

AJUSTE DE UN MODELO MATEMÁTICO PARA EL CRECIMIENTO DE
STREPTOCOCCUS PYOGENES EN 2 SUSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN
DE ÁCIDO HIALURÓNICO A ESCALA DE LABORATORIO

SANTIAGO CORDON PAEZ
JORGE ALEJANDRO PÉREZ MARTÍNEZ

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2016

AJUSTE DE UN MODELO MATEMÁTICO PARA EL CRECIMIENTO DE
STREPTOCOCCUS PYOGENES EN 2 SUSTRATOS PARA LA PRODUCCIÓN
DE ÁCIDO HIALURÓNICO A ESCALA DE LABORATORIO

SANTIAGO CORDON PAEZ
JORGE ALEJANDRO PÉREZ MARTÍNEZ

Proyecto integral de grado para optar por el título de
INGENIERO QUÍMICO

Directora
ADRIANA INÉS PAEZ MORALES
Microbióloga Industrial

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2016

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Bogotá D.C. 10 de junio de 2016

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. Jaime Posada Díaz

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. Luis Jaime Posada García – Peña

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. Ana Josefa Herrera

Decano de Facultad de Ingenierías

Ing. Julio Cesar Fuentes Arismendi

Director del programa de Ingeniería Química

Ing. Leonardo de Jesús Herrera Gutiérrez

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

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	24
OBJETIVOS	25
1. GENERALIDADES	26
1.1 ÁCIDO HIALURÓNICO	26
1.1.1 Estructura del ácido hialurónico	27
1.1.2 Propiedades reológicas del ácido hialurónico	27
1.1.3 Propiedades físico químicas del ácido hialurónico	28
1.2 COMERCIALIZACION	30
1.3 APLICACIONES DEL ÁCIDO HIALURÓNICO	32
1.3.1 Diagnóstico y medicamento	32
1.3.2 Ortopedia	33
1.3.3 Dermatología y cosmética	33
1.3.4 Oftalmología	34
1.4 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO POR VÍA QUÍMICA	34
1.5 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO POR VÍA BIOTECNOLÓGICA	36
1.5.1 Microorganismos	36
1.5.1.1 <i>Streptococcus zooepidemicus</i>	36
1.5.1.2 <i>Streptococcus equi</i>	37
1.5.1.3 <i>Streptococcus pyogenes</i>	37
1.5.1.4 <i>Bacillus subtilis</i>	38
1.5.1.5 <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	38
1.5.2 Metabolismo	38
1.5.3 Sustratos empleados	39
1.5.3.1 Sustratos definidos	40
1.5.3.2 Sustratos complejos	40
1.5.4 Características de operación	41
1.5.4.1 Tiempo	41
1.5.4.2 pH	41
1.5.4.3 Temperatura	41
1.5.4.4 Agitación	41
1.5.4.5 Aireación	42
1.5.4.6 Volumen	42
1.6 METODOS DE PURIFICACION	42
1.7 PARÁMETROS CINÉTICOS	44
1.7.1 Crecimiento microbiano	44
1.7.2 Consumo de sustrato	46
1.7.3 Producción metabolito	48

1.7.4 Rendimientos	49
2. MATERIALES Y METODOS	50
2.1 TIPO DE INVESTIGACION	50
2.2 MATERIALES Y EQUIPOS	50
2.2.1 Materiales	50
2.2.2 Equipos	54
2.3 MATERIAS PRIMAS	55
2.3.1 Cepa Bacteriana	55
2.3.2 Medios de cultivo	56
2.4 REACTIVOS	56
2.5 TECNICAS DE RECONOCIMIENTO	56
2.5.1 Coloración de Gram	57
2.5.2 Método de recuento en placa	57
2.5.3 Método colorimétrico DNS	58
2.5.4 Cromatografía líquida de alta resolución	58
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	59
3.1 CARACTERIZACION DEL MICROORGANISMO	59
3.1.1 Coloración de Gram	59
3.2 CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS	61
3.2.1 BHI	61
3.2.2 Suero de leche	61
3.3 DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO	63
3.4 FERMENTACIÓN MICROBIANA	63
3.4.1 Condiciones de operación	63
3.4.2 Preparación del inóculo	64
3.4.3 Fermentación	64
3.5. MÉTODO DE RECUENTO EN PLACA	65
3.5.1 Diluciones	65
3.5.2 Siembra	65
3.5.3 Obtención de datos	66
3.6 MÉTODO COLORIMETRICO DNS	67
3.7 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO POR HPLC	70
4. ANALISIS DE RESULTADOS	73
4.1 CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO	73
4.2 CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS	74
4.3 DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA TEMPERATURA	77
4.4 FERMENTACIÓN	77
4.5 CINETICA MICROBIANA	78
4.6 CONSUMO DE SUSTRATO	82

