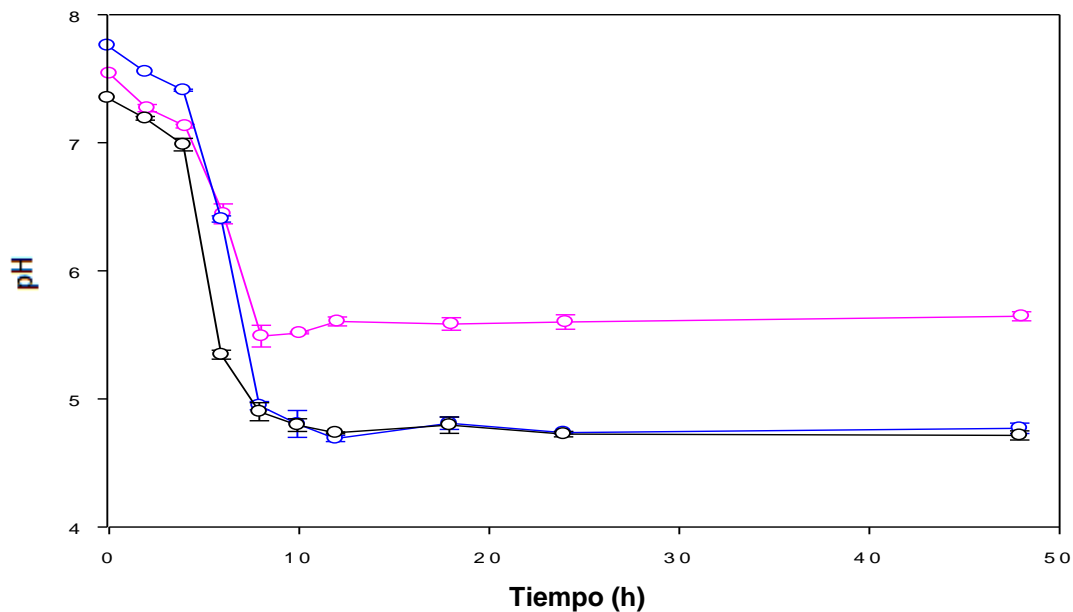


Figura 6. Cambio de pH durante el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. CGI 2.5 (○), CGI 5 (○), CGI 10 (○).

### 7.4.1.3 Proteína soluble

En la Figura 7 se observa que la concentración de proteína soluble no cambió durante el cultivo, para ninguno de los cultivos ( $p= 0.1198$ ,  $p= 0.1583$ ,  $p= 0.0667$ ; Anexo 11.9.3), por lo que la bacteria no estuvo limitada por la fuente de nitrógeno.

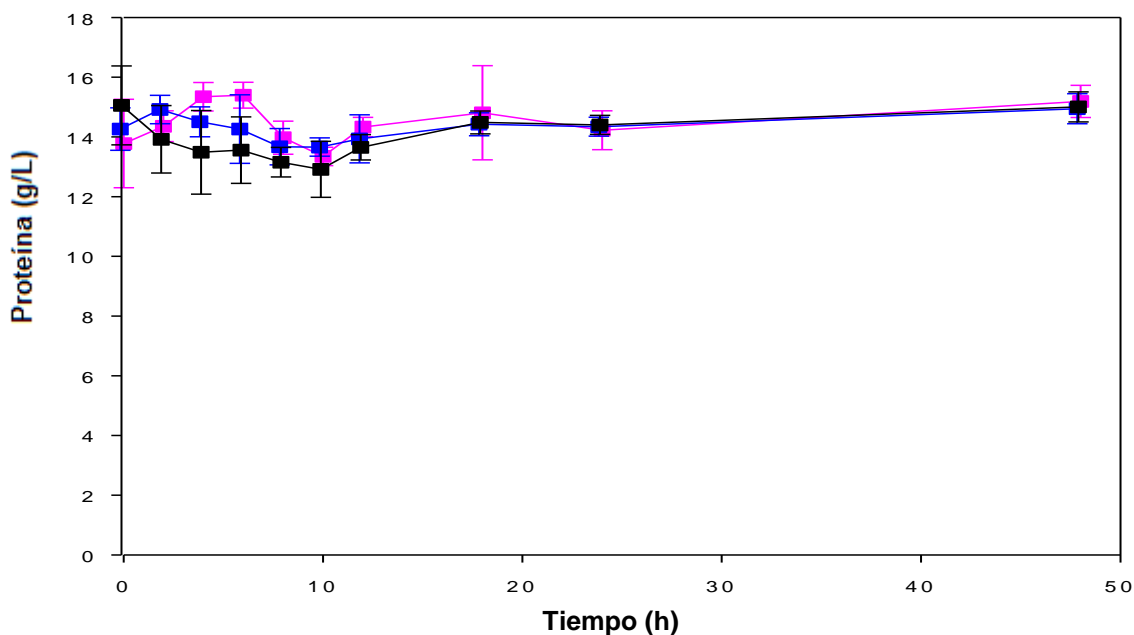


Figura 7. Concentración de proteína soluble durante el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. CGI 2.5 (■), CGI 5 (■), CGI 10 (■).

### 7.4.1.4 Crecimiento bacteriano

En la Figura 8, puede observarse que la bacteria se adaptó rápidamente a las condiciones de cultivo, presentando una fase exponencial corta de 8 h, seguida de una fase de crecimiento estacionario hasta las 48 h.



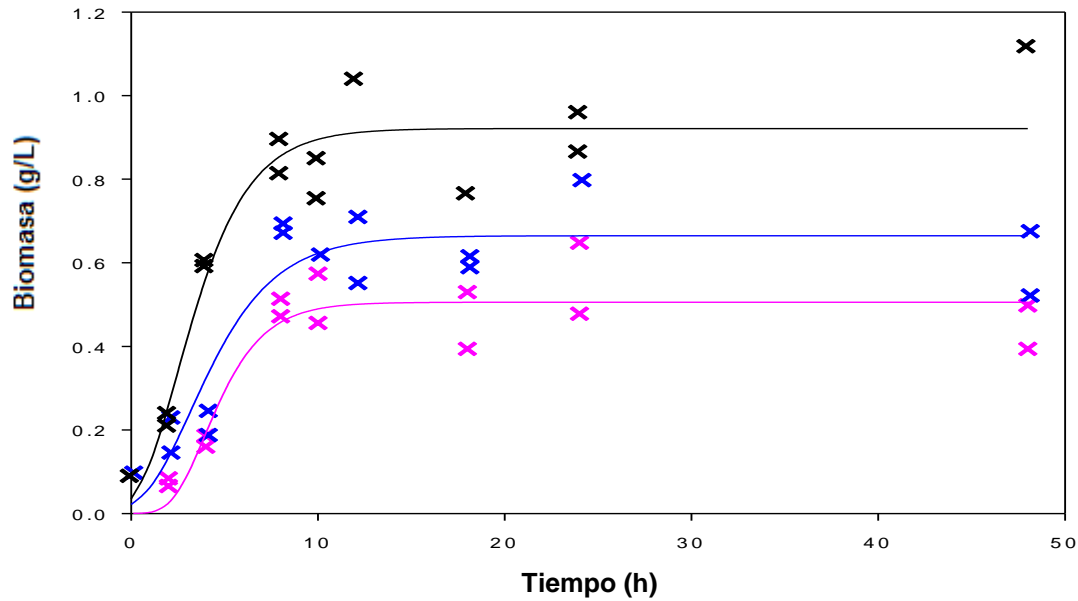


Figura 8. Biomasa producida durante el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. CGI 2.5 (x), CGI 5 (x), CGI 10 (x).

La CGI influyó en el crecimiento de la bacteria, obteniéndose un mayor crecimiento conforme se aumentó la concentración de la fuente de carbono (Tabla 4). Recordemos que el consumo de glucosa fue superior en los cultivos con los niveles más altos de CGI (5 y 10 g/L), lo cual se tradujo en una mayor producción de biomasa, debido a una mayor disponibilidad en la célula de fuente de carbono para biosíntesis y para la obtención de energía. Estos resultados coinciden por lo reportado por Zee-Wei *et al.* (2011), quienes encontraron que había una mayor producción de biomasa al incrementar la cantidad de fuente de carbono en el medio, de 20 a 30 g/L, en cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*.

Tabla 4. Parámetros cinéticos estimados para el crecimiento de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* en cultivo sumergido estático respecto al nivel de CGI.

CGI (g <sub>Glucosa</sub> /L)	A (g <sub>Biomasa</sub> /L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
2.5	0.51	0.57	0.86
5	0.66	0.40	0.85
10	0.92	0.47	0.91

### 7.4.1.5 Producción de ácido hialurónico

El biopolímero fue producido durante las primeras 8 h de cultivo (Figura 9), conforme fue asimilada la fuente de carbono.

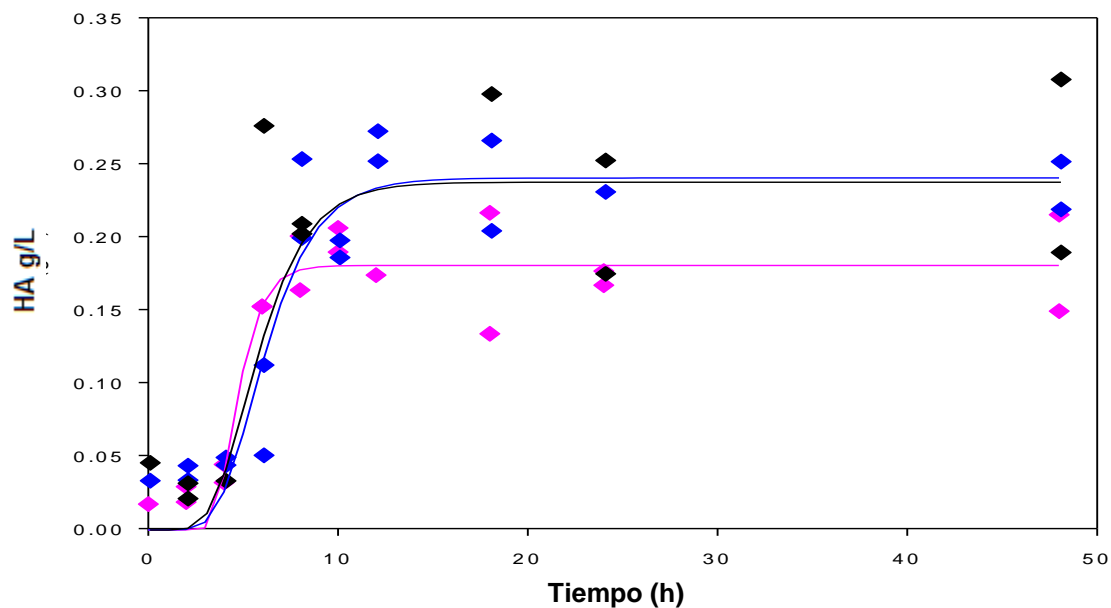


Figura 9. Producción de ácido hialurónico en cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. CGI 2.5 (♦), CGI 5 (◆), CGI 10 (◆).

En la tabla 5 se presentan los parámetros cinéticos estimados para la producción de HA, obtenidos como resultado de la variación en la CGI en el cultivo sumergido de la bacteria. Puede observarse que el aumento de la CGI de 2.5 a 5 g/L incrementó la producción del biopolímero, pero la producción de HA fue la misma para los cultivos con CGI de 5 y 10 g/L. Por otro lado, se encontró que ni el rendimiento ni la productividad volumétrica de HA ( $P_{HA}$ ) se vieron afectados por la CGI ( $p= 0.5317$ ,  $p= 0.5243$ , respectivamente; Anexo 11.9.4).

Tabla 5. Parámetros cinéticos estimados para la producción de HA por cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* respecto al nivel de CGI.

CGI (g <sub>glucosa</sub> /L)	A (g <sub>HA</sub> /L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	Y <sub>HA/S</sub> (g <sub>HA</sub> / g <sub>glucosa</sub> )	P <sub>HA</sub> (g <sub>HA</sub> /L· h)
2.5	0.18	1.13	0.89	0.088 ± 0.025 <sup>a</sup>	0.004 ± 0.001 <sup>a</sup>
5	0.24	0.54	0.87	0.069 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.005 ± 0.0005 <sup>a</sup>
10	0.24	0.55	0.83	0.061 ± 0.027 <sup>a</sup>	0.005 ± 0.002 <sup>a</sup>

\*Las letras denotan grupos significativamente diferentes (ANOVA y prueba de Tukey-Kramer,  $\alpha= 0.05$ )

La producción de HA bajo estas condiciones se encuentra dentro del intervalo obtenido por Pires *et al.* (2010), quienes produjeron de 0.10 a 0.89 g/L del biopolímero, en cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* en lote y con un alto suministro de fuente de carbono (45 g/L). Por otro lado, el rendimiento de HA coincide con lo reportado por Johns *et al.* (1994), quienes obtuvieron valores de entre 0.06 y 0.08 g<sub>HA</sub>/g<sub>glucosa</sub>, en cultivo anaerobio de *S. zooepidemicus*, dependiendo del pH del medio.

#### 7.4.2 Efecto de la agitación en cultivo sumergido aireado

En la segunda etapa se optó por agitar y airear el medio de cultivo, con la finalidad de mejorar la transferencia de masa (nutrientes y oxígeno) en el medio, y con ello incrementar el consumo del sustrato y la producción de HA por cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. Para esto, se probaron tres niveles de agitación, que fueron 200, 400 y 600 rpm, con 1 vvm de aireación y con una CGI de 5 g/L (que fue el nivel de CGI con el que se obtuvo la mayor producción de biopolímero en la primera etapa). Los resultados obtenidos fueron comparados con el cultivo estático correspondiente (CGI de 5 g/L), el cual también se denomina en esta sección como cultivo con agitación de 0 rpm.

En la Figura 10 se presentan los perfiles de biomasa (D.O.<sub>560</sub>), glucosa, HA y pH durante el cultivo agitado-aireado con el nivel de 400 rpm. La bacteria creció rápidamente, presentando una fase de crecimiento exponencial de 8 h, y posteriormente una fase de crecimiento estacionario corta (de las 8 a las 12 h); finalmente, de las 12 a las 48 h, la bacteria entró en una fase de muerte. La producción de HA ocurrió durante la fase exponencial y dejó de producirse a partir de la fase de crecimiento estacionario. La producción de HA fue de 0.54 g/L, que fue mayor a la del correspondiente cultivo sumergido estático.

Al igual que en el cultivo sumergido estático, el consumo de glucosa estuvo acompañado por un descenso en el pH del medio, lo cual podría deberse a la producción de ácidos orgánicos, como ácido láctico y ácido acético, ya que la bacteria presenta un metabolismo fermentativo mixto en cultivo aireado (Pires y Santana, 2010).

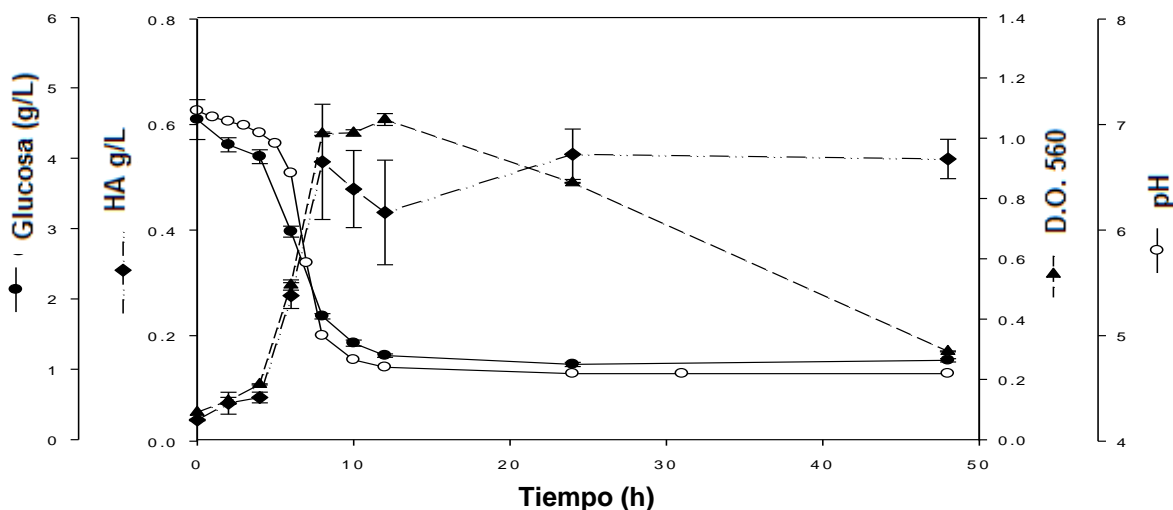


Figura 10. Cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* con una agitación de 400 rpm y 1 vvm de aireación. Glucosa (●), pH (○), D.O.<sub>560</sub> (▲) y HA (◆).

### 7.4.2.1 Consumo de glucosa

La glucosa fue consumida durante las primeras 10-12 h de cultivo y luego su concentración permaneció constante ( $p < 0.0001$ , Anexo 11.9.5). En la figura 11 se observa el perfil de glucosa a lo largo de cada cultivo evaluando diferentes niveles de agitación.

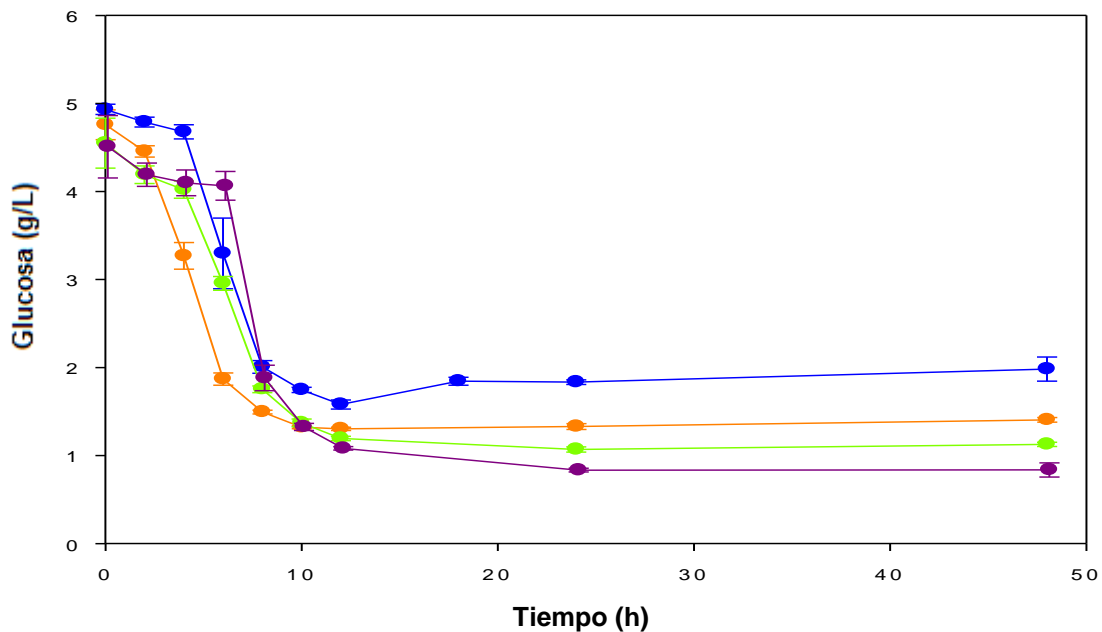


Figura 11. Concentración de glucosa durante el cultivo sumergido agitado de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. 0 rpm (●), 200 rpm (●), 400 rpm (●), 600 rpm (●).

En comparación con el cultivo estático, la glucosa fue consumida más rápidamente en el cultivo agitado a 200 rpm, mientras que se presentó un retraso en el consumo de sustrato con el nivel más alto de agitación. Esto podría atribuirse a que la agitación suave mejoró la transferencia de masa y permitió que la glucosa fuera rápidamente asimilada por la bacteria, mientras que a mayores niveles de agitación, las células necesitaron adaptarse a las condiciones de alto estrés de cizalla, por lo que les tomó más tiempo asimilar la fuente de carbono. Un efecto similar se observó en el trabajo de Huang *et al.* (2006), quien reportó que al

augmentar la agitación de cultivo de 200 a 400 rpm, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* tardaba más tiempo en crecer.