4.7 PRODUCCIÓN DE ACIDO HIALURONICO	91
5. CONCLUSIONES	93
6. RECOMENDACIONES	94
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXOS	102

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura ácido hialurónico	27
Figura 2. Ruta metabólica para la producción de ácido hialurónico	39
Figura 3. Schott de tapa azul	50
Figura 4. Tubo tapa rosca	51
Figura 5. Caja de Petri	51
Figura 6. Elementos de medición volumétrica	51
Figura 7. Balón aforado	52
Figura 8. Micropipeta	52
Figura 9. Puntas azules	52
Figura 10. Tubos Falcon	53
Figura 11. Frasco ámbar	53
Figura 12. Rastrillo	53
Figura 13. Comparación bacterias Gram positivas y Gram negativas	74

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Aplicaciones del ácido hialurónico como diagnosticador y medicamento	32
Cuadro 2. Aplicaciones del ácido hialurónico en dermatología y cosmética	33
Cuadro 3. Aplicaciones del ácido hialurónico en oftalmología	34
Cuadro 4. Contenido de ácido hialurónico en varios tejidos	34
Cuadro 5. Métodos de extracción y purificación de ácido hialurónico	42
Cuadro 6. Materiales	50
Cuadro 7. Equipos	54
Cuadro 8. Reactivos	56
Cuadro 9. Composición medio cultivo BHI	61
Cuadro 10. Composición de los sueros de leche	62
Cuadro 11. Metodología para elaborar curva patrón de glucosa	68
Cuadro 12. Macronutrientes	75
Cuadro 13. Micronutrientes	76
Cuadro 14. Comparación de parámetros de velocidad de formación de biomasa	82
Cuadro 15. Rendimientos globales de biomasa – sustrato	89
Cuadro 16. Comparación de parámetros de velocidad de consumo de sustrato	90
Cuadro 17. Comparación de rendimientos obtenidos	91

LISTA DE DIAGRAMAS

	pág.
Diagrama 1. Preparación de la curva de calibración	67
Diagrama 2. Determinación de la concentración de las muestras	69
Diagrama 3. Pretratamiento no. 1 de las muestras para HPLC	71
Diagrama 4. Pretratamiento no. 2 de las muestras para HPLC	71

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Contenido de agua en muestras de diferentes pesos moleculares	28
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de soluciones de ácido hialurónico	29
Tabla 3. UFC en diferentes temperaturas	63
Tabla 4. Crecimiento microbiano para fermentación de BHI	66
Tabla 5. Crecimiento microbiano para fermentación de suero de leche	66
Tabla 6. Preparación de soluciones de glucosa	68
Tabla 7. Resultados curva de calibración	69
Tabla 8. Absorbancias para muestras con BHI	69
Tabla 9. Absorbancias para muestras con suero de leche	70
Tabla 10. Concentraciones de glucosa en BHI	83
Tabla 11. Concentración de azúcares reductores en suero de leche	85
Tabla 12. Rendimientos instantáneos para BHI	88
Tabla 13. Rendimientos instantáneos para suero de leche	88

LISTA DE GRAFICAS

	pág.
Gráfica 1. Evaluación del crecimiento en función de la temperatura	77
Gráfica 2. Cinética de crecimiento de biomasa en BHI	78
Gráfica 3. Cinética de crecimiento de biomasa en suero de leche	79
Gráfica 4. Comparación de crecimiento microbiano entre BHI y suero de leche	80
Gráfica 5. Fase exponencial en BHI	81
Gráfica 6. Fase exponencial en suero de leche	82
Gráfica 7. Curva de calibración	83
Gráfica 8. Consumo de sustrato en BHI	84
Gráfica 9. Consumo de sustrato en suero de leche	85
Gráfica 10. Consumo de sustrato comparando BHI y suero de leche	86
Gráfica 11. Comparación del crecimiento de biomasa vs consumo de sustrato en BHI	87
Gráfica 12. Comparación del crecimiento de biomasa vs consumo de sustrato en suero de leche	88
Gráfica 13. Biomasa vs sustrato en BHI	89
Gráfica 14. Biomasa vs sustrato en suero de leche	90

LISTA DE IMÁGENES

	pág.
Imagen 1. Incubadora	54
Imagen 2. Agitador	54
Imagen 3. Espectrofotómetro	54
Imagen 4. Baño termostatado	55
Imagen 5. Centrífuga	55
Imagen 6. Coloración de Gram	60

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Difusividad como función de la concentración de ácido hialurónico	30
Ecuación 2. Tasa de cambio de la concentración de biomasa contra el tiempo	45
Ecuación 3. Concentración de biomasa en función del tiempo	45
Ecuación 4. Tasa de cambio de concentración de sustrato contra el tiempo	47
Ecuación 5. Concentración de sustrato en función del tiempo	47
Ecuación 6. Tasa de cambio de concentración de producto contra el tiempo	48
Ecuación 7. Concentración de producto en función del tiempo	48
Ecuación 8. Rendimiento biomasa – sustrato	49
Ecuación 9. Rendimiento producto – sustrato	49
Ecuación 10. Rendimiento producto – biomasa	49
Ecuación 11. UFC/mL reales	57

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Diagrama coloración de Gram	103
Anexo B. Diluciones y siembras realizadas para sustrato BHI	104
Anexo C. Diluciones y siembras realizadas para suero de leche	106
Anexo D. Imágenes de siembras realizadas de BHI para conteo	108
Anexo E. Imágenes de siembras realizadas de suero de leche para conteo	110
Anexo F. Muestras colorimetría DNS	112
Anexo G. Cálculos UFC/mL	.113
Anexo H. Concentraciones de curva de calibración	115
Anexo I. Concentraciones de glucosa en muestras de BHI y suero de leche	116
Anexo J. Calculo de rendimientos instantáneos biomasa – sustrato	118
Anexo K. Calculo de volúmenes para el pretratamiento de caldos de fermentación	119
Anexo L. Cartas Cromatografía líquida de alta resolución	120
Anexo M. Reportes obtenidos de Polymath V6.10	126
Anexo N. Protocolo prueba Carbazol para cuantificación de ácido hialurónico	131

ABREVIATURAS

BHI: *Brain and Heart infusion.*

HA: ácido hialurónico.

HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento.

m_s : coeficiente de preservación.

P: concentración de producto.

rpm: revoluciones por minuto.

rp: tasa de formación de producto.

rs: tasa de consumo de sustrato.

rx: tasa de crecimiento de biomasa.

R^2 : coeficiente de correlación.

S: concentración de sustrato.

S_0 : concentración de sustrato inicial.

SDS: sulfato dodecil sódico.

SL: suero de leche.

t: tiempo.

Δt : tiempo de retraso.

μ : tasa de crecimiento específica.

UFC: unidades formadoras de colonias.

vvm: volumen de aire por minuto.

X: concentración de biomasa.

X_0 : concentración de biomasa inicial.

X_m : concentración de biomasa máxima.

$Y_{X/S}$: rendimiento biomasa por sustrato consumido.

$Y_{P/X}$: rendimiento producto por biomasa producida.

$Y_{P/S}$: rendimiento producto por sustrato consumido.

GLOSARIO

ÁCIDO HIALURÓNICO: producto químico con buenas propiedades fisicoquímicas y reológicas, con alto valor comercial.

CEPA MICROBIANA: características específicas que identifican un grupo de microorganismos.

FASE DE ADAPTACIÓN: etapa de la cinética de crecimiento celular en la cual el microorganismo se adapta al medio cultivo.

FASE EXPONENCIAL: etapa en la cual los microorganismos se encuentran más activos y por ende se reproducen a una velocidad exponencial.

FASE ESTACIONARIA: etapa donde el crecimiento de los microorganismos se detiene, pero aún hay nutrientes para mantenerse vivas.

FASE DE MUERTE: etapa donde los microorganismos mueren por falta de nutrientes, en algunos casos las bacterias muertas sirven como nutrientes.

FERMENTACIÓN MICROBIANA: proceso en el cual los microorganismos utilizan los nutrientes del sustrato para realizar sus rutas metabólicas, con condiciones adecuadas, para producir un metabolito intracelular o extracelular.

INÓCULO: suspensión celular donde se adapta la cepa microbiana al sustrato previo a la fermentación.

MEDIO CULTIVO: mezcla de nutrientes hecha de manera adecuada utilizada para realizar la fermentación microbiana.

MEDIO CULTIVO COMPLEJO: es un medio cultivo donde no se conoce exactamente toda su composición química.

MEDIO CULTIVO DEFINIDO: es un medio cultivo del cual se conoce toda su composición química.

METABOLITO: cualquier sustancia química involucrada en una ruta metabólica ya sea como sustrato, intermediario o producto, en algunos casos biomasa.

METABOLITO PRIMARIO: es un metabolito presente en una ruta metabólica, que está asociado al crecimiento del microorganismo.

METABOLITO SECUNDARIO: es un metabolito presente en una ruta metabólica, que no está asociado al crecimiento del microorganismo y se da bajo condiciones de estrés.