En la tabla 6 se presenta el consumo de glucosa como resultado del nivel de agitación. Este consumo fue mayor en los cultivos agitados-aireados, en comparación con el cultivo estático ( $p= 0.0023$ , Anexo 11.9.6).

Tabla 6. Consumo de glucosa respecto al nivel de agitación en el cultivo sumergido *S. equi* subsp. *zooepidemicus*

Agitación (rpm)	Consumo de glucosa (g/L)*
0	2.92 ± 0.04 <sup>a</sup>
200	3.21 ± 0.01 <sup>b</sup>
400	3.19 ± 0.02 <sup>b</sup>
600	3.37 ± 0.07 <sup>b</sup>

\*Consumo de glucosa a las 48 h de cultivo

\*\*Las letras denotan grupos significativamente diferentes (ANOVA y prueba de Tukey-Kramer,  $\alpha= 0.05$ )

#### 7.4.2.2 Perfil de pH

Se produjo un descenso de pH en el medio conforme fue consumida la fuente de glucosa (Figura 7.10).

Después de las 10-12 h que ya no hubo consumo de sustrato, el pH permaneció constante. La disminución de pH en el medio de cultivo se debe a que *S. equi* subsp. *zooepidemicus* presenta un metabolismo fermentativo tanto en condiciones anaerobias como aerobias, porque es un microorganismo anaerobio aerotolerante, el cual presenta un ciclo de Krebs incompleto y es incapaz de realizar la fosforilación oxidativa (Johns *et al.*, 1994; Fong Chong *et al.*, 2005; Huang *et al.*,

2006). Sin embargo, se ha reportado que el perfil de ácidos orgánicos producidos en ambas condiciones es diferente, ya que en condiciones anaerobias la bacteria presenta un metabolismo homoláctico fermentativo, mientras que en condiciones aerobias presenta un metabolismo fermentativo mixto, con producción de ácidos láctico, acético y fórmico, así como etanol (Pires y Santana, 2010).

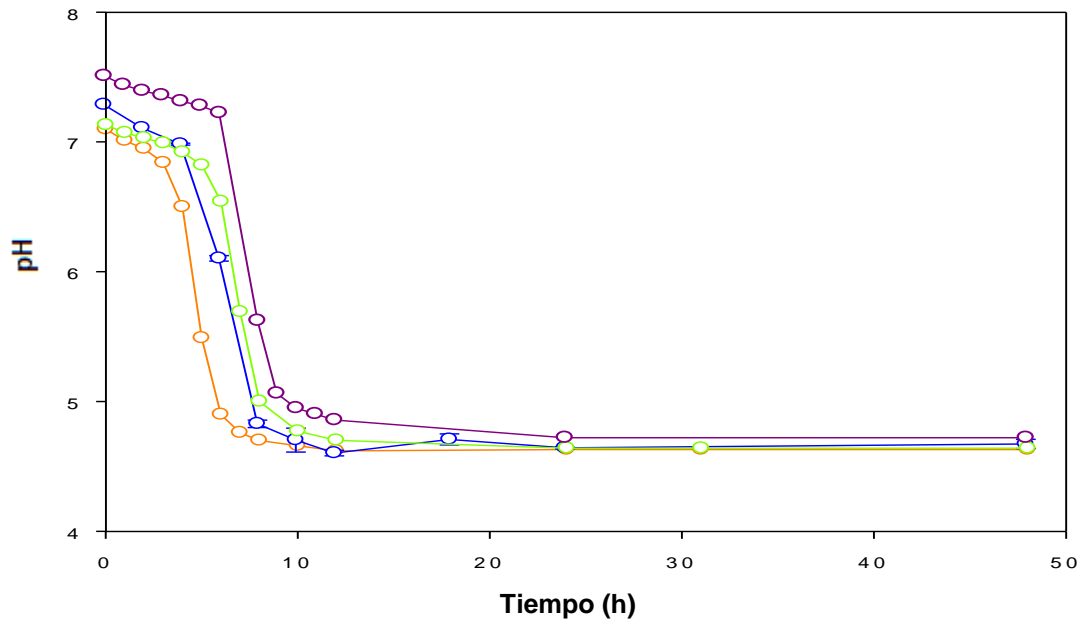


Figura 12. Cambio de pH durante el cultivo sumergido agitado de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. 0 rpm (○), 200 rpm (○), 400 rpm (○), 600 rpm (○).

#### 7.4.2.3 Proteína soluble

En la Figura 13, se observa que la concentración de proteína soluble no cambió durante el cultivo ( $p= 0.1583$ ,  $p= 0.0626$ ,  $p= 0.1143$  y  $p= 0.1514$ ; Anexo 11.9.7), por lo que la bacteria no estuvo limitada por la fuente de nitrógeno.

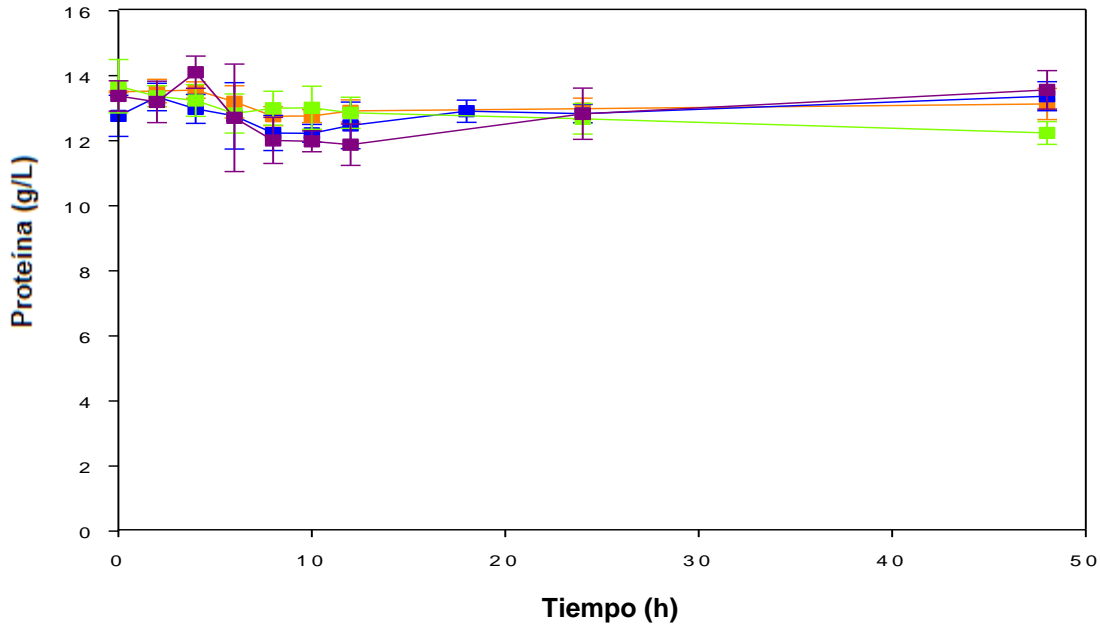


Figura 13. Concentración de proteína soluble determinada durante el cultivo sumergido agitado de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. 0 rpm (■), 200 rpm (■), 400 rpm (■), 600 rpm (■).

#### 7.4.2.4 Crecimiento microbiano

En la Figura 14, se aprecia que los cultivos presentaron una fase exponencial corta durante las primeras 8 h, misma que fue seguida por una fase de crecimiento estacionario hasta las 48 h (en el cultivo estático); sin embargo, en los cultivos con agitación la fase estacionaria se redujo (de las 8 a las 12 h), y fue seguida de una fase de muerte, la cual fue más pronunciada al aumentar el nivel de agitación.

En la tabla 7 se presentan los parámetros cinéticos estimados para el cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* como resultado de la variación en el nivel de agitación. La bacteria creció más en el sistema estático que en los cultivos agitados (los cuales tuvieron una producción de biomasa máxima similar). Sin embargo, demasiada agitación (400 y 600 rpm) resultó perjudicial, pues en estos cultivos la bacteria presentó una fase de muerte celular, posiblemente por un daño causado por el alto estrés de cizalla. No es la primera vez que esto ocurre, pues



algunos autores reportan una caída en la concentración de biomasa a partir de las 8 -10 h de cultivo de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, cuando la agitación fue de 600 rpm (Armstrong y Johns, 1997; Johns *et al.*, 1994).

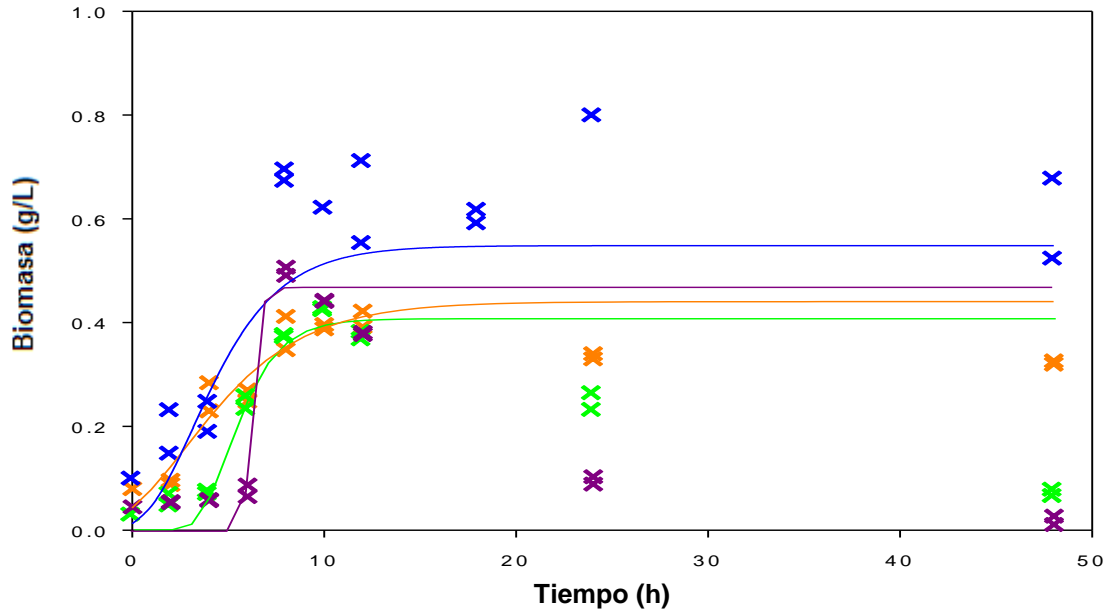


Figura 14. Biomasa producida durante el cultivo sumergido agitado de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. 0 rpm (x), 200 rpm (x), 400 rpm (x), 600 rpm (x).

Tabla 7. Parámetros cinéticos estimados para el crecimiento de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* en cultivo sumergido respecto al nivel de agitación

Agitación (rpm)	A (g <sub>Biomasa</sub> /L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
0	0.66	0.40	0.84
200	0.44	0.29	0.92
400	0.41	0.68	0.91
600	0.47	3.43	0.95

### 7.4.2.5 Producción de HA

El perfil de HA durante los cultivos del sistema agitado se muestra en la Figura 15. Como se puede apreciar, la producción de HA incrementó con la agitación del medio.

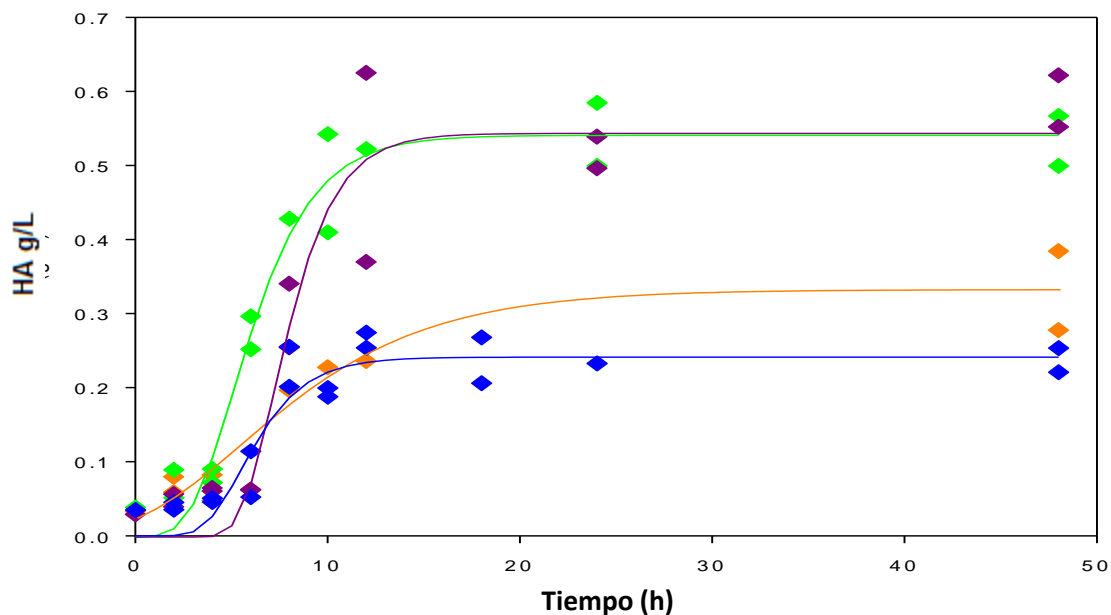


Figura 15. Producción de ácido hialurónico en cultivo sumergido agitado de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. 0 rpm (◆), 200 rpm (◆), 400 rpm (◆), 600 rpm (◆).

En la tabla 8, se presenta la producción global de HA, el rendimiento de producto a partir del sustrato ( $Y_{HA/S}$ ) y la productividad volumétrica de HA ( $P_{HA}$ ), obtenidos como resultado de la variación de la agitación en el cultivo sumergido de la bacteria.

Tabla 8. Parámetros cinéticos estimados para la producción de HA por cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* respecto al nivel de agitación.

Agitación (rpm)	A (g <sub>HA</sub> /L)	μ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	Y <sub>HA/S</sub> (g <sub>HA</sub> /g <sub>glucosa</sub> )	P <sub>HA</sub> (g <sub>HA</sub> /L·h)
0	0.24	0.54	0.87	0.069 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.006 ± 0.0005 <sup>a</sup>
200	0.33	0.18	0.93	0.093 ± 0.024 <sup>a</sup>	0.007 ± 0.002 <sup>a,b</sup>
400	0.54	0.44	0.95	0.156 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.011 ± 0.001 <sup>b,c</sup>
600	0.55	0.57	0.93	0.165 ± 0.011 <sup>b</sup>	0.012 ± 0.001 <sup>c</sup>

\*\*Las letras denotan grupos significativamente diferentes (ANOVA y prueba de Tukey-Kramer, α= 0.05)

El rendimiento de HA (Y<sub>HA/S</sub>) obtenido cuando la agitación fue de 200 rpm es similar al reportado por Pires y Santana (2010), que fue de 0.06 g<sub>HA</sub>/g<sub>glucosa</sub>, en cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, con agitación de 250 rpm.

La agitación del medio no solo mejoró la producción de HA, sino también el rendimiento de producto a partir de sustrato y la productividad volumétrica de este biopolímero (p=0.0078 y p=0.0094; Anexo 11.8.8). Los mejores resultados se obtuvieron con los niveles más altos de agitación (400 y 600 rpm) en los cuales se obtuvo una producción de biopolímero 2.25 y 2.3 veces mayor, respectivamente, en relación con el cultivo estático. El aumento en la producción de HA con los niveles de mayor agitación podría deberse a varios factores. Por un lado, la agitación-aireación se tradujo en un incremento en el consumo de glucosa (tabla 6), que fue utilizada para la síntesis del biopolímero. Por otro lado, se ha reportado que el oxígeno presenta un efecto estimulante en la biosíntesis del HA, requiriéndose oxígeno disuelto en al menos 5% de saturación para mostrar dicho efecto (Huang *et al.*, 2006). Esto ya había sido observado por Cleary y Larkin (1979), quienes sugieren que la cápsula de HA en *Streptococcus* funge un rol protector ante el oxígeno, que limita la difusión del este gas al interior de la célula.

## 7.5 CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO

En esta sección se presentan los resultados obtenidos por espectroscopía de FTIR,  $^1\text{H-NMR}$  y SEC para las muestras de HA obtenidas en el presente trabajo.

### 7.5.1 Caracterización de HA por espectroscopía de infrarrojo FTIR

A continuación, en la Figura 16, se presentan los espectros de FTIR de las muestras de HA producidas en este trabajo, bajo diferentes condiciones experimentales, así como el espectro de FTIR del HA comercial.

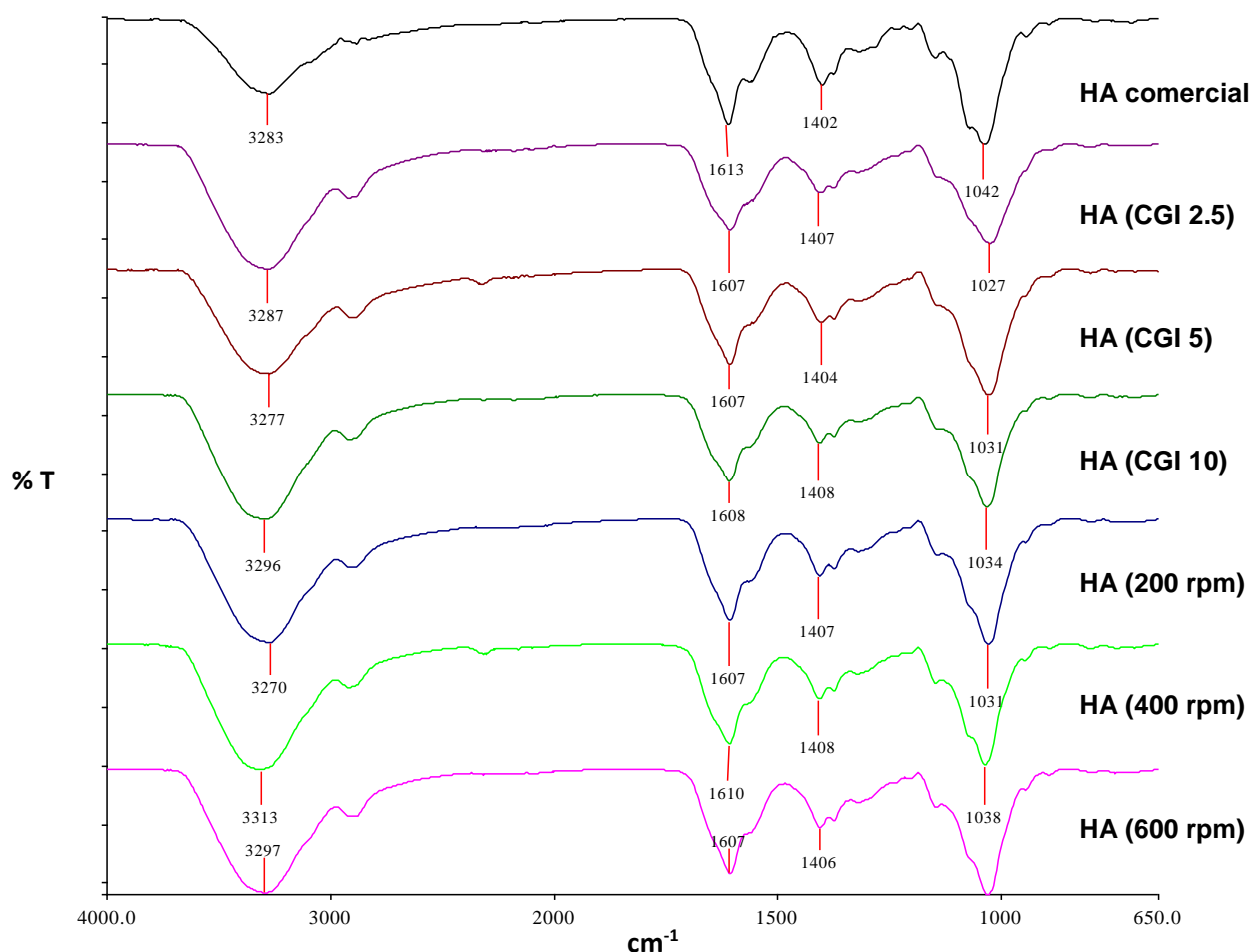


Figura 16. Espectros de FTIR del HA comercial y de las muestras de HA producidas por el cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zoepidemicus* bajo las diferentes condiciones experimentales empleadas en este trabajo.