MICROORGANISMO MESÓFILO: microorganismo el cual puede crecer en un rango de temperatura entre 20 y 45°C y su rango óptimo de temperatura se encuentra entre 35 y 40°C.

RUTA METABÓLICA: proceso bioquímico que llevan a cabo los microorganismos por medio de una sucesión de reacciones bioquímicas a partir de un sustrato llegando a un producto, para producir o consumir energía.

RESUMEN

El ácido hialurónico es un producto de gran valor comercial, su producción se ha venido realizando por vía biotecnológica en los últimos años y mejorando sustancialmente a través de varias investigaciones donde se prueban materias primas de bajo valor comercial, residuos industriales y desechos orgánicos, se optimizan las condiciones de los procesos y se analizan diferentes métodos de extracción para maximizar su concentración final producida.

Con esta iniciativa se realizó un proceso de fermentación, utilizando dos sustratos, uno definido y otro complejo, BHI y suero de leche respectivamente. Se utilizó una cepa *Streptococcus pyogenes*, se activó, se caracterizó la cepa y se determinó la temperatura adecuada para realizar la fermentación, se realizaba un inóculo un día antes de realizar la fermentación, se llevaron a cabo los procesos de fermentación en una incubadora con temperatura, agitación y durante un tiempo adecuado para ambos sustratos; fueron tomadas muestras periódicamente y a partir de estas se hizo un análisis de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato con varias técnicas específicas para cada cuantificación, recuento en placa por superficie y método colorimétrico DNS respectivamente; por último se determinó la presencia de ácido hialurónico usando la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento utilizando un patrón de ácido hialurónico con un peso molecular de 1,5 a 1,8 MDa.

INTRODUCCIÓN

El ácido hialurónico está presente de manera extensa en la naturaleza, se ha identificado en tejidos blandos de vertebrados como articulaciones, humor vítreo del ojo, cordones umbilicales, etc., de estos se obtenía antiguamente el metabolito, se realizaba la extracción de este compuesto utilizando gran cantidad de solventes químicos, siendo estos métodos muy costosos, además su obtención era limitada¹, por lo cual surgió una alternativa como la fermentación microbiana, a partir de microorganismos para optimizar el modelamiento, la simulación, el diseño y el proceso, también para mejorar las condiciones de operación, como operar a temperaturas cercanas a la del ambiente, presiones atmosféricas, pH neutro y sustratos fáciles de adquirirse, debido a que esto puede mejorar la gestión tanto ambiental y de calidad del proceso, la obtención de ácido hialurónico y la eficiencia del proceso².

Gracias a la caracterización del ácido hialurónico se descubrieron sus propiedades tales como naturaleza viscoelástica, biocompatibilidad, degradación en productos seguros y alta higroscopicidad, permitiendo el desarrollo de diversos productos comerciales convirtiéndose en una materia prima importante en la industria biomédica, entre las áreas donde tiene más aplicaciones están los cosméticos, farmacéutica, oftalmología, biorevitalización, urología, ortopedia y tratamientos de irritaciones en la piel o lesiones. La mayor cantidad de esta sustancia se encuentra en la piel de un humano, presente en la dermis y la epidermis en una cantidad de 0,5 mg/g de tejido húmedo³.

La importancia en la ingeniería química de este proyecto se basa en que actualmente los bioprocesos están siendo más llamativos con respecto a sus condiciones de operación, no requieren tantos gastos energéticos y los lapsos de producción pasan de días a horas, también se favorece una reutilización de materias primas como las cepas que se utilizan para cada proceso, por otro lado los medios de cultivo pueden ser tan complejos como se quiera, se puede producir el metabolito en cantidades determinadas a partir de residuos orgánicos ricos en sustancias con carbono y nitrógeno. Ahora se pueden determinar nuevos modelos matemáticos que describan estos procesos biotecnológicos.

¹ LAGO MENDOZA, G.; CREMATA, J. A. y COTO VALDÉS, G. Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones. En: Cubana De Farmacia. p. 100-190.

² BLANK, Lars y NIELSEN, Lars. Microbial Hyaluronic Acid production. En: Appl. Microbiol Biotechnol. vol. 66, p. 341-351.

³ SCHIRALDI, Chiara; LA GATTA, Annalisa y DE ROSA, Mario. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. En: [Anónimo]Biopolymers. INTECH, 2010. p. 387-412. ISBN 978-953-307-109-1.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Ajustar un modelo matemático para el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* en 2 sustratos para la producción de ácido hialurónico a escala de laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar 2 sustratos complejos para la producción de ácido hialurónico.
- Determinar la mejor temperatura para el crecimiento del microorganismo en el mejor sustrato complejo.
- Determinar los rendimientos P/X, P/S y X/S.

1. GENERALIDADES

En el siguiente capítulo se describirán conceptos que pueden contextualizar al lector con lo realizado en el presente proyecto, se explica desde el mercado y las aplicaciones del ácido hialurónico hasta sus principales vías de producción, esto con el fin de entrar más a detalle sobre la importancia de este compuesto químico en la actualidad y como la industria química tiene un papel tan importante en este aspecto.

1.1 ÁCIDO HIALURÓNICO

En el año 1934 el farmacéutico alemán Karl Meyer y su colega John Palmer, doctores de la Universidad de Columbia de Nueva York, lograron aislar un químico a partir del cuerpo vítreo de los ojos de las vacas, a raíz de su experimento decidieron bautizar el químico como ácido hialurónico por la palabra “hialoide” (vítreo) y ácido urónico. Al analizar el químico obtenido, Meyer concluyó que podría tener algún empleo terapéutico puesto que es sumamente viscoso.

El ácido hialurónico es un polisacárido lineal de origen natural que está compuesto de 2.000 a 25.000 disacáridos repetitivos de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina unidos alternativamente. La forma estructural fue determinada por primera vez casi 20 años después de su descubrimiento nuevamente por el alemán Karl Meyer en 1954⁴.

Aparte de encontrarse en el cuerpo vítreo, el ácido hialurónico es abundante en el líquido sinovial de las articulaciones y el espacio intercelular de la epidermis, cuantitativamente, más de 50% de ácido hialurónico se encuentra en la piel (dermis y epidermis) y alrededor de 35% en los músculos / esqueleto y desempeña un papel importante tanto para fines mecánicos y de transporte en el cuerpo. Debido a la gran cantidad presente y las funciones que tiene en el cuerpo es muy importante para la aplicación de diferentes campos, tales como gotas para comodidad del ojo, osteoartritis, cicatrización de heridas, anti envejecimiento periodontitis, etc.; por estos descubrimientos de su uso fue empezado a comercializarse por primera vez en el año 1942, cuando el científico húngaro Endre Balazs utilizó las técnicas de Meyer para sintetizar el ácido de las crestas de los gallos, que hoy en día sigue siendo una de las técnicas utilizadas para la obtención del mismo. También sabe que las cápsulas de algunas bacterias contienen ácido hialurónico, por lo tanto, puede también aislarse a partir de ciertas cepas de bacterias, tales como *Streptococos*, que fue reportado por primera vez en 1937 por Kendall et al. Se cultivaron *Streptococos* del grupo A y luego el

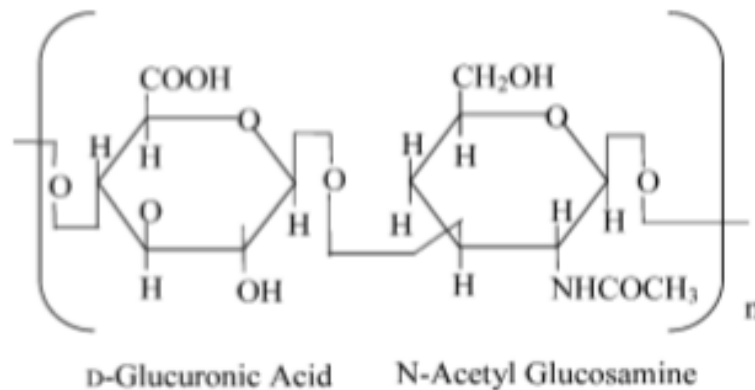
⁴ MEYER, Karl y PALMER, John. The polysaccharide of the vitreous humor. En: Journal Biological Chemistry. p. 629-634.

polisacárido se precipitó con etanol; la producción bacteriana de ácido hialurónico que implica una cepa de *Streptococcus zooepidemicus* fue descrito por primera vez en 1989, dando lugar a la primera comercialización de ácido hialurónico producido por la fermentación⁵.

1.1.1 Estructura del ácido hialurónico. El ácido hialurónico es un compuesto lineal, no ramificado, es un miembro de la familia de glicosaminoglicano que está compuesto de 2.000 a 25.000 disacáridos repetitivos de D-ácido glucurónico y N-acetilglucosamina unidos alternativamente por enlaces glicosídicos β 1-3 y β 1-4: [ácido- β 1,4 glucurónico β -1,3-N-acetil glucosamina]_n como se observa en la **Figura 1** que incluye sulfato de condroitina, sulfato de queratano y sulfato de heparina⁶. A diferencia de otros miembros de esta familia, es que no se encuentra unido covalentemente a las proteínas. Cada unidad de disacárido tiene un grupo carboxilo, cuatro grupos hidroxilo y un grupo acetamido. La diferencia entre el hialuronano y los otros grupos principales de glicosaminoglicanos es que no tiene grupos sulfatos.