Como puede observarse, el HA obtenido en los diversos cultivos presentó las mismas bandas características del HA. El espectro del HA comercial presentó cuatro bandas características: una a  $3283\text{ cm}^{-1}$ , que es típica del estiramiento del enlace O-H; otra que se encuentra a  $1613\text{ cm}^{-1}$ , que indica la flexión del enlace N-H del grupo amida; una a  $1402\text{ cm}^{-1}$  que representa el estiramiento del enlace C-O del grupo carbonilo de la amida; y finalmente, una banda a  $1042\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento de los enlaces C-O-C presentes en la molécula (Jagadeeswara Reddy y Karunakaran, 2013). Los espectros de FTIR correspondientes a las muestras de HA obtenidas en cada cultivo a través del tiempo se encuentran en el Anexo 11.7.

### **7.5.2 Caracterización del HA por resonancia magnética nuclear de protón**

#### **$^1\text{H-NMR}$**

Se analizó el espectro de  $^1\text{H-NMR}$  de HA comercial con la finalidad de hacer una comparación entre este y el biopolímero obtenido en el presente trabajo.

El espectro de  $^1\text{H-NMR}$  del HA comercial (Figura 17) presentó un desplazamiento químico a 1.18 y otro a 2.02 ppm que indican la presencia del grupo metileno y el grupo acetamido de la *N*-acetilglucosamina, respectivamente. Además, el masivo de 3.2 a 4 ppm indica la presencia de grupos hidroxilo en los diferentes entornos de la molécula (Pretsch *et al.*, 2009). El pico a 4.8 ppm corresponde al agua (Gottlieb *et al.*, 1997)

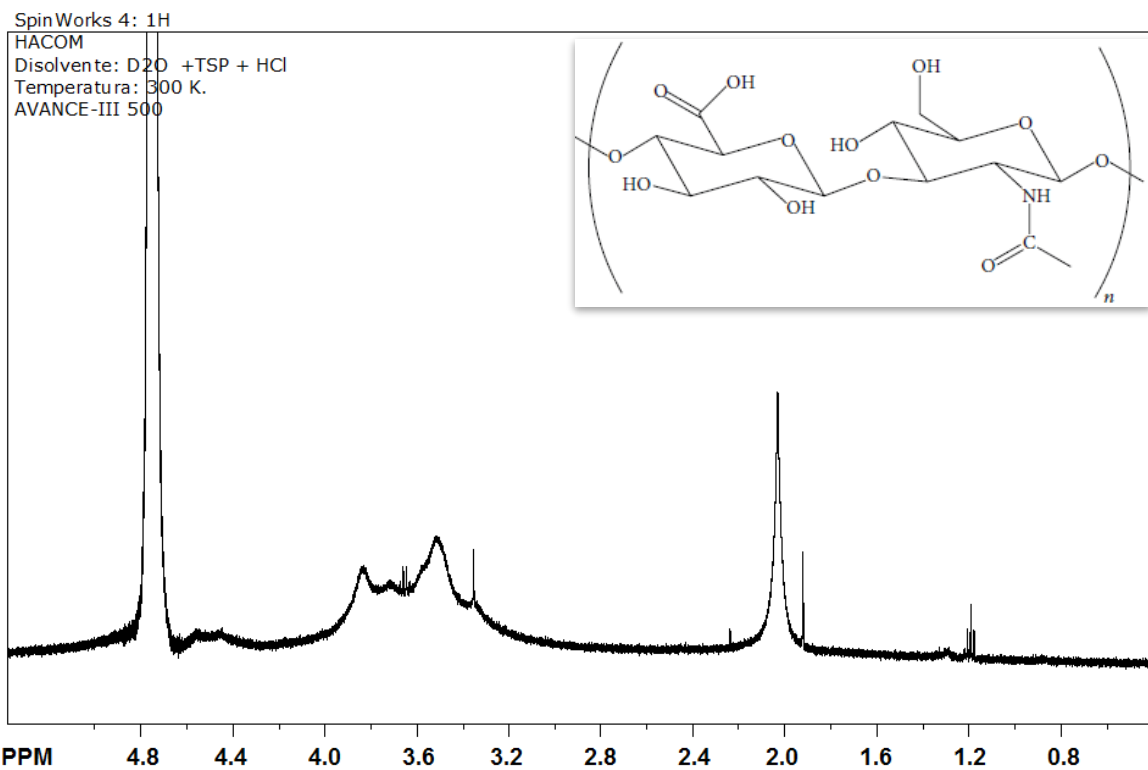


Figura 17. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  del HA comercial.

El espectro  $^1\text{H-NMR}$  del biopolímero producido en el cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* con agitación de 400 rpm (Figura 18) es similar al espectro del HA comercial (Figura 17). Ambos presentaron un pico a 2.02 ppm, que corresponde al grupo acetamido del residuo de la *N*-acetilglucosamina y un masivo de 3.2 a 4 ppm que corresponde a los grupos hidroxilo presentes en la molécula (Park *et al.*, 2010).

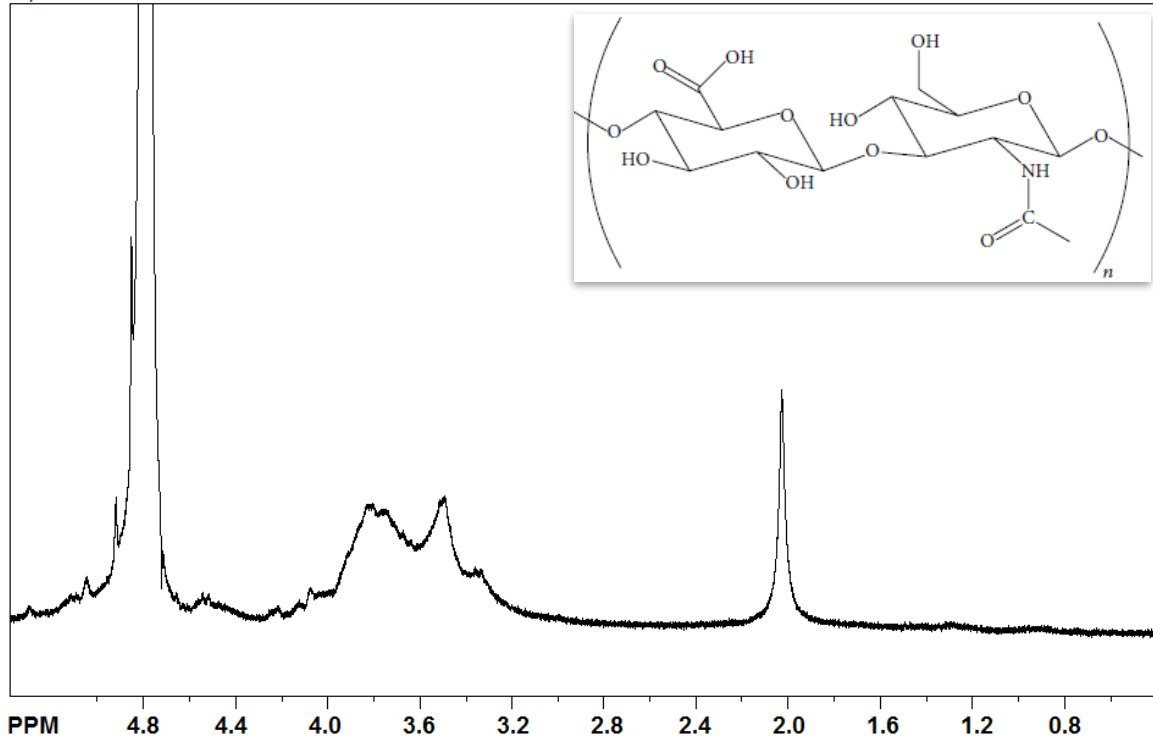


Figura 18. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  del HA producido en cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*.

### 7.5.3 Determinación del peso molecular del ácido hialurónico

Según Liu *et al.* (2011) el peso molecular es un parámetro de calidad importante para un producto de HA comercial, ya que define sus posibles aplicaciones, porque determina las propiedades reológicas del mismo y afecta la respuesta fisiológica en el organismo. El HA de alto peso molecular (superior a 10 kDa), presenta una buena viscoelasticidad, retención de humedad y mucoadhesión, las cuales son características deseables en las áreas de oftalmología, ortopedia, cicatrización de heridas y cosméticos. Mientras que, existen reportes de que el HA de bajo peso molecular (2-3.5 kDa), así como los oligosacáridos de HA, promueven la angiogénesis, inducen la expresión de mediadores de la inflamación e inhiben el crecimiento de tumores. Puesto que las funciones del HA varían con su peso molecular, es necesario que este presente un una baja polidispersidad para ser empleado en una determinada aplicación biomédica.

Se analizó el peso molecular del HA comercial con la finalidad de hacer una comparación entre este y el biopolímero obtenido en este trabajo.

A continuación, se presenta un cromatograma de SEC correspondiente al reactivo comercial de HA (Figura 19). El HA presentó un tiempo de retención de 19.80 – 29.32 min, un peso molecular ( $M_w$ ) de  $2.216 \times 10^6$  Da y un índice de polidispersidad de 1.083.

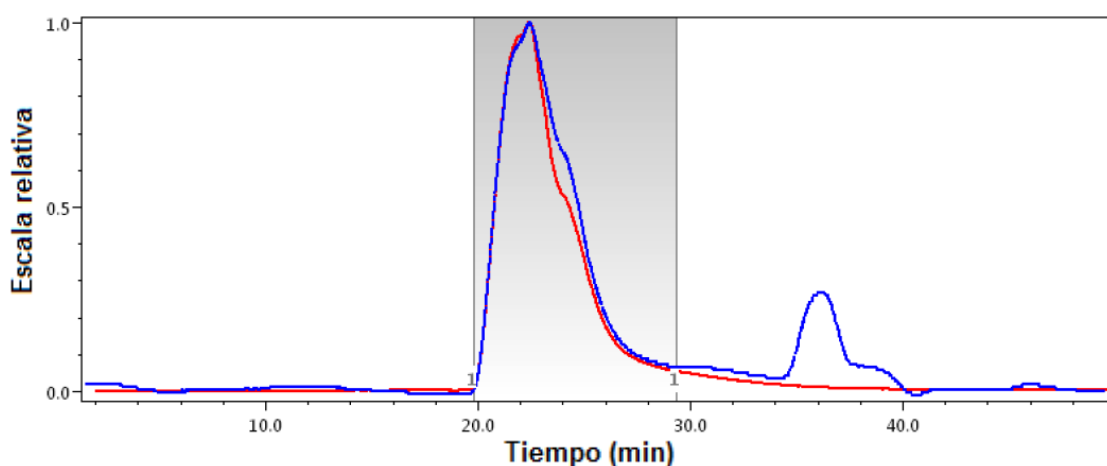


Figura 19. Cromatograma de SEC correspondiente a un reactivo comercial de HA. (-) Detector de dispersión de luz, (-) Detector de índice de refracción.

En la Figura 20 se presenta un cromatograma del HA producido en cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zoepidemicus* con una agitación de 400 rpm. El pico correspondiente al HA presentó un tiempo de retención de 19.75 – 27.01 min, un peso molecular ( $M_w$ ) de  $1.892 \times 10^6$  Da y un índice de polidispersidad de 1.016. A pesar de que el HA producido en este trabajo presentó un menor peso molecular que el reactivo de HA comercial; esto se vio compensado con un menor índice de polidispersidad.



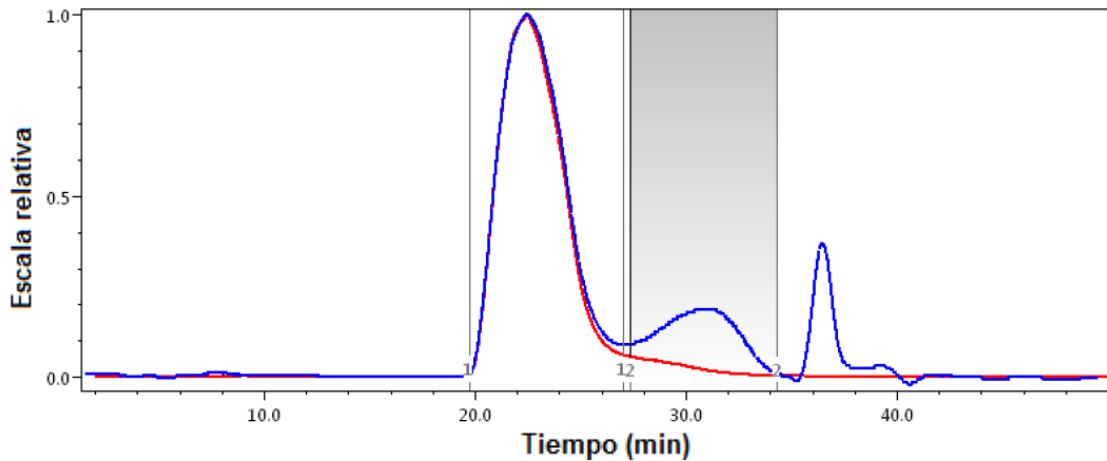


Figura 20. Cromatograma de SEC del HA producido por cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* con una agitación de 400 rpm. (-) Detector de dispersión de luz, (-) Detector de índice de refracción.

Con la finalidad de caracterizar el tamaño del biopolímero a lo largo de la fermentación se determinó el peso molecular de este de cada muestra obtenida a través del tiempo del cultivo con agitación de 400 rpm.

Los pesos moleculares ( $M_w$ ) de las muestras de HA obtenidas en el cultivo sumergido a 400 rpm se encontraron en el intervalo de  $8.95 \times 10^5$  -  $1.89 \times 10^6$  Da (Anexo 11.8), por lo que pueden considerarse como HA de alto peso molecular (Boeriu *et al.*, 2013), esto coincide con lo publicado por otros autores, quienes reportaron pesos moleculares de  $5.38 \times 10^5$  Da hasta  $3.2 \times 10^6$  Da, para el HA producido bajo diferentes condiciones experimentales (Patil *et al.*, 2010; Vázquez *et al.*, 2010; Armstrong y Johns, 1997). Asimismo, estas muestras presentaron índices de polidispersidad de 1.02 a 1.21, los cuales son menores a los reportados por Armstrong y Johns (1997), que obtuvieron índices de polidispersidad de 1.8 a 2.5.

En la figura 7.17, se observa que hubo un incremento en el peso molecular de las 6 a las 8 h, posteriormente, este permaneció constante de las 8 a las 24 h; sin embargo, de las 24 a las 48 h se registró una reducción del peso molecular de  $1.53 \times 10^6$  a  $9.25 \times 10^5$ . Por otro lado, el índice de polidispersidad disminuyó de las

6 a las 8 h (mientras era sintetizado el HA), permaneciendo constante de las 8 a las 12 h y seguido por un descenso de las 12 a las 48 h. Esta disminución del peso molecular y aumento en el índice de polidispersidad al final de la fermentación podría justificarse por la acción de la enzima hialuronidasa, que cataliza la hidrólisis de los enlaces glicosídicos del HA (Vázquez *et al.*, 2010).

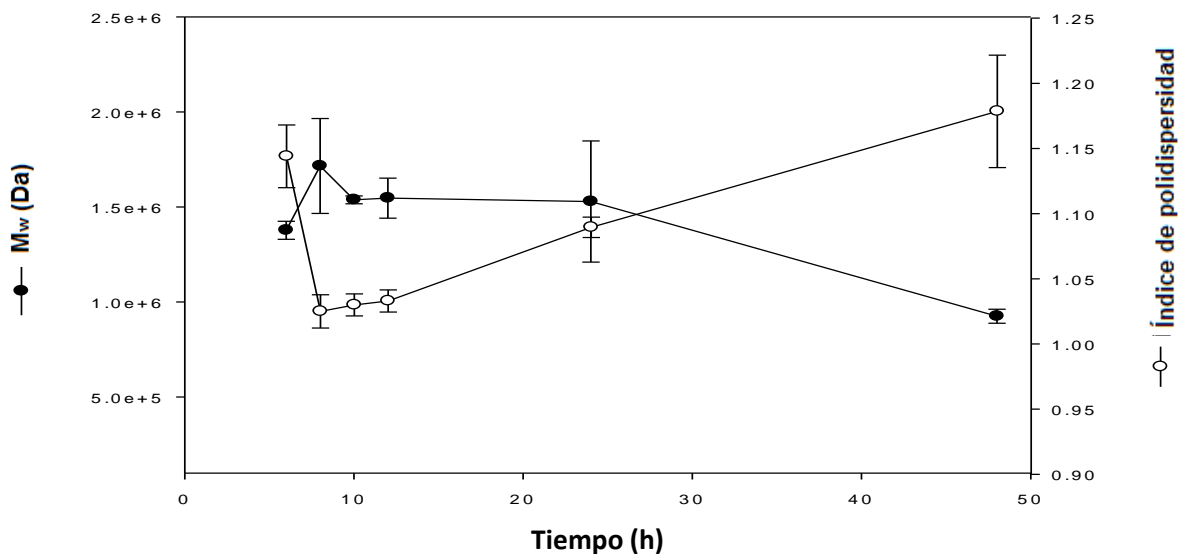


Figura 21. Perfil del peso molecular (●) y del índice de polidispersidad (○) del HA obtenido en el cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, con CGI de 5 g/L, agitación de 400 rpm y aireación de 1 vvm.

## VIII CONCLUSIONES

La CGI afectó la producción de biomasa, la cual incrementó conforme aumentó la concentración inicial de sustrato. Por otro lado, se incrementó la producción de HA al aumentar el nivel de CGI de 2.5 a 5 g/L, pero la producción de este biopolímero fue la misma para los niveles más altos de concentración de sustrato.

La agitación y aireación del medio de cultivo mejoraron el consumo de glucosa, así como la producción de biomasa y del biopolímero. Los rendimientos más altos de HA se obtuvieron con los niveles de agitación de 400 y 600 rpm. El rendimiento de HA ( $Y_{HA/S}$ ) fue 2.26 veces mayor al aumentar la agitación de 0 a 400 rpm.

Los espectros de FTIR del biopolímero extraído y purificado en cada cultivo presentaron las bandas características del HA. Por otro lado, el espectro de  $^1\text{H-NMR}$  del biopolímero producido en el cultivo sumergido con agitación de 400 rpm fue similar al del HA comercial.

Las muestras de HA obtenidas en el cultivo sumergido con agitación de 400 rpm presentaron un alto peso molecular ( $8.95 \times 10^5 - 1.89 \times 10^6$  Da), además de un bajo índice de polidispersidad (1.04-1.21), por lo que podrían emplearse en aplicaciones en las áreas de oftalmología, ortopedia, cicatrización de heridas y cosméticos. Por otro lado, se presentó una disminución con del peso molecular del biopolímero al prolongar el cultivo de 24 a 48 h, por lo que se recomienda acortar la duración de los cultivos.

## **IX SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS**

- Estudiar el efecto de la agitación en el peso molecular del biopolímero obtenido.
- Agregar un antiespumante en el medio para realizar el cultivo sumergido agitado.
- Fijar el pH del medio de cultivo.
- Explorar el uso de desechos agroindustriales en la formulación del medio de cultivo, a fin de sustituir las fuentes de carbono y nitrógeno comerciales.
- Desarrollo de nuevos métodos de purificación del HA.

## X REFERENCIAS

Armstrong DC y Johns MR. 1997. Culture conditions affect the molecular weight properties of Hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Applied and Environmental Microbiology 63(7):2759-2764.

Benedini LJ. 2012. Influência de peptonas vegetais no cultivo de *Streptococcus zooepidemicus* para a produção de ácido hialurônico. (Tesis de Maestría en Procesos Biotecnológicos) Facultad de Ingeniería Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Brasil.

Boeriu CG, Springer J, Kooy FK, Van den Broek LAM, Eggink G. 2013. Production Methods of Hyaluronan. International Journal of Carbohydrate Chemistry.

Chen YH y Wang Q. 2009. Establishment of CTAB Turbidimetric method to determine hyaluronic acid content in fermentation broth. Carbohydrate Polymers. 78:178-181.