El ácido hialurónico existe en una configuración espiral al azar, que es polianiónico a pH fisiológico. A altas pesos moleculares, estos enlaces aleatorios se enredan para formar un gel viscoelástico. Su solución manifiesta propiedades reológicas muy inusuales, es muy resbaladizo y es muy hidrofílico.

Figura 1. Estructura ácido hialurónico.



Fuente: BLANK, Lars y NIELSEN, Lars. Microbial Hyaluronic Acid production. En: Appl. Microbiol Biotechnol. vol. 66, p. 341-351.

1.1.2 Propiedades reológicas del ácido hialurónico. Las propiedades reológicas dependen en gran medida del peso molecular y la concentración del ácido hialurónico.

⁵ NECAS, J., et al. Hyaluronic acid (hyaluronan). En: Veterinarni Medicina. vol. 53, no. 8, p. 397-411.

⁶ BLANK, Lars y NIELSEN, Lars. Microbial Hyaluronic Acid production. En: Appl. Microbiol Biotechnol. vol. 66, p. 341-351.

El comportamiento se divide en tres regiones: diluida, semi-diluidas, y concentrada. En la región diluida, cada molécula actúa como una partícula suspendida y el comportamiento es casi de un fluido newtoniano. La viscosidad intrínseca del ácido hialurónico es muy alta, y la transición entre la región diluido y semi-diluida se produce a bajas concentraciones dependiendo del peso molecular.

En la región semi-diluida las interacciones de la cadena conducen a un fuerte comportamiento no newtoniano con la viscosidad, aumentando por encima de aproximadamente el 1,5% (e independiente del peso molecular), que entran en la región concentrada donde se forman las redes de última instancia donde se forman geles estables. El peso molecular afecta las funciones biológicas y la vida media del ácido hialurónico, así como las propiedades reológicas. Por ejemplo la mucoadherencia solo se observa cuando hay alto peso molecular de ácido hialurónico al igual que el efecto anti-inflamatorio⁷.

1.1.3 Propiedades físico químicas del ácido hialurónico. El ácido hialurónico es una macromolécula referida a hialuronano, la cual existe in vivo como un polianión y no como un ácido normalmente protonado, lo que hace que este ácido solo tenga un tipo de molécula independientemente de que sea un biopolímero⁸. Esta molécula es soluble en agua por lo cual da una propiedad a los fluidos a ser viscoelásticos, comparando el ácido hialurónico con otros polisacáridos polielectrolitos este retiene con mayor capacidad el agua, esta propiedad es mayor en moléculas de mayor peso molecular, como se observa en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Contenido de agua en muestras de diferentes pesos moleculares.

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

Fuente: PRUSOVA, Alena. The Hydration of Hyaluronic Acid. Brno: Brno University of technology, 2008. p. 1-82.

Debido a su alto grado de polimerización este ácido puede tener peso molecular desde 100.000 Da hasta 10 MDa. Esta propiedad depende demasiado de su origen y los métodos de purificación que se lleven a cabo, por lo general cada

⁷ SARANJA, P. Hyaluronic Acid Production and its Applications. En: International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives. p. 853-859.

⁸ PRUSOVA, Alena. The Hydration of Hyaluronic Acid. Brno: Brno University of technology, 2008. p. 1-82.

unidad de disacárido o monómero tiene un peso molecular de 401 Da aproximadamente.

Los enlaces de hidrógeno presentes en la molécula, hacen que esta molécula presente una hélice doble, donde el agua puede ser muy importante en la estabilización de su estructura molecular, el ácido hialurónico puede tener zonas hidrofílicas y zonas hidrofóbicas, lo que le da la característica de ser una sustancia anfifílica. Algunos factores pueden modificar las propiedades del ácido hialurónico si está en solución entre estos las interacciones electrostáticas de grupos carboxilo, los puentes de hidrógeno de monosacáridos adyacentes, la superposición o entrelazamiento del polímero y por último las interacciones de los parches hidrófobos⁹.

Algunas propiedades fisicoquímicas como la temperatura y la entalpía de fusión se han estudiado para soluciones con bajo contenido de ácido hialurónico, en la **Tabla 2** se presentan estas propiedades para soluciones desde 0,1% hasta 3% p/p en agua. Se observa que con el incremento de la concentración del ácido sin importar el peso molecular siempre provocara una disminución en la temperatura y la entalpía de fusión del agua.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de soluciones de ácido hialurónico.