Cleary PP y Larkin A. 1979. Hyaluronic Acid Capsule: Strategy for Oxygen Resistance in Group A *Streptococci*. Journal of Bacteriology. 140(3): 1090-1097.

DeAngelis PL, Jing W, Drake RR y Achyuthan AM. 1998. Identification and Molecular Cloning of a Unique Hyaluronan Synthase from *Pausteurella multocida*. The Journal of Biological Chemistry. 273:8454-8458.

Di Ferrante N. 1956. Turbidimetric measurement of acyd mucopoly-saccharides and hyaluronidase activity. The Journal of Biological Chemistry. 220:303-306.

Don MM y Shoparwe NF. 2009. Kinetics of Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. Biochemical Engineering Journal. 49:95-103.

Duan XJ, Niu HX, Tan WS y Zhang X. 2008. Mechanism Analysis of Effect of Oxygen on Molecular Weight of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Journal of Microbiology and Biotechnology. 19(3):299-306.

Fong Chong B, Blank LM, Mclaughlin R, Nielsen LK. 2005. Microbial hyaluronic acid production. Applied Microbiology and Biotechnology. 66:341-351.

Gobetti M y Calasso M. 2014. *Streptococcus*. En Batt CA y Tortorello ML (Eds.) Encyclopedia of Food Microbiology. Vol.3 (pp. 535). Academic Press.

Gottlieb HE, Koflyar V y Nudelman A. 1997. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. Journal of Organic Chemistry. 62:7512-7515.

Hardie JM y Whiley RA. 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement. 83:1S-11S.

Huang WC, Cen SJ, Chen TL. 2006. The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation. Biochemical Engineering Journal. 32:239-243.

Im JH, Song JM, Kang JH, Kang DJ. 2009. Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 36:1337-1344.

Izawa N, Hanamizu T, Sone T, Chiba K. 2010. Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by *Streptococcus thermophilus* strain YIT 2084 in milk. Journal of Bioscience and Bioengineering. 109: 356-360.

Jagadeeswara Reddy K, Karunakaran KT. 2013. Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain 3523-7. *Journal of BioScience and Biotechnology*. 2(3):173-179.

Jagannath S, Ramachandran KB. 2010. Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochemical Engineering Journal*. 48:148-158.

Johns MR, Goh LT, Oeggerli A. 1994. Effecto of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biotechnology Letters*. 16(5):507-512.

Kogan G, Šoltés L, Stern R, Gemeiner P. 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 29:17-25.

Lee Ching L, Chee Yuan G, Min Tze Liong. 2013. Dermal bioactives from lactobacilli and bifidobacteria. *Annals of Microbiology*. 63:1047-1055.

Liu L, Liu Y, Li J, Du G, Chen J. 2011. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*. 10:99.

Liu L, Wang M, Sun J, Du Guocheng, Chen J. 2008. Application of a novel cavern volume controlled culture model to microbial hyaluronic acid production by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochemical Engineering Journal*. 48:141-147.

Marcellin E, Gruber CW, Archer C, Craik DJ y Nielsen LK. 2009. Proteome analysis of the hyaluronic acid-producing bacterium, *Streptococcus zooepidemicus*. *Proteome Science*. 7:13.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 426-428.

Park W, Kim K, Bae B, Kim Y, Na K. 2010. Cancer cell specific targeting of nanogels from acetylated hyaluronic acid with low molecular weight. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 40:367-375.

Patil KP, Kamalja KK y Chaudhari BL. 2011. Optimization of medium components for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 4523 using a statistical approach. *Carbohydrate Polymers.* 86:1573-1577.

Patil KP, Patil DK, Chaudhari BL y Chincholkar SB. 2010. Production of hyaluronic acid from *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 and its wound healing activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 111(3):286-288.

Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83:346-356.

Pires AMB, Macedo AC, Eguchi SY, Santana MHA. 2010. Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource Technology.* 101: 6506-6509.

Pires AMB, Santana MHA. 2010. Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 162:1751-1761.

Pretsch E, Bühlmann P, Badertscher M. 2009. *Structure Determination of Organic Compounds* 4ta ed. (pp. 423). Alemania: Springer.

Tamer TM. 2013. Hyaluronan and sinovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscip Toxicol.* 6(3): 111-125.



Vázquez JA, Montemayor MI, Fraguas J y Murado MA. 2009. High production of hyaluronic and lactic acids by *Streptococcus zooepidemicus* in fed-batch culture using commercial and marine peptones from fishing by-products. *Biochemical Engineering Journal*. 44:125-130.

Vázquez JA, Montemayor MI, Fraguas J y Murado MA. 2010. Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. *Microbial Cell Factories*. 9:46.

Vázquez JA, Rodríguez Amado I, Montemayor MI, Fraguas J, Pilar González M, Anxo Murado M. 2013. Chondroitin Sulfate, Hyaluronic Acid and Chitin/Chitosan Production Using Marine Waste Sources: Characteristics, Applications and Eco-Friendly Processes: A Review. *Marine Drugs*. 11:747-774.

Zee-Wei L, Raha AR, Arbakariya A, Rosfarizan M. 2011. Medium formulation and impeller design on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. *African Journal of Microbiology*. 5(15):2114-2123.

Zhang J, Ding X, Yang L y Kong Z. 2006. A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 72:168-172.

Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts M, Riel KV. 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(6):1875-1881.

## XI ANEXOS

### 11.1 Composición del caldo de infusión de cerebro y corazón

Componente	Concentración (g/L de agua destilada)
Infusión de cerebro corazón	6.0
Peptona de carne	6.0
Cloruro de sodio	5.0
Dextrosa	3.0
Peptona de gelatina	14.5
Fosfato de Potasio disódico	2.5

### 11.2. Composición del caldo de soya y tripticaseína

Componente	Concentración (g/L de agua destilada)
Peptona de caseína	17.0
Peptona de soya	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	2.5
Dextrosa	2.5

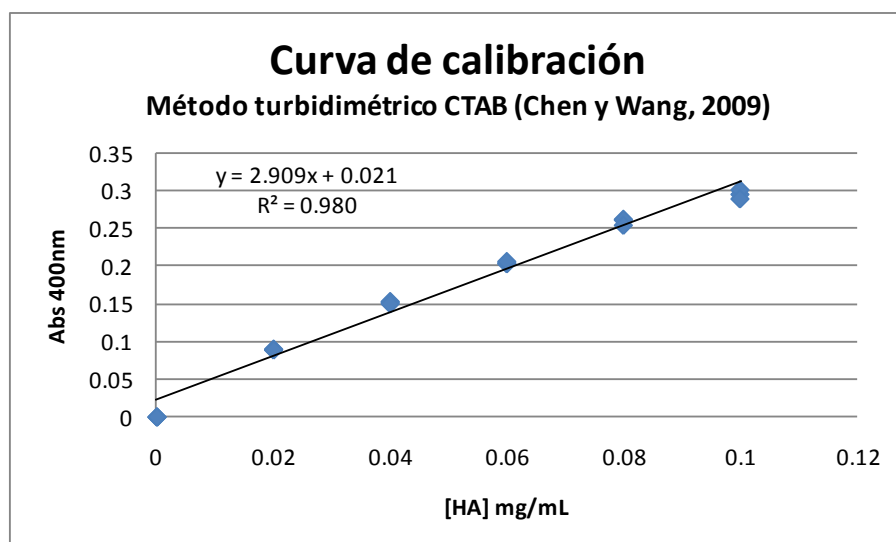
### 11.3 Cuantificación de ácido hialurónico por el método turbidimétrico CTAB (Método Turbidimétrico CTAB). Protocolo propuesto por Chen y Wang (2009)

#### Preparación del reactivo CTAB

Disolver 2.5 g de CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) en 100 mL de una solución 0.2 M de NaCl (en agua desionizada).

#### **Curva de calibración**

Se preparó una solución stock de 0.1 mg/mL de HA y a partir de ella se prepararon las soluciones patrón para la curva de calibración. Las concentraciones de HA empleadas en esta curva fueron: 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mg/mL.



En base a la curva de calibración, la concentración de HA presente en la muestra puede calcularse mediante la ecuación:

$$[HA] = \frac{Abs_{400} - 0.021}{2.909}$$

## 11.4 Cuantificación de ácido hialurónico por el método turbidimétrico CTM (Método Turbidimétrico CTAB). Protocolo propuesto por Di Ferrante (1956).

### Preparación del reactivo CTAB

Disolver 2.5 g de CTAB en 100 mL de una solución de NaOH al 2% p/v.

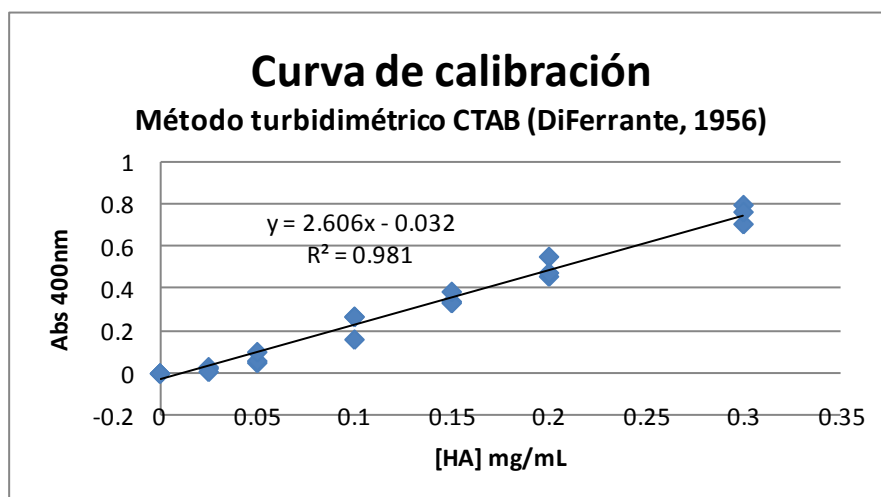
### Preparación del buffer de acetatos

Buffer de acetato de sodio/ácido acético al 0.2 M, pH 6, al cual se le agrega NaCl para dar una concentración de 0.15 M.

### **Curva de calibración**

Solución stock de HA: 0.5 mg HA/mL, disuelto en buffer de acetatos.

Soluciones estándar de HA: 0.025, 0.050, 0.100, 0.150, 0.200 y 0.300 HA/mL



En base a la curva de calibración anterior, la concentración de HA presente en la muestra puede calcularse mediante la ecuación:

$$[HA] = \frac{Abs_{400} + 0.032}{2.606}$$

## 11.5 Determinación de azúcares reductores por el método colorimétrico DNS (Miller, 1959)

### Preparación del reactivo DNS

Aforar los siguientes reactivos a 250 mL con agua destilada, en un frasco ámbar y guardar en oscuridad.

2.5 g DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico)

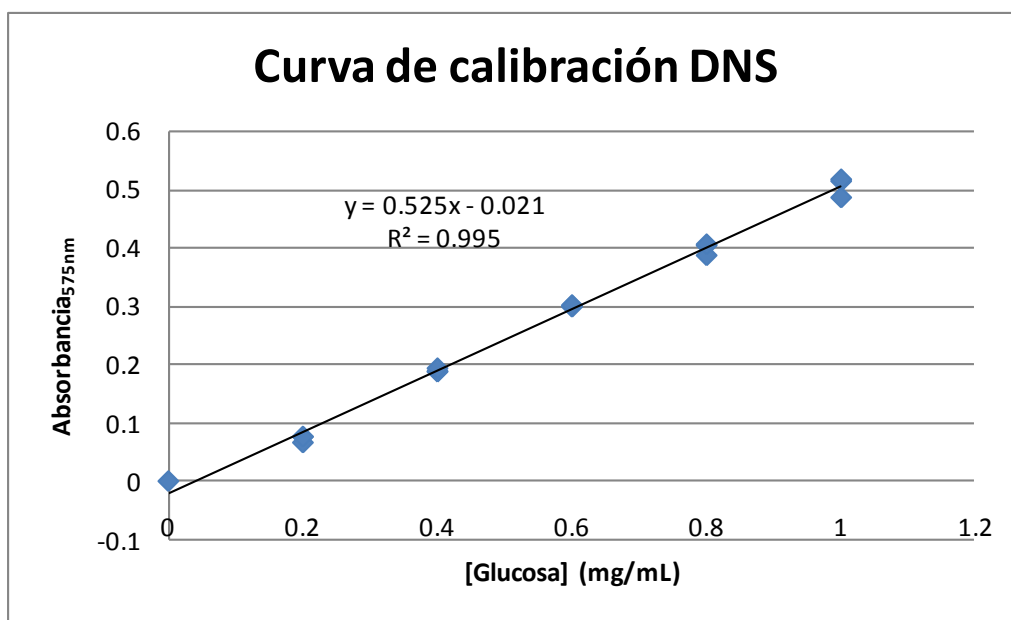
2.5 g NaOH

0.125 g Sulfito de Sodio

0.5 g Fenol

### Curva de calibración

Se realizó un stock de glucosa a una concentración de 1 mg/mL y a partir de ella se prepararon las soluciones estándar para la curva de calibración, a concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/mL.



En base a la anterior curva de calibración, la concentración de glucosa en la muestra puede determinarse mediante la siguiente ecuación:

$$[Glucosa] = \frac{Abs_{575} + 0.021}{0.525}$$

## 11.6 Determinación de proteína soluble por el método colorimétrico Lowry-Peterson (Peterson, 1977)

### Preparación de los reactivos

#### **Solución A**

Pesar los siguientes reactivos y aforar a 100 mL.

- 25 g  $Na_2CO_3$  (Carbonato de sodio)
- 0.25 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (Sulfato de cobre pentahidratado)
- 0.5 g  $KNaC_4H_4O_6$  (Tartrato de sodio y potasio)

#### **Solución B**

Pesar 25 g de SDS (Dodecil sulfato de sodio) y aforar a 250 mL.

#### **Solución C**

Pesar 8 g de NaOH y aforar a 250 mL.

#### **Reactivo A de Lowry**

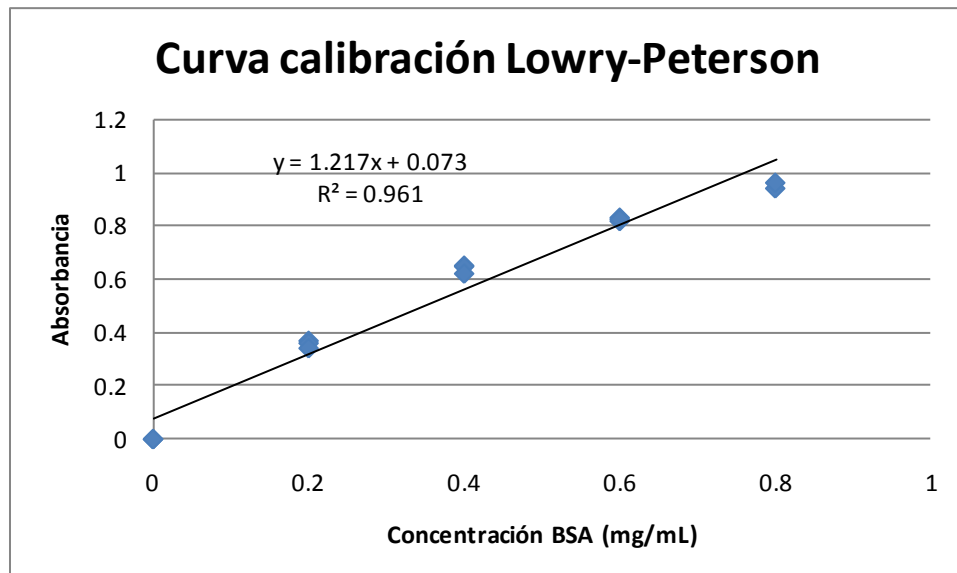
Mezclar las soluciones A, B y C, aforar a 1 L. Guardar en refrigeración y calentar a baño de agua tibia por 15-20 min justo antes de usar.

## Reactivo B de Lowry

Preparar una solución 50 % v/v del reactivo Folin-Ciocalteu justo antes de usarse.

## Curva de calibración

Se prepararon estándares de BSA a concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg/mL, a partir de una solución stock de 1mg BSA/mL.

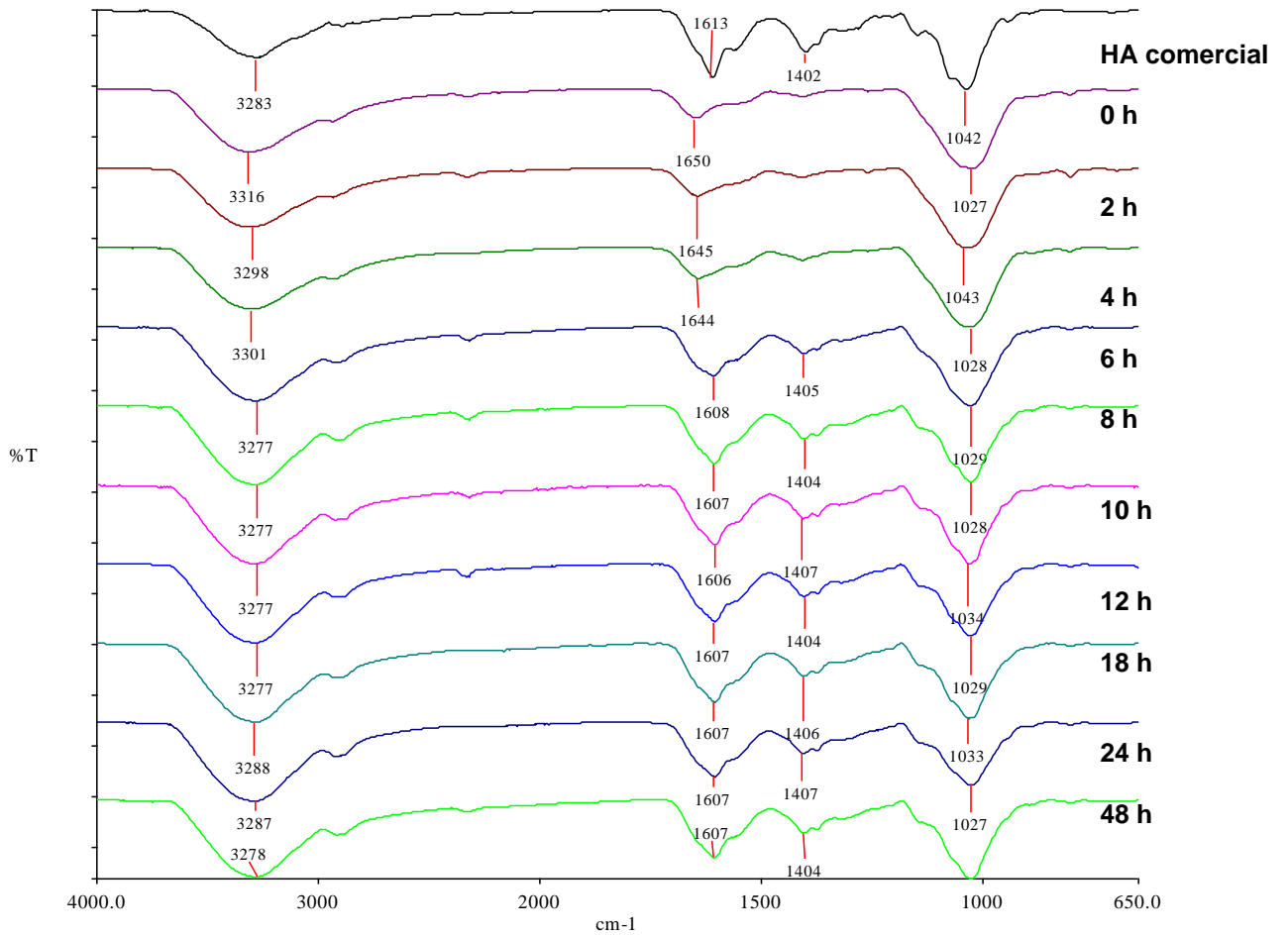


La concentración de proteína soluble en la muestra se determina mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{Proteína soluble}] = \frac{Abs_{750} - 0.073}{1.217}$$