Peso molecular (kDa)	Concentración %(p/p)	Temperatura de fusión (°C)	Entalpía de fusión (J/g)
253	0,1	-3,70	332,4
	0,5	-3,97	323,2
	1,0	-4,12	326,7
	1,5	-4,15	322,2
	2,0	-4,25	311,0
	2,5	-4,24	303,8
	3,0	-4,27	285,0
522	0,1	-3,82	332,7
	0,5	-3,96	327,6
	1,0	-4,12	328,7
	1,5	-4,20	325,0
	2,0	-4,29	323,4
	2,5	-4,36	319,4
	3,0	-4,46	315,2
740	0,1	-3,91	336,2
	0,5	-4,03	330,5
	1,0	-4,11	320,0

⁹ GARG, Hari y HALES, Charles. Chemistry and Biology of Hyaluronan. 1 ed. Boston: ELSEVIER, 2004. p. 1-6050 08 044382 6.

Tabla 2. (Continuación).

Peso molecular (kDa)	Concentración %(p/p)	Temperatura de fusión (°C)	Entalpía de fusión (J/g)
740	1,5	-4,17	324,9
	2,0	-4,28	310,9
	2,5	-4,40	317,3
	3,0	-4,46	308,8

Fuente: PRUSOVA, Alena. The Hydration of Hyaluronic Acid. Brno: Brno University of technology, 2008. p. 1-82. Adaptada por los autores.

Diferentes estudios se han hecho para otras propiedades fisicoquímicas del ácido hialurónico en solución como lo es la difusividad a través de coeficientes de auto difusión, experimentalmente se demostró que el comportamiento de estas soluciones con 0,2 M de NaCl a pH entre 4 y 8, al aumentar su concentración su coeficiente disminuía radicalmente hasta una concentración crítica. Los parámetros para la ecuación universal de difusividad solo se aplican para ácido hialurónico con peso molecular aproximadamente a 900 kDa, estos parámetros son $D_0 = 5,6 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$, $\alpha = 0,63 \text{ mL/mg}$ y $\nu = 0,74$, estos últimos dos describen la fuerza de las interacciones hidrodinámicas dentro del polímero y la contracción de las cadenas a altas concentraciones respectivamente. La **Ecuación 1** describe el comportamiento de la difusividad en términos de la concentración de ácido hialurónico¹⁰.

Ecuación 1. Difusividad como función de la concentración de ácido hialurónico.

$$D = D_0 \exp^{-\alpha c^\nu}$$

1.2 COMERCIALIZACION

El ácido hialurónico empezó a comercializarse desde alrededor de 1960 en Italia como un medicamento de uso tópico contra quemaduras y úlceras. En la década de 1970 varias investigaciones lograron encontrar aplicaciones médicas más específicas y optimización de procesos para la producción del mismo y salió al mercado el producto HEALON (una ayuda quirúrgica utilizada en la extracción de cataratas, trasplante de córnea, filtración del glaucoma, y la cirugía de fijación de la retina) después de haber salido este producto al mercado salieron al mercado más productos de este tipo como lo fue Viscoat, En base a costos de hospital, este mercado fue creciendo y volviéndose más competitivo en un estimado de US \$ 140 millones en todo el mundo y creciendo poco a poco con el envejecimiento de

¹⁰ GARG, Hari y HALES, Charles. Chemistry and Biology of Hyaluronan. 1 ed. Boston: ELSEVIER, 2004. p. 1-6050 08 044382 6.

la población; años después en Japón el ácido hialurónico empezó a utilizarse y comercializarse por Seikagaku para la viscosuplementación en las articulaciones artríticas en el año 1987. El mercado japonés se estableció rápidamente y para 1998 unos 2 millones de pacientes estaban recibiendo cerca de 14 millones de inyecciones anuales¹¹. En los Estados Unidos el ácido hialurónico fue aprobado por primera vez para la viscosuplementación en 1997, pero el mercado ha crecido desde un 15% anual¹².

En 1996, Genzyme llevo al mercado un producto que es una barrera adherida a carboximetilcelulosa con recubrimiento de ácido hialurónico, que desde entonces ha sido utilizado en 800.000 casos. El producto ha sido desarrollado para la gestión de la adhesión en la cirugía cardíaca, en la reparación de la hernia, reparación nasal / sinusal, la cirugía artroscópica y cirugía de columna. En los Estados Unidos, el costo de las adherencias se estima en US\$ 1,3 mil millones en costos hospitalarios directos solamente, y el potencial de mercado para los productos de barrera de adhesión es de US\$ 300 millones por año. Productos a base de ácido hialurónico de Q-Med y Genzyme fueron lanzados al mercado de Estados Unidos en noviembre de 2003 y lograron conseguir una cuota de mercado del 14% para el año¹³.