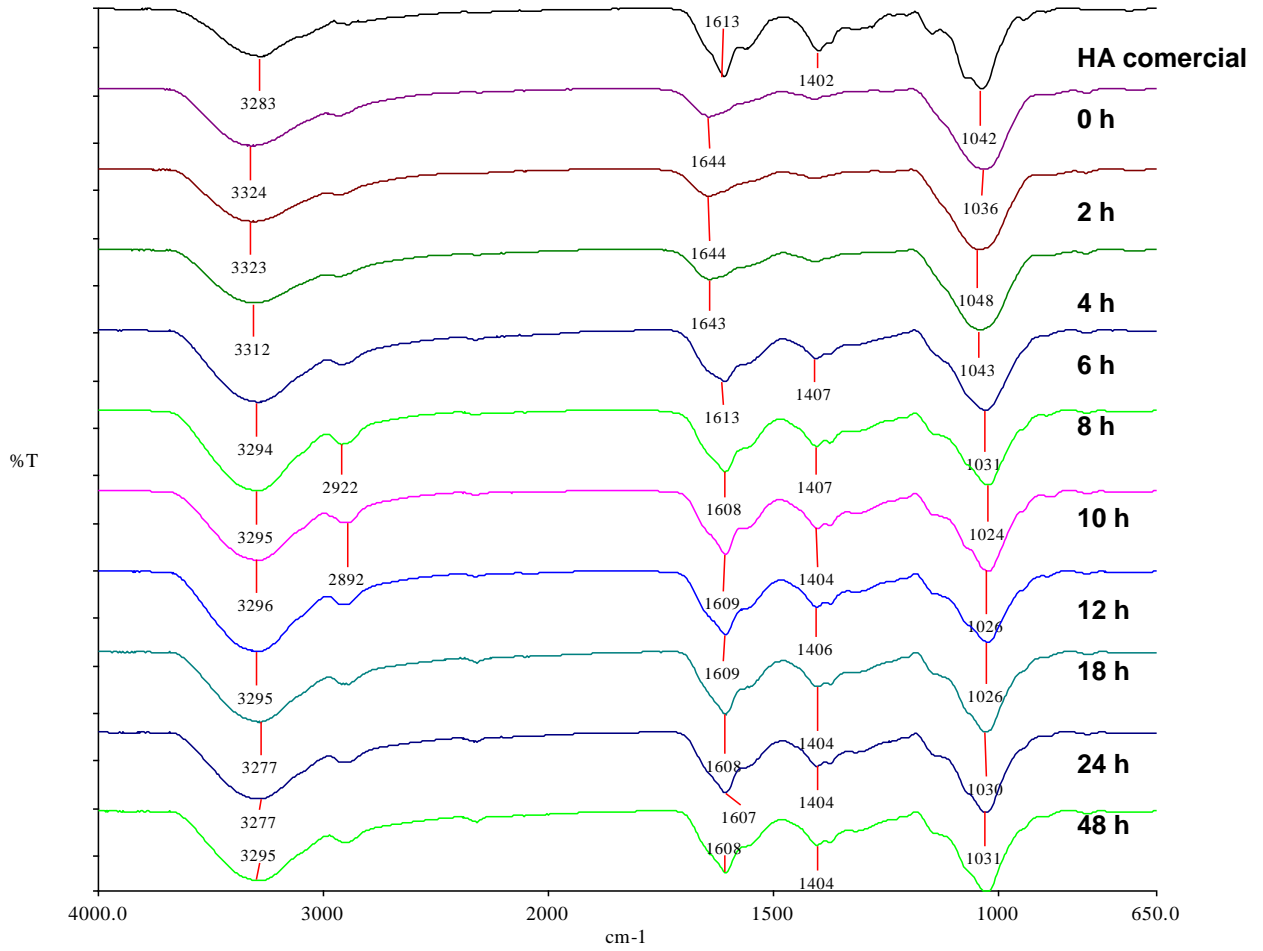
## 11.7 Espectros de FTIR de las muestras de HA obtenidas en el cultivo de *S. equi* subsp. *zoepidemicus*.

### 11.7.1 Espectros de FTIR de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zoepidemicus* con CGI de 2.5 g/L

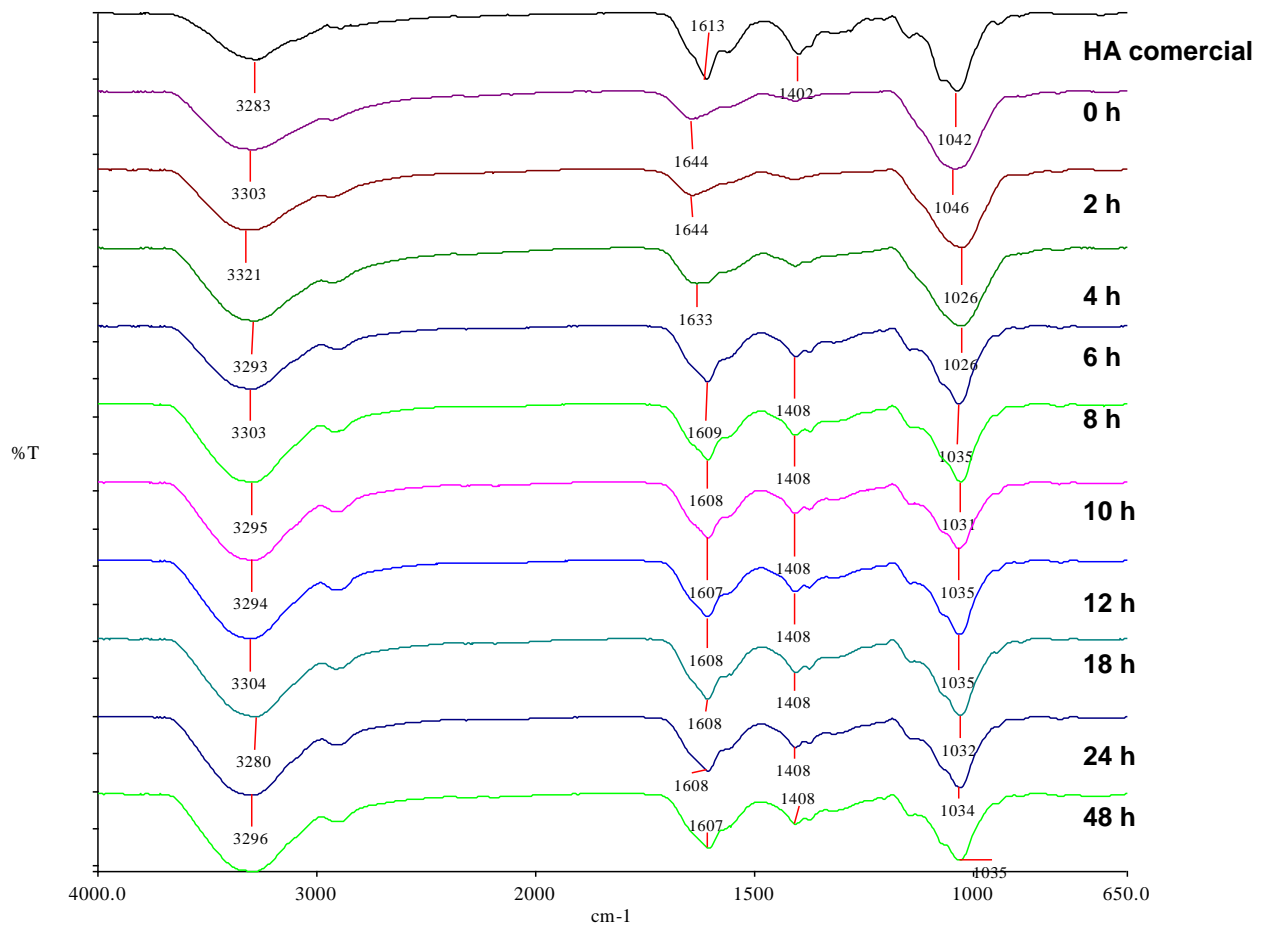




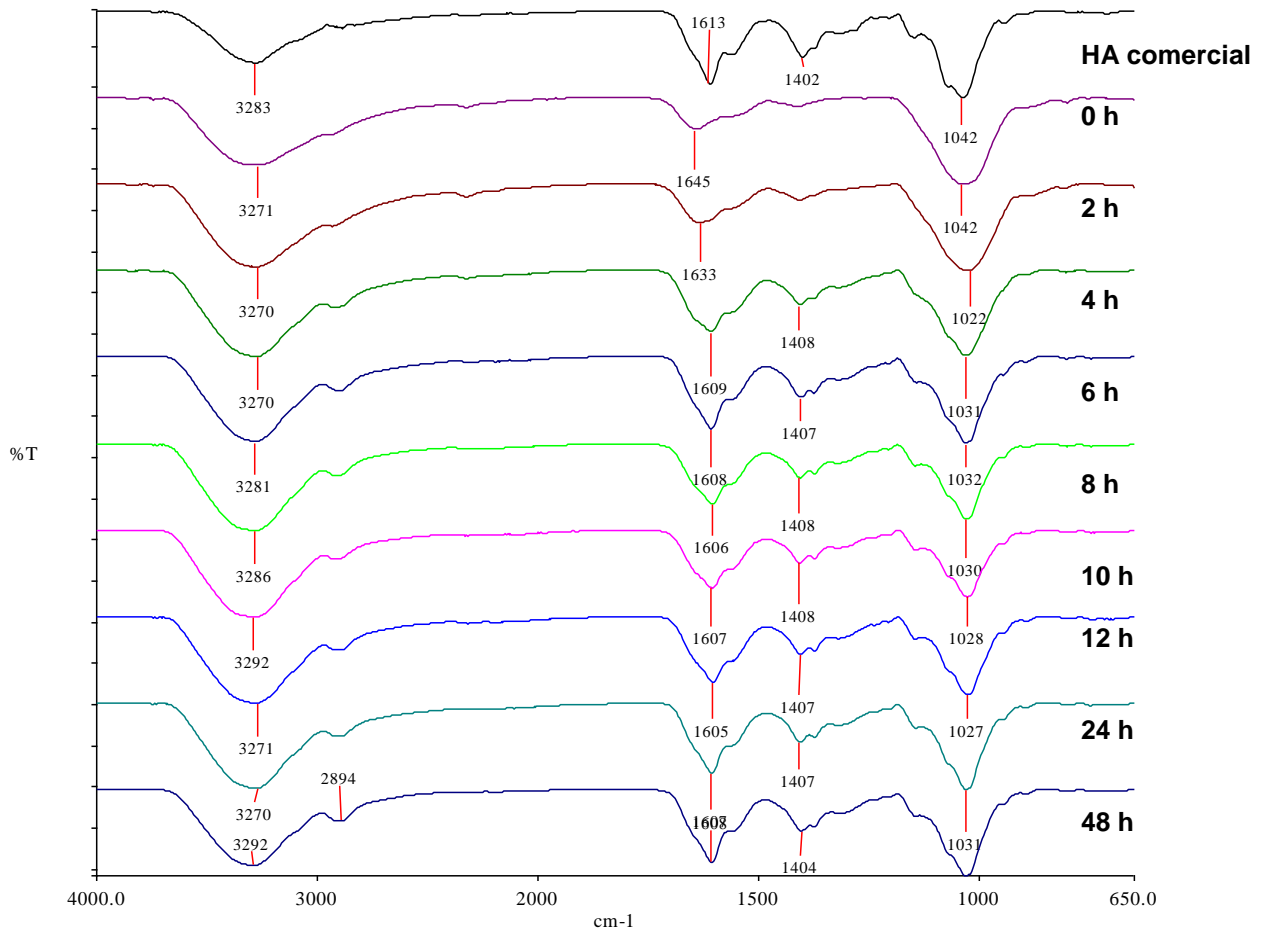
**11.7.2 Espectros de FTIR de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* con CGI de 5 g/L**



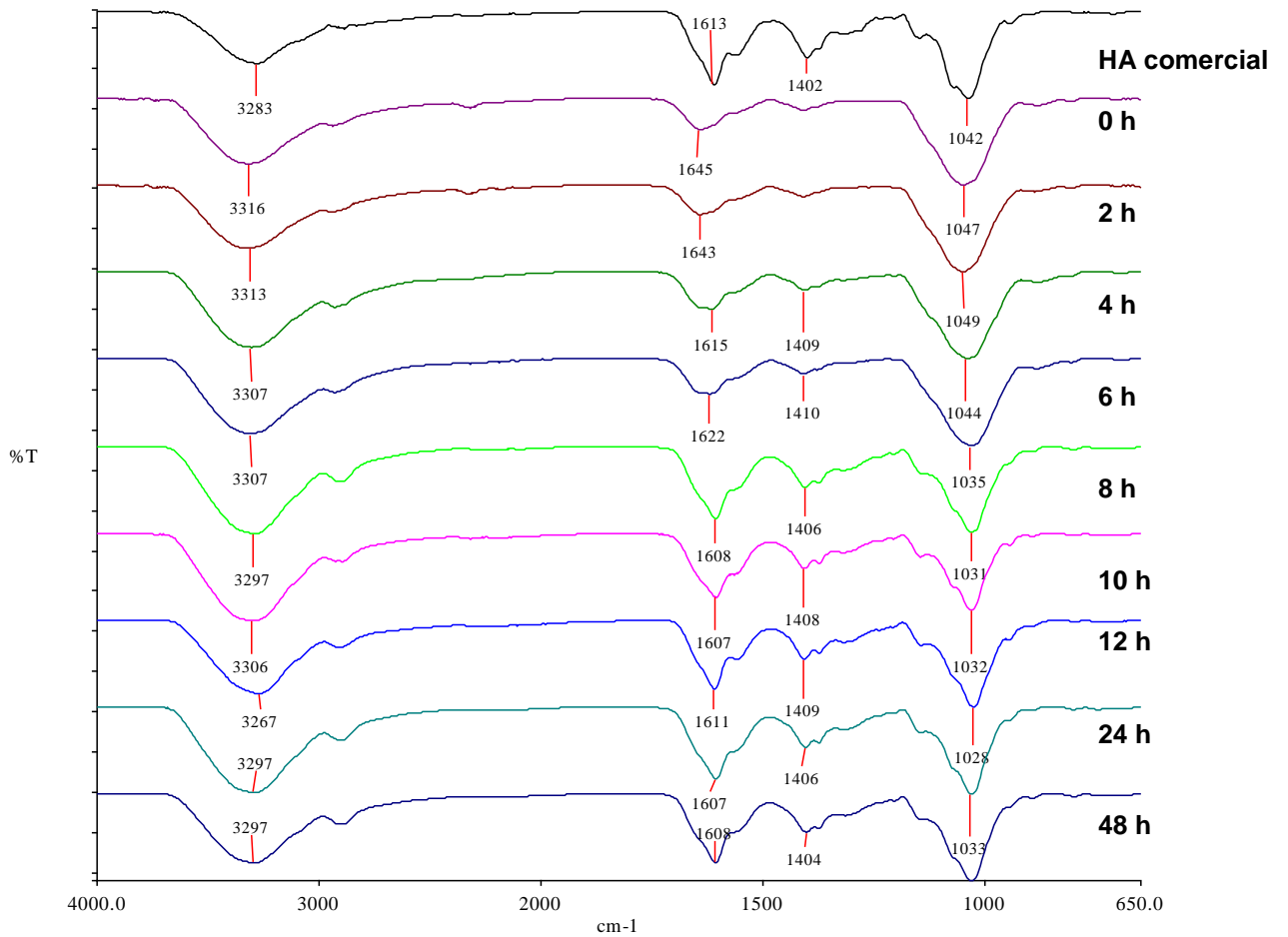
### 11.7.3 Espectros de FTIR de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* con CGI de 10 g/L



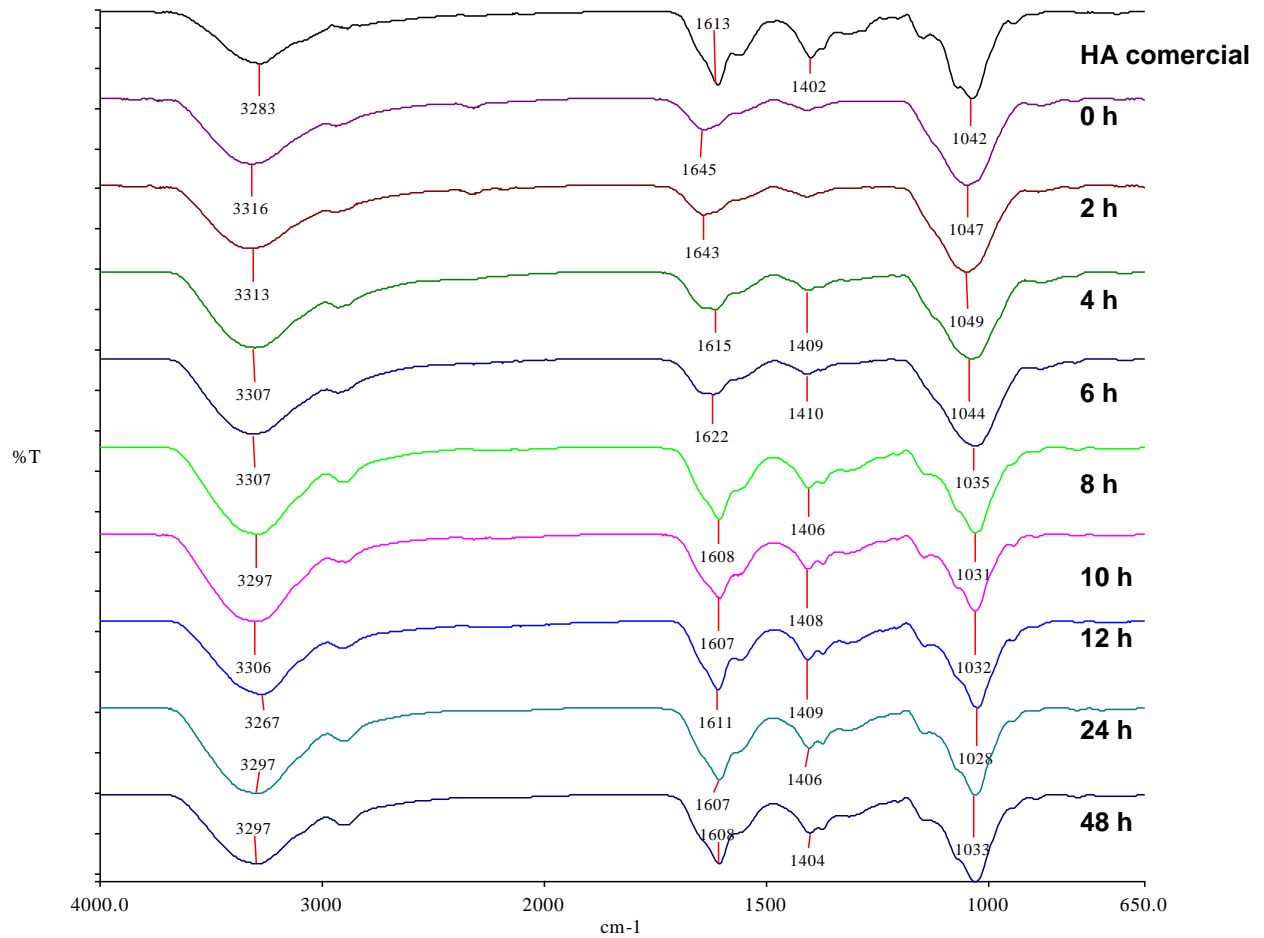
### 11.7.4 Espectros de FTIR de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* con agitación de 200 rpm



**11.7.5 Espectros de FTIR de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zoepidemicus* con agitación de 400 rpm**



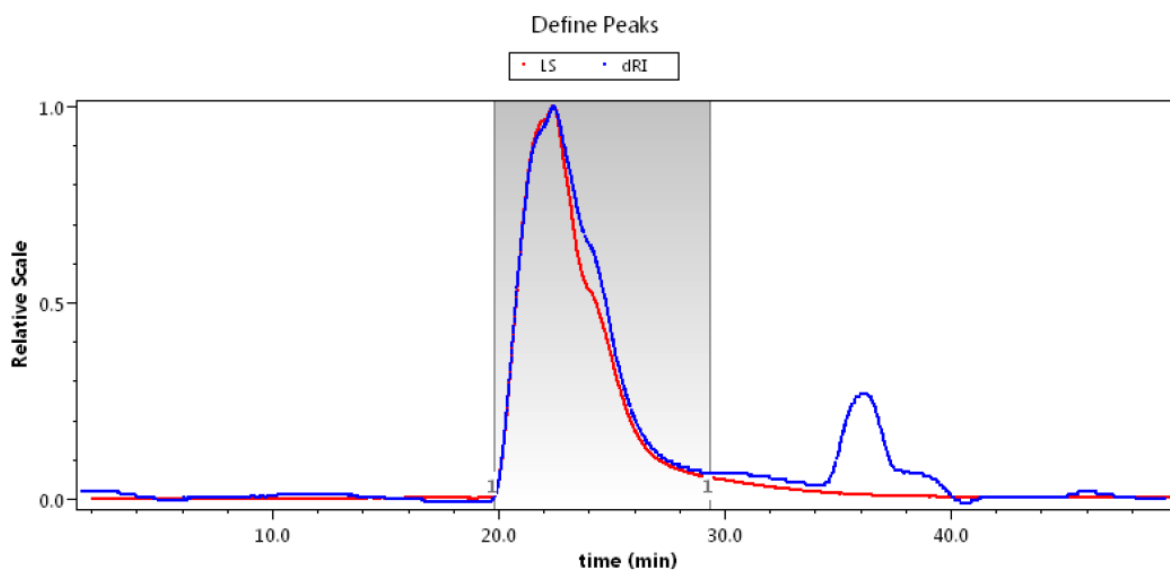
**11.7.6 Espectros de FTIR de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zoepidemicus* con agitación de 600 rpm**



## 11.8 Cromatogramas de SEC de las muestras de HA producidas en el cultivo sumergido agitado 400 rpm de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*

### 11.8.1 Cromatograma de SEC del HA comercial

Sample: HAC



#### Processing

Collection Time: Wednesday July 29, 2015 09:50:09 AM Paris, Madrid (heure d'été)

Processing Time: Friday July 31, 2015 10:45:02 AM Paris, Madrid (heure d'été)

#### Peak settings:

Peak Name Peak 1  
 Peak Limits (min) 19.801 - 29.318  
 Light Scattering Model Zimm  
 Fit Degree 1  
 dn/dc (mL/g) 0.1500  
 A2 (mol mL/g<sup>2</sup>) 0.000  
 UV Ext. Coef. (mL/(mg cm)) 0.000

#### Results Fitting Procedure:

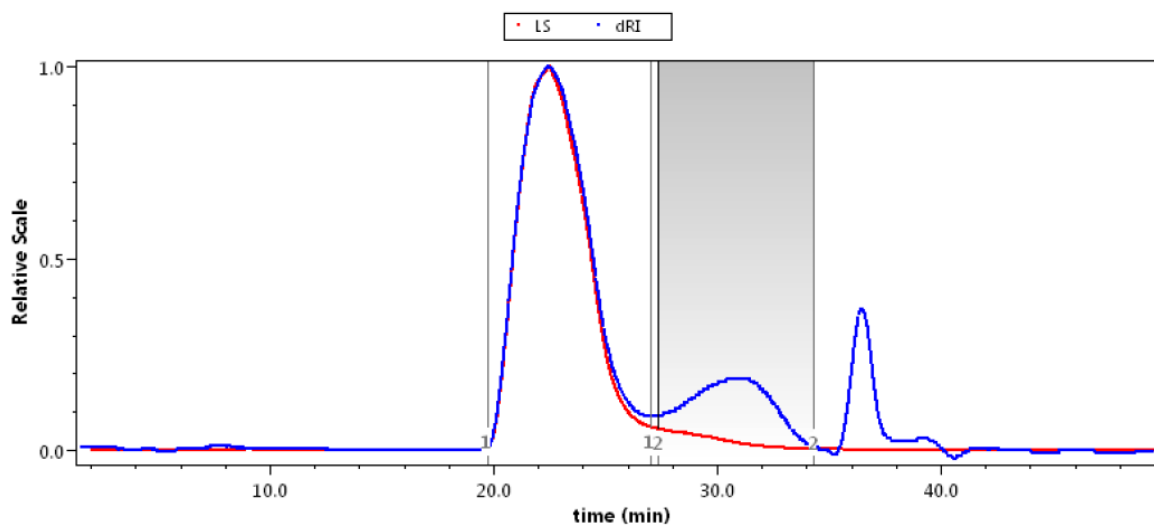
Data	Fit Model	Degree	R <sup>2</sup>	Extrapolation
Molar Mass	None	n/a	n/a	none
Rms Radius	None	n/a	n/a	none
Mean Square Radius	None	n/a	n/a	none

## Results

### Peak Results

	Peak 1
<b>Masses</b>	
Injected Mass ( $\mu\text{g}$ )	100.00
Calculated Mass ( $\mu\text{g}$ )	74.29
Mass Recovery (%)	74.3
Mass Fraction (%)	100.0
<b>Molar mass moments (g/mol)</b>	
Mn	$2.047 \times 10^6$ ( $\pm 4.185\%$ )
Mp	$1.837 \times 10^6$ ( $\pm 3.128\%$ )
Mv	n/a
Mw	$2.216 \times 10^6$ ( $\pm 5.409\%$ )
<b>Polydispersity</b>	
Mw/Mn	1.083 ( $\pm 6.839\%$ )
<b>rms radius moments (nm)</b>	
Rn	193.5 ( $\pm 1.4\%$ )
Rw	204.7 ( $\pm 1.5\%$ )
Rz	227.5 ( $\pm 1.6\%$ )

## 11.8.2 Cromatograma de SEC del HA producido a las 8 h de cultivo (HA8)



### Processing

Collection Time: Tuesday July 28, 2015 11:30:49 PM Paris, Madrid (heure d'été)

Processing Time: Friday July 31, 2015 11:03:27 AM Paris, Madrid (heure d'été)

#### Peak settings:

Peak Name	Peak 1	Peak 2
Peak Limits (min)	19.754 - 27.009	27.349 - 34.320
Light Scattering Model	Zimm	Zimm
Fit Degree	1	1
dn/dc (mL/g)	0.1500	0.1500
A2 (mol mL/g <sup>2</sup> )	0.000	0.000
UV Ext. Coef. (mL/(mg cm))	0.000	0.000

#### Results Fitting Procedure:

Data	Fit Model	Degree	R <sup>2</sup>	Extrapolation
Molar Mass	None	n/a	n/a	none
Rms Radius	None	n/a	n/a	none
Mean Square Radius	None	n/a	n/a	none

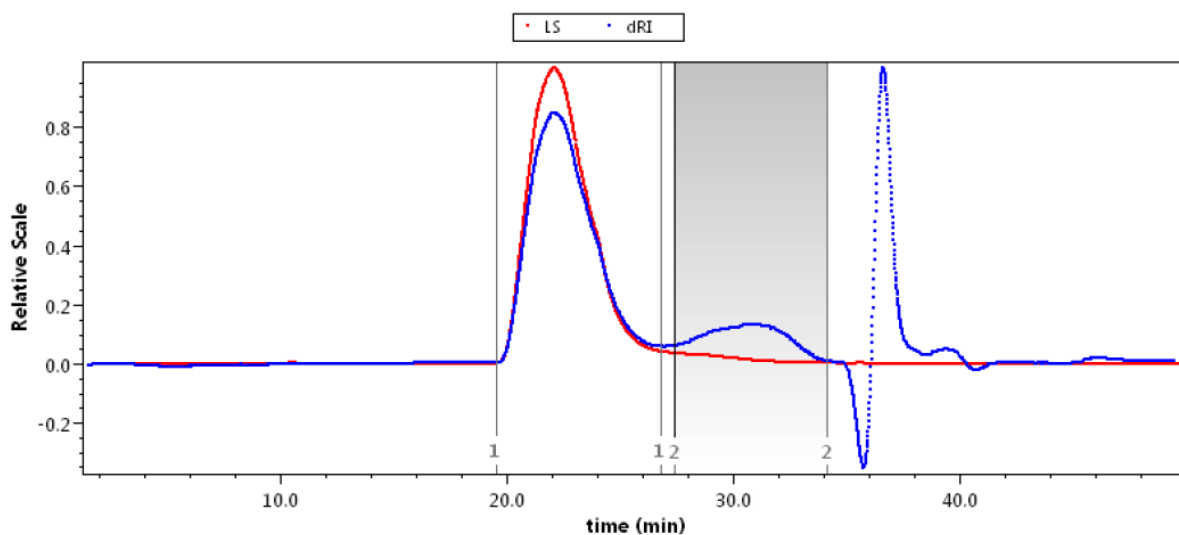
### Results

#### Peak Results

	Peak 1	Peak 2
<b>Masses</b>		
Injected Mass (µg)	100.00	100.00
Calculated Mass (µg)	73.63	17.47
Mass Recovery (%)	73.6	17.5
Mass Fraction (%)	80.8	19.2
<b>Molar mass moments (g/mol)</b>		
Mn	1.863×10 <sup>6</sup> (±5.906%)	4.521×10 <sup>5</sup> (±24.397%)
Mp	2.184×10 <sup>6</sup> (±7.941%)	3.003×10 <sup>5</sup> (±25.516%)
Mv	n/a	n/a
Mw	1.892×10 <sup>6</sup> (±5.988%)	6.991×10 <sup>5</sup> (±24.647%)
<b>Polydispersity</b>		
Mw/Mn	1.016 (±8.411%)	1.547 (±34.679%)
<b>rms radius moments (nm)</b>		
Rn	180.3 (±2.0%)	241.5 (±6.1%)
Rw	182.0 (±2.0%)	254.6 (±6.0%)
Rz	183.9 (±2.0%)	264.6 (±5.7%)



### 11.8.3 Cromatograma de SEC del HA producido a las 8 h de cultivo (HA9)



#### Processing

Collection Time: Wednesday July 29, 2015 12:27:07 AM Paris, Madrid (heure d'été)

Processing Time: Friday July 31, 2015 11:08:06 AM Paris, Madrid (heure d'été)

#### Peak settings:

Peak Name	Peak 1	Peak 2
Peak Limits (min)	19.550 - 26.837	27.407 - 34.124
Light Scattering Model	Zimm	Zimm
Fit Degree	1	1
dn/dc (mL/g)	0.1500	0.1500
A2 (mol mL/g <sup>2</sup> )	0.000	0.000
UV Ext. Coef. (mL/(mg cm))	0.000	0.000

#### Results Fitting Procedure:

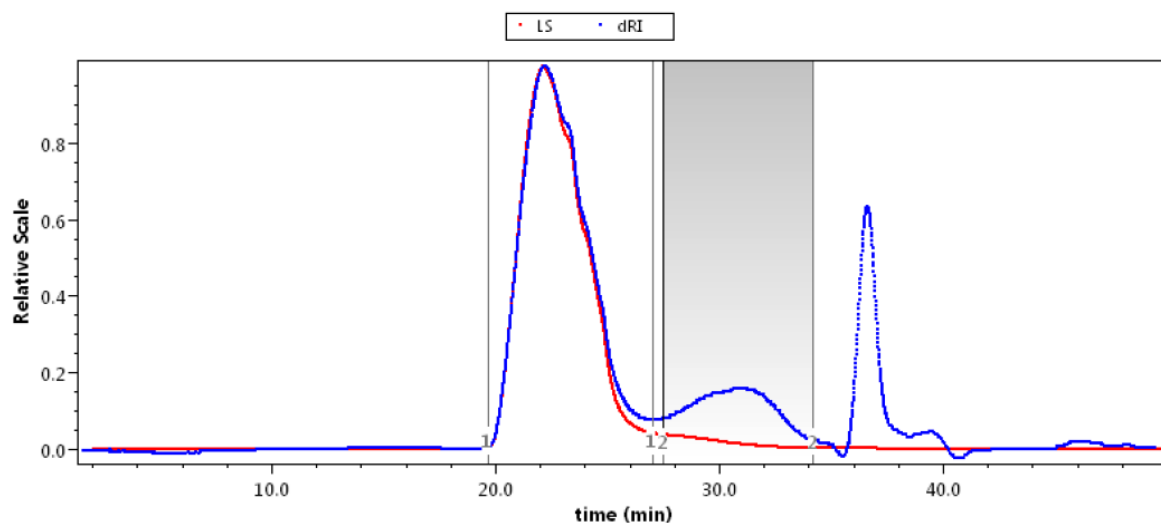
Data	Fit Model	Degree	R <sup>2</sup>	Extrapolation
Molar Mass	None	n/a	n/a	none
Rms Radius	None	n/a	n/a	none
Mean Square Radius	None	n/a	n/a	none

#### Results

##### Peak Results

	Peak 1	Peak 2
<b>Masses</b>		
Injected Mass (µg)	100.00	100.00
Calculated Mass (µg)	62.33	13.68
Mass Recovery (%)	62.3	13.7
Mass Fraction (%)	82.0	18.0
<b>Molar mass moments (g/mol)</b>		
Mn	1.489×10 <sup>6</sup> (±3.359%)	1.514×10 <sup>5</sup> (±15.928%)
Mp	1.521×10 <sup>6</sup> (±2.208%)	9.397×10 <sup>4</sup> (±14.316%)
Mv	n/a	n/a
Mw	1.539×10 <sup>6</sup> (±2.960%)	2.330×10 <sup>5</sup> (±15.442%)
<b>Polydispersity</b>		
Mw/Mn	1.034 (±4.477%)	1.538 (±22.184%)
<b>rms radius moments (nm)</b>		
Rn	158.9 (±1.4%)	152.4 (±6.6%)
Rw	161.5 (±1.2%)	153.6 (±6.5%)
Rz	164.7 (±1.1%)	156.5 (±6.4%)

## 11.8.4 Cromatograma de SEC del HA producido a las 10 h de cultivo (HA10)



### Processing

Collection Time: Wednesday July 29, 2015 01:23:25 AM Paris, Madrid (heure d'été)

Processing Time: Friday July 31, 2015 12:22:43 PM Paris, Madrid (heure d'été)

#### Peak settings:

Peak Name	Peak 1	Peak 2
Peak Limits (min)	19.636 - 27.002	27.512 - 34.142
Light Scattering Model	Zimm	Zimm
Fit Degree	1	1
dn/dc (mL/g)	0.1500	0.1500
A2 (mol mL/g <sup>2</sup> )	0.000	0.000
UV Ext. Coef. (mL/(mg cm))	0.000	0.000

#### Results Fitting Procedure:

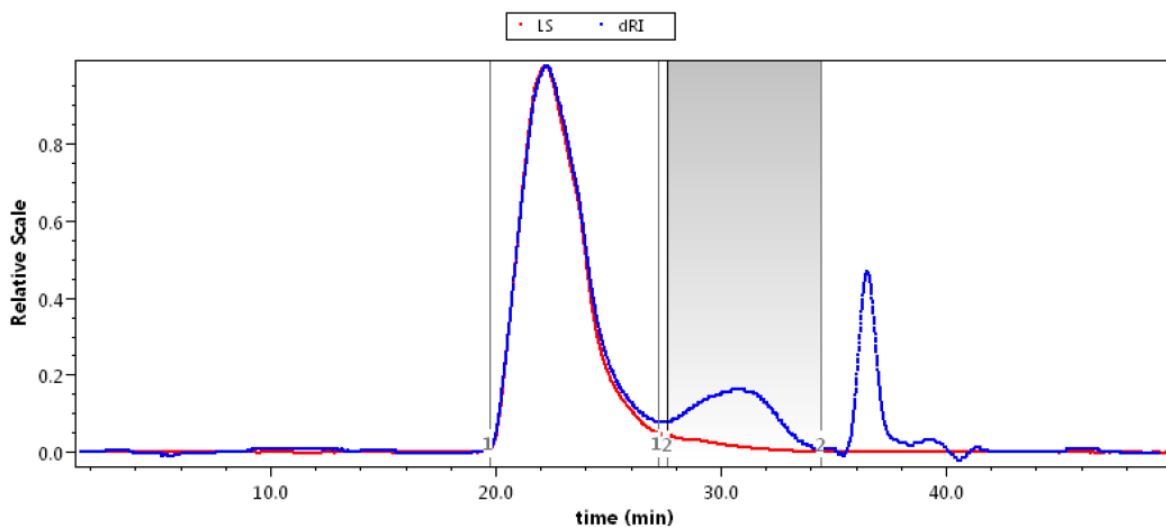
Data	Fit Model	Degree	R <sup>2</sup>	Extrapolation
Molar Mass	None	n/a	n/a	none
Rms Radius	None	n/a	n/a	none
Mean Square Radius	None	n/a	n/a	none

### Results

#### Peak Results

	Peak 1	Peak 2
<b>Masses</b>		
Injected Mass (µg)	100.00	100.00
Calculated Mass (µg)	78.05	16.82
Mass Recovery (%)	78.0	16.8
Mass Fraction (%)	82.3	17.7
<b>Molar mass moments (g/mol)</b>		
Mn	1.471×10 <sup>6</sup> (±4.290%)	1.352×10 <sup>5</sup> (±14.971%)
Mp	1.533×10 <sup>6</sup> (±3.820%)	1.144×10 <sup>5</sup> (±16.434%)
Mv	n/a	n/a
Mw	1.523×10 <sup>6</sup> (±3.898%)	2.164×10 <sup>5</sup> (±14.669%)
<b>Polydispersity</b>		
Mw/Mn	1.036 (±5.796%)	1.601 (±20.960%)
<b>rms radius moments (nm)</b>		
Rn	157.1 (±1.6%)	118.6 (±7.6%)
Rw	159.8 (±1.5%)	125.6 (±6.8%)
Rz	163.2 (±1.4%)	146.6 (±5.9%)

## 11.8.5 Cromatograma de SEC del HA producido a las 10 h de cultivo (HA11)



### Processing

Collection Time: Wednesday July 29, 2015 02:19:43 AM Paris, Madrid (heure d'été)

Processing Time: Friday July 31, 2015 01:43:40 PM Paris, Madrid (heure d'été)

#### Peak settings:

Peak Name	Peak 1	Peak 2
Peak Limits (min)	19.749 - 27.229	27.625 - 34.425
Light Scattering Model	Zimm	Zimm
Fit Degree	1	1
dn/dc (mL/g)	0.1500	0.1500
A2 (mol mL/g <sup>2</sup> )	0.000	0.000
UV Ext. Coef. (mL/(mg cm))	0.000	0.000

#### Results Fitting Procedure:

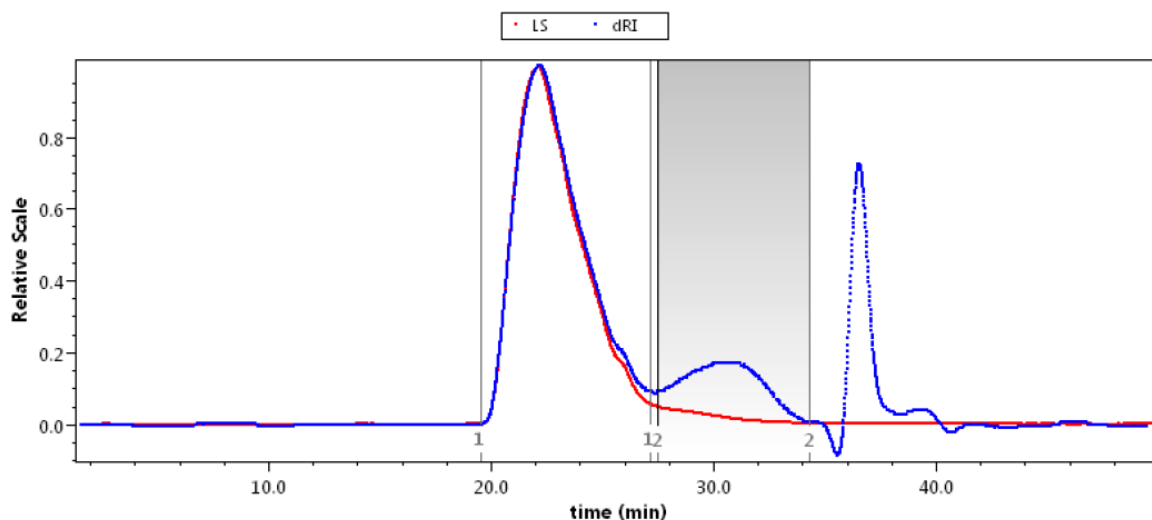
Data	Fit Model	Degree	R <sup>2</sup>	Extrapolation
Molar Mass	None	n/a	n/a	none
Rms Radius	None	n/a	n/a	none
Mean Square Radius	None	n/a	n/a	none

### Results

#### Peak Results

	Peak 1	Peak 2
<b>Masses</b>		
Injected Mass (µg)	100.00	100.00
Calculated Mass (µg)	68.42	14.31
Mass Recovery (%)	68.4	14.3
Mass Fraction (%)	82.7	17.3
<b>Molar mass moments (g/mol)</b>		
Mn	1.516×10 <sup>6</sup> (±3.243%)	1.340×10 <sup>5</sup> (±12.445%)
Mp	1.478×10 <sup>6</sup> (±2.136%)	9.438×10 <sup>4</sup> (±12.855%)
Mv	n/a	n/a
Mw	1.552×10 <sup>6</sup> (±2.972%)	3.415×10 <sup>5</sup> (±20.945%)
<b>Polydispersity</b>		
Mw/Mn	1.024 (±4.399%)	2.548 (±24.363%)
<b>rms radius moments (nm)</b>		
Rn	158.9 (±1.3%)	130.8 (±6.0%)
Rw	160.9 (±1.2%)	154.7 (±6.1%)
Rz	163.4 (±1.1%)	260.6 (±5.4%)

## 11.8.6 Cromatograma de SEC del HA producido a las 12 h de cultivo (HA12)



### Processing

Collection Time: Wednesday July 29, 2015 03:16:02 AM Paris, Madrid (heure d'été)

Processing Time: Friday July 31, 2015 01:46:13 PM Paris, Madrid (heure d'été)

#### Peak settings:

Peak Name	Peak 1	Peak 2
Peak Limits (min)	19.523 - 27.172	27.512 - 34.312
Light Scattering Model	Zimm	Zimm
Fit Degree	1	1
dn/dc (mL/g)	0.1500	0.1500
A2 (mol mL/g <sup>2</sup> )	0.000	0.000
UV Ext. Coef. (mL/(mg cm))	0.000	0.000

#### Results Fitting Procedure:

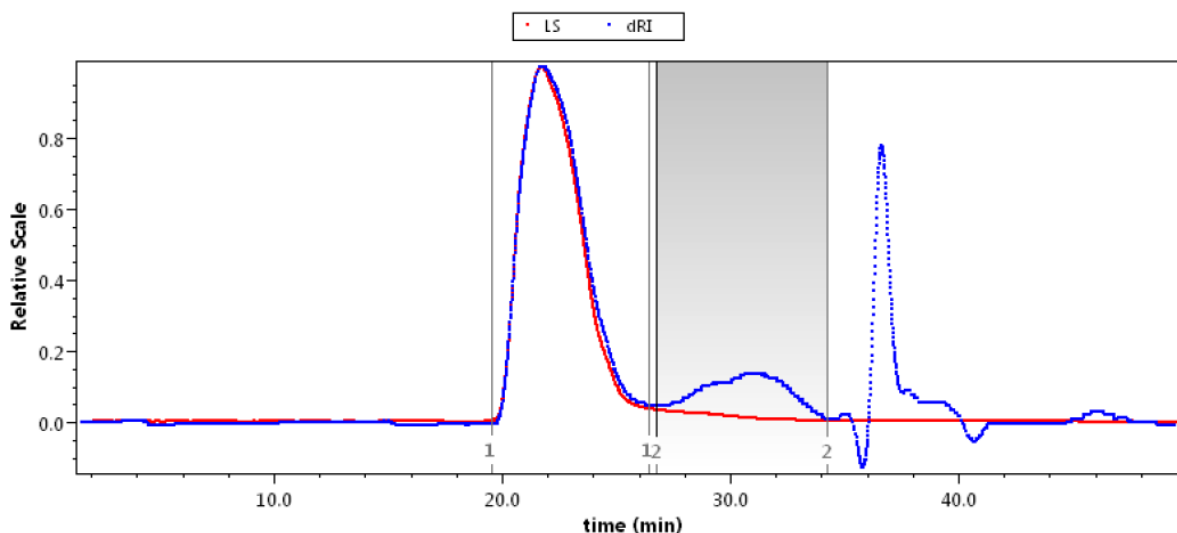
Data	Fit Model	Degree	R <sup>2</sup>	Extrapolation
Molar Mass	None	n/a	n/a	none
Rms Radius	None	n/a	n/a	none
Mean Square Radius	None	n/a	n/a	none

### Results

#### Peak Results

	Peak 1	Peak 2
<b>Masses</b>		
Injected Mass (µg)	100.00	100.00
Calculated Mass (µg)	77.58	16.75
Mass Recovery (%)	77.6	16.7
Mass Fraction (%)	82.2	17.8
<b>Molar mass moments (g/mol)</b>		
Mn	1.434×10 <sup>6</sup> (±3.839%)	1.286×10 <sup>5</sup> (±15.018%)
Mp	1.519×10 <sup>6</sup> (±3.868%)	1.396×10 <sup>5</sup> (±15.523%)
Mv	n/a	n/a
Mw	1.472×10 <sup>6</sup> (±3.485%)	1.918×10 <sup>5</sup> (±12.723%)
<b>Polydispersity</b>		
Mw/Mn	1.027 (±5.185%)	1.491 (±19.682%)
<b>rms radius moments (nm)</b>		
Rn	153.3 (±1.5%)	96.1 (±10.0%)
Rw	155.4 (±1.4%)	102.0 (±8.4%)
Rz	158.0 (±1.3%)	110.2 (±6.8%)

## 11.8.7 Cromatograma de SEC del HA producido a las 12 h de cultivo (HA13)



### Processing

Collection Time: Wednesday July 29, 2015 04:12:20 AM Paris, Madrid (heure d'été)

Processing Time: Friday July 31, 2015 01:48:08 PM Paris, Madrid (heure d'été)

#### Peak settings:

Peak Name	Peak 1	Peak 2
Peak Limits (min)	19.523 - 26.436	26.775 - 34.255
Light Scattering Model	Zimm	Zimm
Fit Degree	1	1
dn/dc (mL/g)	0.1500	0.1500
A2 (mol mL/g <sup>2</sup> )	0.000	0.000
UV Ext. Coef. (mL/(mg cm))	0.000	0.000

#### Results Fitting Procedure:

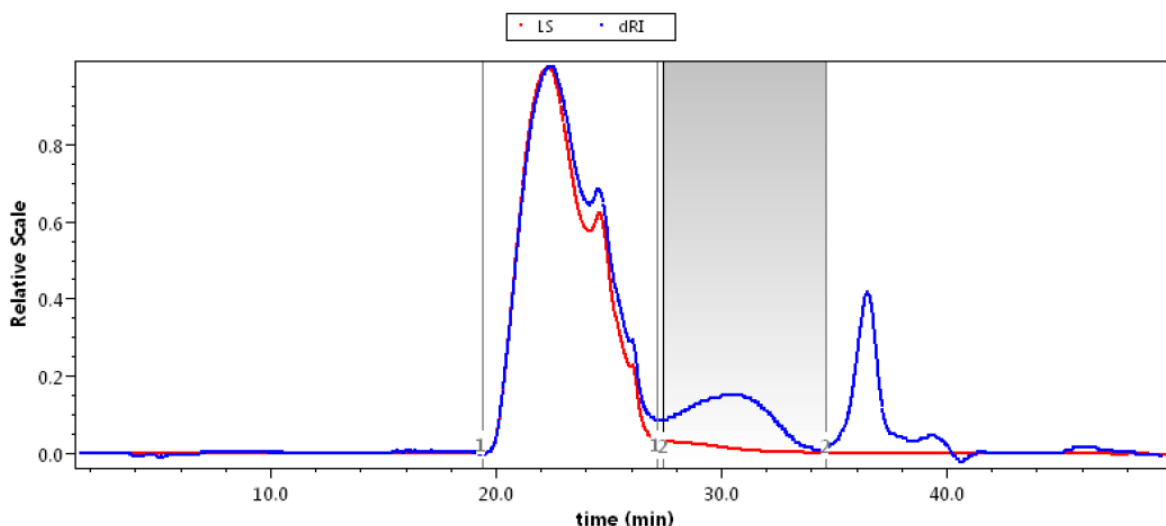
Data	Fit Model	Degree	R <sup>2</sup>	Extrapolation
Molar Mass	None	n/a	n/a	none
Rms Radius	None	n/a	n/a	none
Mean Square Radius	None	n/a	n/a	none

### Results

#### Peak Results

	Peak 1	Peak 2
<b>Masses</b>		
Injected Mass (µg)	100.00	100.00
Calculated Mass (µg)	41.30	8.31
Mass Recovery (%)	41.3	8.3
Mass Fraction (%)	83.2	16.8
<b>Molar mass moments (g/mol)</b>		
Mn	1.560×10 <sup>6</sup> (±3.489%)	1.513×10 <sup>5</sup> (±15.491%)
Mp	1.632×10 <sup>6</sup> (±2.052%)	9.014×10 <sup>4</sup> (±16.743%)
Mv	n/a	n/a
Mw	1.621×10 <sup>6</sup> (±2.969%)	2.417×10 <sup>5</sup> (±15.890%)
<b>Polydispersity</b>		
Mw/Mn	1.039 (±4.581%)	1.598 (±22.192%)
<b>rms radius moments (nm)</b>		
Rn	161.9 (±1.4%)	123.2 (±9.3%)
Rw	164.7 (±1.3%)	127.1 (±9.2%)
Rz	167.9 (±1.2%)	133.6 (±8.7%)

## 11.8.8 Cromatograma de SEC del HA producido a las 24 h de cultivo (HA14)



### Processing

Collection Time: Wednesday July 29, 2015 05:08:38 AM Paris, Madrid (heure d'été)

Processing Time: Friday July 31, 2015 01:49:57 PM Paris, Madrid (heure d'été)

#### Peak settings:

Peak Name	Peak 1	Peak 2
Peak Limits (min)	19.414 - 27.179	27.405 - 34.660
Light Scattering Model	Zimm	Zimm
Fit Degree	1	1
dn/dc (mL/g)	0.1500	0.1500
A2 (mol mL/g <sup>2</sup> )	0.000	0.000
UV Ext. Coef. (mL/(mg cm))	0.000	0.000

#### Results Fitting Procedure:

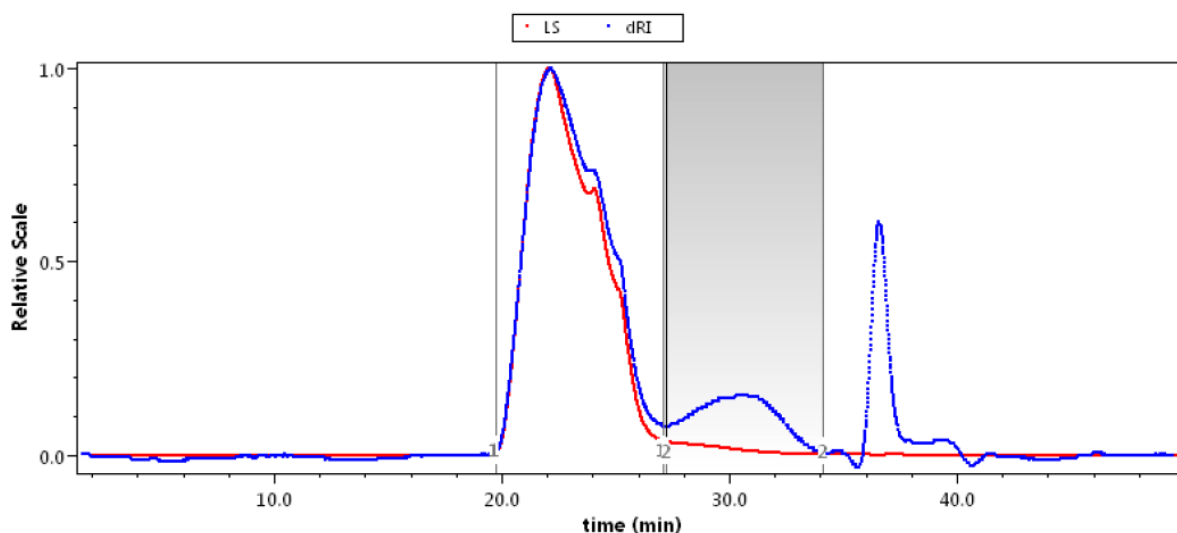
Data	Fit Model	Degree	R <sup>2</sup>	Extrapolation
Molar Mass	None	n/a	n/a	none
Rms Radius	None	n/a	n/a	none
Mean Square Radius	None	n/a	n/a	none

### Results

#### Peak Results

	Peak 1	Peak 2
<b>Masses</b>		
Injected Mass (µg)	100.00	100.00
Calculated Mass (µg)	80.19	13.92
Mass Recovery (%)	80.2	13.9
Mass Fraction (%)	85.2	14.8
<b>Molar mass moments (g/mol)</b>		
Mn	1.190×10 <sup>6</sup> (±2.771%)	8.027×10 <sup>4</sup> (±13.226%)
Mp	1.263×10 <sup>6</sup> (±1.915%)	5.329×10 <sup>4</sup> (±13.315%)
Mv	n/a	n/a
Mw	1.303×10 <sup>6</sup> (±2.636%)	1.114×10 <sup>5</sup> (±10.489%)
<b>Polydispersity</b>		
Mw/Mn	1.095 (±3.825%)	1.388 (±16.880%)
<b>rms radius moments (nm)</b>		
Rn	135.8 (±1.3%)	71.3 (±15.4%)
Rw	142.6 (±1.2%)	75.1 (±12.7%)
Rz	149.7 (±1.2%)	83.2 (±9.8%)

## 11.8.9 Cromatograma de SEC del HA producido a las 24 h de cultivo (HA15)



### Processing

Collection Time: Wednesday July 29, 2015 06:04:56 AM Paris, Madrid (heure d'été)

Processing Time: Friday July 31, 2015 01:51:47 PM Paris, Madrid (heure d'été)

#### Peak settings:

Peak Name	Peak 1	Peak 2
Peak Limits (min)	19.754 - 27.065	27.235 - 34.093
Light Scattering Model	Zimm	Zimm
Fit Degree	1	1
dn/dc (mL/g)	0.1500	0.1500
A2 (mol mL/g <sup>2</sup> )	0.000	0.000
UV Ext. Coef. (mL/(mg cm))	0.000	0.000

#### Results Fitting Procedure:

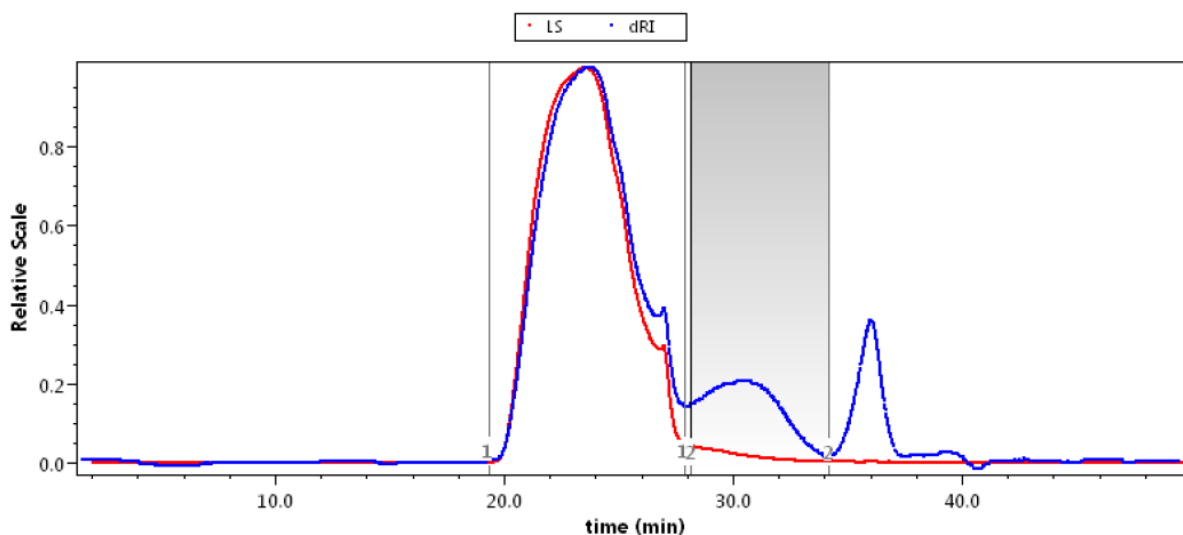
Data	Fit Model	Degree	R <sup>2</sup>	Extrapolation
Molar Mass	None	n/a	n/a	none
Rms Radius	None	n/a	n/a	none
Mean Square Radius	None	n/a	n/a	none

### Results

#### Peak Results

	Peak 1	Peak 2
<b>Masses</b>		
Injected Mass (µg)	100.00	100.00
Calculated Mass (µg)	54.92	9.81
Mass Recovery (%)	54.9	9.8
Mass Fraction (%)	84.8	15.2
<b>Molar mass moments (g/mol)</b>		
Mn	1.618×10 <sup>6</sup> (±2.534%)	1.181×10 <sup>5</sup> (±14.888%)
Mp	1.834×10 <sup>6</sup> (±1.824%)	7.712×10 <sup>4</sup> (±7.878%)
Mv	n/a	n/a
Mw	1.754×10 <sup>6</sup> (±2.254%)	1.610×10 <sup>5</sup> (±10.576%)
<b>Polydispersity</b>		
Mw/Mn	1.084 (±3.391%)	1.363 (±18.262%)
<b>rms radius moments (nm)</b>		
Rn	136.2 (±1.2%)	75.8 (±17.5%)
Rw	142.4 (±1.0%)	74.8 (±15.9%)
Rz	148.3 (±0.9%)	76.5 (±12.4%)

## 11.8.10 Cromatograma de SEC del HA producido a las 48 h de cultivo (HA16)



### Processing

Collection Time: Wednesday July 29, 2015 07:01:14 AM Paris, Madrid (heure d'été)

Processing Time: Friday July 31, 2015 01:53:18 PM Paris, Madrid (heure d'été)

#### Peak settings:

Peak Name	Peak 1	Peak 2
Peak Limits (min)	19.291 - 27.845	28.128 - 34.190
Light Scattering Model	Zimm	Zimm
Fit Degree	1	1
dn/dc (mL/g)	0.1500	0.1500
A2 (mol mL/g <sup>2</sup> )	0.000	0.000
UV Ext. Coef. (mL/(mg cm))	0.000	0.000

#### Results Fitting Procedure:

Data	Fit Model	Degree	R <sup>2</sup>	Extrapolation
Molar Mass	None	n/a	n/a	none
Rms Radius	None	n/a	n/a	none
Mean Square Radius	None	n/a	n/a	none

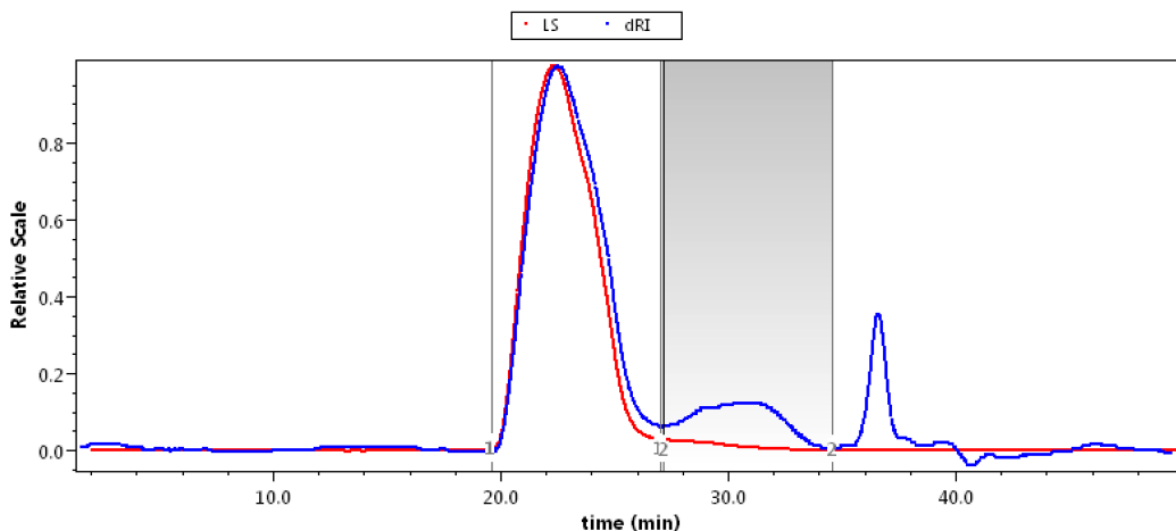
### Results

#### Peak Results

	Peak 1	Peak 2
<b>Masses</b>		
Injected Mass (µg)	100.00	100.00
Calculated Mass (µg)	106.70	18.95
Mass Recovery (%)	106.7	18.9
Mass Fraction (%)	84.9	15.1
<b>Molar mass moments (g/mol)</b>		
Mn	7.799×10 <sup>5</sup> (±2.085%)	5.403×10 <sup>4</sup> (±5.708%)
Mp	8.108×10 <sup>5</sup> (±1.335%)	4.155×10 <sup>4</sup> (±5.424%)
Mv	n/a	n/a
Mw	8.955×10 <sup>5</sup> (±1.632%)	6.379×10 <sup>4</sup> (±4.995%)
<b>Polydispersity</b>		
Mw/Mn	1.148 (±2.648%)	1.181 (±7.585%)
<b>rms radius moments (nm)</b>		
Rn	106.0 (±1.3%)	59.5 (±9.0%)
Rw	114.8 (±1.1%)	57.6 (±9.0%)
Rz	123.8 (±0.9%)	55.5 (±8.9%)



## 11.8.11 Cromatograma de SEC del HA producido a las 48 h de cultivo (HA17)



### Processing

Collection Time: Wednesday July 29, 2015 07:57:33 AM Paris, Madrid (heure d'été)  
 Processing Time: Friday July 31, 2015 01:55:07 PM Paris, Madrid (heure d'été)

#### Peak settings:

Peak Name	Peak 1	Peak 2
Peak Limits (min)	19.584 - 27.009	27.179 - 34.603
Light Scattering Model	Zimm	Zimm
Fit Degree	1	1
dn/dc (mL/g)	0.1500	0.1500
A2 (mol mL/g <sup>2</sup> )	0.000	0.000
UV Ext. Coef. (mL/(mg cm))	0.000	0.000

#### Results Fitting Procedure:

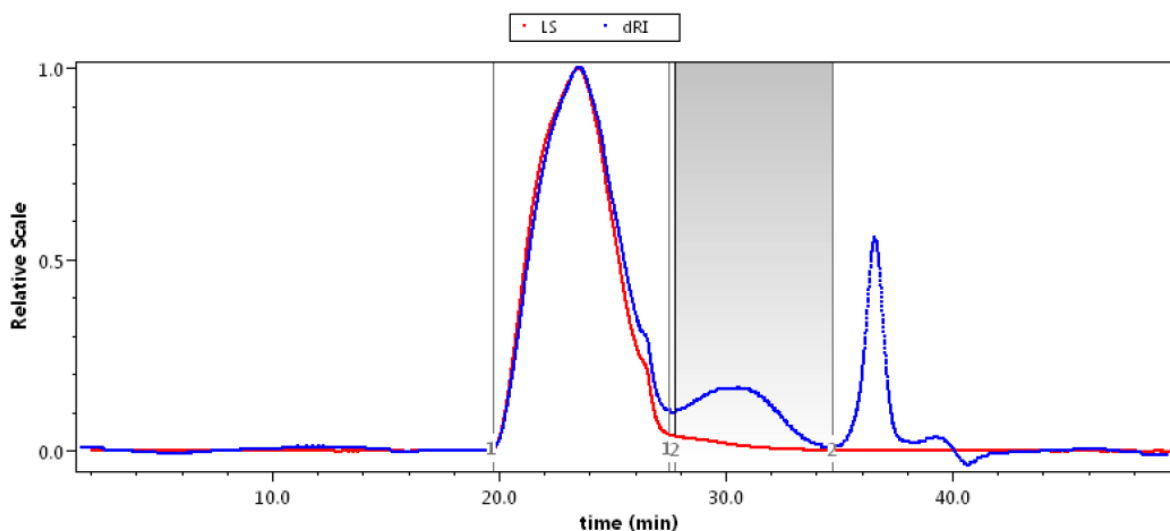
Data	Fit Model	Degree	R <sup>2</sup>	Extrapolation
Molar Mass	None	n/a	n/a	none
Rms Radius	None	n/a	n/a	none
Mean Square Radius	None	n/a	n/a	none

### Results

#### Peak Results

	Peak 1	Peak 2
<b>Masses</b>		
Injected Mass (µg)	100.00	100.00
Calculated Mass (µg)	75.40	12.55
Mass Recovery (%)	75.4	12.6
Mass Fraction (%)	85.7	14.3
<b>Molar mass moments (g/mol)</b>		
Mn	7.835×10 <sup>5</sup> (±1.849%)	5.849×10 <sup>4</sup> (±8.147%)
Mp	9.285×10 <sup>5</sup> (±1.234%)	3.347×10 <sup>4</sup> (±4.921%)
Mv	n/a	n/a
Mw	9.476×10 <sup>5</sup> (±1.492%)	8.425×10 <sup>4</sup> (±8.462%)
<b>Polydispersity</b>		
Mw/Mn	1.209 (±2.376%)	1.440 (±11.747%)
<b>rms radius moments (nm)</b>		
Rn	104.5 (±1.2%)	62.6 (±12.2%)
Rw	116.4 (±0.9%)	56.6 (±15.0%)
Rz	128.4 (±0.8%)	49.6 (±19.6%)

## 11.8.12 Cromatograma de SEC del HA producido a las 48 h de cultivo (HA48)



### Processing

Collection Time: Wednesday July 29, 2015 08:53:50 AM Paris, Madrid (heure d'été)

Processing Time: Friday July 31, 2015 01:57:02 PM Paris, Madrid (heure d'été)

#### Peak settings:

Peak Name	Peak 1	Peak 2
Peak Limits (min)	19.692 - 27.455	27.739 - 34.708
Light Scattering Model	Zimm	Zimm
Fit Degree	1	1
dn/dc (mL/g)	0.1500	0.1500
A2 (mol mL/g <sup>2</sup> )	0.000	0.000
UV Ext. Coef. (mL/(mg cm))	0.000	0.000

#### Results Fitting Procedure:

Data	Fit Model	Degree	R <sup>2</sup>	Extrapolation
Molar Mass	None	n/a	n/a	none
Rms Radius	None	n/a	n/a	none
Mean Square Radius	None	n/a	n/a	none

### Results

#### Peak Results

	Peak 1	Peak 2
<b>Masses</b>		
Injected Mass (µg)	100.00	100.00
Calculated Mass (µg)	99.30	17.36
Mass Recovery (%)	99.3	17.4
Mass Fraction (%)	85.1	14.9
<b>Molar mass moments (g/mol)</b>		
Mn	8.209×10 <sup>5</sup> (±1.826%)	6.924×10 <sup>4</sup> (±11.423%)
Mp	8.702×10 <sup>5</sup> (±1.337%)	5.235×10 <sup>4</sup> (±9.686%)
Mv	n/a	n/a
Mw	9.318×10 <sup>5</sup> (±1.634%)	9.107×10 <sup>4</sup> (±16.173%)
<b>Polydispersity</b>		
Mw/Mn	1.135 (±2.450%)	1.315 (±19.800%)
<b>rms radius moments (nm)</b>		
Rn	106.6 (±1.1%)	53.5 (±20.6%)
Rw	115.1 (±1.0%)	55.0 (±20.0%)
Rz	123.9 (±0.9%)	64.3 (±20.7%)

## 11.9 Análisis estadístico

### 11.9.1 Efecto del tiempo en la concentración de glucosa en el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*

*Cultivo sumergido con CGI de 2.5 g/L*

Response                    Glc\_CGI\_2\_5

#### Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Tiempo	8	7.544116	0.9430146	1448.07	0.000000*	1.000000
S(A)	9	5.860978E-03	6.512198E-04			
Total (Adjusted)	17	7.549977				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: Glc\_CGI\_2\_5

Term A: Tiempo

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=9 MSE=6.512198E-04 Critical Value=5.5947

Group	Count	Mean	Different From Groups
12	2	0.3005291	6, 4, 2
10	2	0.3026455	6, 4, 2
18	2	0.3068783	6, 4, 2
8	2	0.3121693	6, 4, 2
48	2	0.3248677	6, 4, 2
24	2	0.3269841	6, 4, 2
6	2	0.9555556	12, 10, 18, 8, 48, 24, 4, 2
4	2	1.796825	12, 10, 18, 8, 48, 24, 6, 2
2	2	1.969312	12, 10, 18, 8, 48, 24, 6, 4

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

*Cultivo sumergido con CGI de 5 g/L*

#### Analysis of Variance Table

Source	Sum of	Mean	Prob	Power
--------	--------	------	------	-------

Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level
<b>(Alpha=0.05)</b>					
A: Tiempo	8	22.95795	2.869743	280.67	0.000000* 1.000000
S(A)	9	9.202181E-02	1.022465E-02		
Total (Adjusted)	17	23.04997			
Total	18				

\* Term significant at alpha = 0.05

### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: Glc\_CGI\_5

Term A: Tiempo

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=9 MSE=1.022465E-02 Critical Value=5.5947

Group	Count	Mean	Different From Groups
24	2	1.899471	8, 6, 4, 2
18	2	1.936508	8, 6, 4, 2
12	2	2.010582	6, 4, 2
48	2	2.012346	6, 4, 2
10	2	2.07231	6, 4, 2
8	2	2.359788	24, 18, 6, 4, 2
6	2	3.481482	24, 18, 12, 48, 10, 8, 4, 2
4	2	4.679012	24, 18, 12, 48, 10, 8, 6
2	2	4.790123	24, 18, 12, 48, 10, 8, 6

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

### *Cultivo sumergido con CGI de 10 g/L*

#### Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
<b>(Alpha=0.05)</b>						
A: Tiempo	8	19.61457	2.451821	77.77	0.000000*	1.000000
S(A)	9	0.2837546	3.152829E-02			
Total (Adjusted)	17	19.89832				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: Glc\_CGI\_10

Term A: Tiempo

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=9 MSE=3.152829E-02 Critical Value=5.5947

**Different From**

Group	Count	Mean	Groups
10	2	5.566138	6, 4, 2
12	2	5.626102	6, 4, 2
48	2	5.957672	4, 2
24	2	6.05291	4, 2
8	2	6.074074	4, 2
18	2	6.074074	4, 2
6	2	6.469136	10, 12, 4, 2
4	2	8.222222	10, 12, 48, 24, 8, 18, 6
2	2	8.585538	10, 12, 48, 24, 8, 18, 6

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

### 11.9.2 Efecto de la CGI en el consumo de glucosa en el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*

Response Consumo\_glc\_global\_estático

#### Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: CGI_C	2	2.220899	1.11045	368.29	0.000258*	1.000000
S(A)	3	9.045411E-03	3.015137E-03			
Total (Adjusted)	5	2.229944				
Total	6					

\* Term significant at alpha = 0.05

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: Consumo\_glc\_global\_estático

Term A: CGI\_C

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=3 MSE=3.015137E-03 Critical Value=5.9080

Group	Count	Mean	Different From Groups
Glc 2.5	2	1.884656	Glc 5, Glc 10
Glc 5	2	2.922399	Glc 2.5, Glc 10
Glc 10	2	3.329806	Glc 2.5, Glc 5

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

### 11.9.3 Efecto del tiempo en la concentración de proteína soluble en el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*

*Cultivo sumergido con CGI de 2.5 g/L*

Response Proteína\_soluble\_CGI\_2\_5

#### Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Tiempo_C	8	7.594382	0.9492978	2.29	0.119805	0.533811
S(A)	9	3.736032	0.4151146			
Total (Adjusted)	17	11.33041				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

*Cultivo sumergido con CGI de 5 g/L*

Response Prot\_soluble\_CGI\_5

#### Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Tiempo_C	8	3.58595	0.4482437	2.02	0.158348	0.475767
S(A)	9	2.001239	0.2223598			
Total (Adjusted)	17	5.587189				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

*Cultivo sumergido con CGI de 10 g/L*

#### Analysis of Variance Report

Response Prot\_soluble\_CGI\_10

#### Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Tiempo_C	8	7.33636	0.9170451	2.90	0.066732	0.651286
S(A)	9	2.845337	0.3161486			
Total (Adjusted)	17	10.1817				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

**11.9.4 Efecto de la CGI en el rendimiento de producto a partir de sustrato ( $Y_{HA/S}$ ) y la productividad volumétrica ( $P_{HA}$ ), en el cultivo sumergido estático de *S. equi* subsp. *zooepidemicus***

*Rendimiento  $Y_{HA/S}$*

Response Y\_HA\_S\_48\_h

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
<b>(Alpha=0.05)</b>						
A: CGI	2	7.3057E-04	3.65285E-04	0.79	0.531706	0.102179
S(A)	3	1.395145E-03	4.650483E-04			
Total (Adjusted)	5	2.125715E-03				
Total	6					

\* Term significant at alpha = 0.05

*Productividad volumétrica*

Response PHA\_48h

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
<b>(Alpha=0.05)</b>						
A: CGI	2	2.173333E-06	1.086667E-06	0.81	0.524306	0.103631
S(A)	3	4.04E-06	1.346667E-06			
Total (Adjusted)	5	6.213333E-06				
Total	6					

\* Term significant at alpha = 0.05

**11.9.5 Efecto del tiempo en la concentración de glucosa en el cultivo sumergido agitado de *S. equi* subsp. *zooepidemicus***

*Cultivo sumergido con agitación de 0 rpm*

Ver ANOVA correspondiente al cultivo del sistema estático con CGI de 5 g/L (Anexo 11.8.1)

*Cultivo sumergido con agitación de 200 rpm*

Response: Glc\_200\_rpm

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Tiempo_r	7	19.26466	2.752094	482.49	0.000000*	1.000000
S(A)	8	4.563142E-02	5.703927E-03			
Total (Adjusted)	15	19.31029				
Total	16					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: Glc\_200\_rpm

Term A: Tiempo\_r

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=8 MSE=5.703927E-03 Critical Value=5.5962

Group	Count	Mean	Different From Groups
12	2	1.301587	6, 4, 2
10	2	1.319224	6, 4, 2
24	2	1.328042	6, 4, 2
48	2	1.40388	6, 4, 2
8	2	1.492064	6, 4, 2
6	2	1.867725	12, 10, 24, 48, 8, 4, 2
4	2	3.266314	12, 10, 24, 48, 8, 6, 2
2	2	4.453263	12, 10, 24, 48, 8, 6, 4

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

*Cultivo sumergido con agitación de 400 rpm*

Response Glc\_400\_rpm

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Tiempo_r	7	24.36055	3.480079	1077.07	0.000000*	1.000000
S(A)	8	2.584847E-02	3.231059E-03			
Total (Adjusted)	15	24.3864				
Total	16					

\* Term significant at alpha = 0.05



**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: Glc\_400\_rpm  
Term A: Tiempo\_r

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=8 MSE=3.231059E-03 Critical Value=5.5962

Group	Count	Mean	Different From Groups
24	2	1.068783	10, 8, 6, 4, 2
48	2	1.126984	10, 8, 6, 4, 2
12	2	1.194004	8, 6, 4, 2
10	2	1.37037	24, 48, 8, 6, 4, 2
8	2	1.753086	24, 48, 12, 10, 6, 4, 2
6	2	2.955908	24, 48, 12, 10, 8, 4, 2
4	2	4.021164	24, 48, 12, 10, 8, 6
2	2	4.190476	24, 48, 12, 10, 8, 6

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

*Cultivo sumergido con agitación de 600 rpm*

**Analysis of Variance Table**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Tiempo_r	7	33.63475	4.804965	530.48	0.000000*	1.000000
S(A)	8	7.246282E-02	9.057852E-03			
Total (Adjusted)	15	33.70722				
Total	16					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: Glc\_600\_rpm  
Term A: Tiempo\_r

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=8 MSE=9.057852E-03 Critical Value=5.5962

Group	Count	Mean	Different From Groups
24	2	0.8500882	10, 8, 6, 4, 2
48	2	0.8518519	10, 8, 6, 4, 2
12	2	1.097002	8, 6, 4, 2
10	2	1.340388	24, 48, 8, 6, 4, 2
8	2	1.895944	24, 48, 12, 10, 6, 4, 2
6	2	4.079365	24, 48, 12, 10, 8
4	2	4.112875	24, 48, 12, 10, 8
2	2	4.206349	24, 48, 12, 10, 8

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

### 11.9.6 Efecto de la agitación en el consumo de glucosa en el cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*

Response Consumo\_Glc\_global\_agitado

#### Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Agitacion_r	3	0.2072482	6.908271E-02	36.11	0.002349*	0.999262
S(A)	4	7.651895E-03	1.912974E-03			
Total (Adjusted)	7	0.2149				
Total	8					

\* Term significant at alpha = 0.05

#### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: Consumo\_Glc\_global\_agitado

Term A: Agitacion\_r

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=4 MSE=1.912974E-03 Critical Value=5.7569

Group	Count	Mean	Different From Groups
0 rpm	2	2.922399	400 rpm, 200 rpm, 600 rpm
400 rpm	2	3.195767	0 rpm
200 rpm	2	3.209877	0 rpm
600 rpm	2	3.37037	0 rpm

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

### 11.9.7 Efecto del tiempo en la concentración de proteína soluble en el cultivo sumergido agitado de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*.

0 rpm

Ver el ANOVA correspondiente del sistema estático con CGI 5 g/L, en el anexo 11.6.3.

200 rpm

Response Proteína\_200rpm

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Tiempo_r	7	1.748359	0.2497656	3.20	0.062577	0.644260
S(A)	8	0.624082	7.801025E-02			
Total (Adjusted)	15	2.372441				
Total	16					

\* Term significant at alpha = 0.05

400 rpm

Response Proteína\_400rpm

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Tiempo_r	7	1.699945	0.2428493	2.47	0.114333	0.519091
S(A)	8	0.7866668	9.833334E-02			
Total (Adjusted)	15	2.486612				
Total	16					

\* Term significant at alpha = 0.05

600 rpm

Response Proteína\_600rpm

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Tiempo_r	7	9.178244	1.311178	2.16	0.151372	0.459583
S(A)	8	4.85712	0.60714			
Total (Adjusted)	15	14.03536				
Total	16					

\* Term significant at alpha = 0.05

**11.9.8 Efecto de la agitación en el rendimiento de producto a partir del sustrado ( $Y_{HA/S}$ ) y productividad volumétrica de HA ( $P_{HA}$ ), en el cultivo sumergido de *S. equi* subsp. *zooepidemicus***

*Rendimiento  $Y_{HA/S}$*

Response Y\_HA\_S

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Agitacion	3	1.339558E-02	4.465194E-03	19.06	0.007836*	0.967559
S	4	9.369474E-04	2.342369E-04			
Total (Adjusted)	7	1.433253E-02				
Total	8					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: Y\_HA\_S

Term A: Agitacion

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=4 MSE=2.342369E-04 Critical Value=5.7569

Group	Count	Mean	Different From Groups
0 rpm	2	6.916946E-02	400 rpm, 600 rpm
200 rpm	2	9.276757E-02	400 rpm, 600 rpm
400 rpm	2	0.1562514	0 rpm, 200 rpm
600 rpm	2	0.1654038	0 rpm, 200 rpm

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

*Productividad volumétrica ( $P_{HA}$ )*

Response PHA

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Agitacion	3	6.157533E-05	2.052511E-05	17.27	0.009400*	0.952636
S	4	4.754335E-06	1.188584E-06			
Total (Adjusted)	7	6.632967E-05				
Total	8					

\* Term significant at alpha = 0.05

### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: PHA  
Term A: Agitacion

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=4 MSE=1.188584E-06 Critical Value=5.7569

<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>
0 rpm	2	5.585735E-03	400 rpm, 600 rpm
200 rpm	2	6.894873E-03	600 rpm
400 rpm	2	1.114181E-02	0 rpm
600 rpm	2	1.218138E-02	0 rpm, 200 rpm

**Notes:**

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.