Hoy en día, el ácido hialurónico es usado en su gran mayoría en tratamientos cosméticos en los labios, los ojos, la piel, las encías y existen una gran variedad de productos de libre comercialización que son en base de ácido hialurónico como son las cremas inyectables y hasta pastillas los cuales son utilizados en muchos lugares especializados en belleza. En España hay 253 marcas comerciales de ácido hialurónico autorizadas para su uso en la cara, frente a tan solo 11 marcas autorizadas en Estados Unidos¹⁴. Lo que quiere decir que el mercado de este ácido está en aumento y tiene mayor potencial en Europa que en Estados Unidos; por otra parte, las tasas de incidencia de la osteoartritis, la gingivitis, heridas y úlceras y creciente base de población geriátrica son dos pilotes principales del mercado del ácido hialurónico. Las tendencias recientes del mercado sugieren que los niveles de gasto que atienden a los productos antienvjecimiento son en un constante aumento y se espera para impulsar la demanda de ácido hialurónico en los próximos 4 años.

El ácido hialurónico también ha sido identificado como uno de los pilares fundamentales para nuevos biomateriales con aplicaciones en medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos. La creciente demanda de biomateriales en

¹¹ BERND, H. y REHM, A. Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursor . Nueva Zelanda: Caister Academic Press, 2009. p. 294978-1-904455-36-3.

¹² CARDONA, Jesús. La Viscosuplementación como tratamiento alternativo en la osteoartritis. En: Medigraphic.

¹³ BLANK, Lars y NIELSEN, Lars. Microbial Hyaluronic Acid production. En: Appl. Microbiol Biotechnol. vol. 66, p. 341-351.

¹⁴ [Anónimo]Clínica gbcom, Reporte marcas con permiso de comercialización, España. [Print(0)]. [Consultado el Noviembre/32015]. Disponible en: <http://www.gbcom.es/>.

estos campos está en consecuencia espera que para servir al mercado con oportunidades de crecimiento futuro. Se espera que el mercado mundial de ácido hialurónico que crezca a una tasa compuesta anual de más del 9,0% durante el periodo de previsión, para llegar a US\$ 10,80 millones en 2020¹⁵.

1.3 APLICACIONES DEL ÁCIDO HIALURÓNICO

Gracias a la gran cantidad de propiedades con las que cuenta, su presencia en principales fluidos y componentes dentro del cuerpo humano y las funciones que este mismo realiza, el ácido hialurónico se ha vuelto popular y es cada vez más utilizado en varias ramas de la medicina, algunas de las principales son las siguientes:

1.3.1 Diagnóstico y medicamento. Por su comportamiento y composición, a partir del ácido hialurónico se han descubierto métodos que se utilizan para identificar, tratar y/o prevenir varias enfermedades, de otras como se muestra en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Aplicaciones del ácido hialurónico como diagnosticador y medicamento.

Aplicaciones	Usos
Como diagnosticador	Detección de carcinomas gástricos, determinación de la capacidad fecundante de semen humano y marcador serológico en pacientes con cirrosis y fibrosis hepática.
En el tratamiento del cáncer	Tratamiento del cáncer de mama y otros tumores malignos, combinando este, con un medicamento anticancerígeno como es la Novantrona o la Mitostrona, en forma de inyecciones intramusculares.
En enfermedades vaginales	Se ha empleado de forma tópica, mediante el cambio de equilibrio de la flora bacteriana vaginal junto con el Bacilo de Doberlein, para la prevención y tratamiento terapéutico de daños causados por suministro de estrógeno.

¹⁵ [Anónimo]Hyaluronic Acid Market By Products (Single Injection, Three Injection, Five Injection), By Application (Osteoarthritis, Adhesive Prevention, Drug Delivery, Dermal Fillers) Is Expected To Reach USD 10.80 Billion By 2020. [Electronic(1)]. [Consultado el Noviembre/12015]. Disponible en: <http://www.grandviewresearch.com/press-release/global-hyaluronic-acid-market>.

Cuadro 1. (Continuación).

Aplicaciones	Usos
Desordenes cardiovasculares	Tratamiento de los infartos o accidentes cerebrovasculares y en los daños de la isquemia en los tejidos.
Cirugía	Previene la adhesión en superficies tisulares.
Bronquitis crónica y el enfisema pulmonar	En forma de aerosoles actúa sobre las fibras elásticas protegiéndola.

Fuente: LAGO MENDOZA, G.; CREMATA, J. A. y COTO VALDÉS, G. Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones. En: Cubana De Farmacia. p. 100-190.

1.3.2 Ortopedia. El ácido hialurónico se usa para no tratar quirúrgicamente la osteoartritis de rodilla, esto debido a que las propiedades de viscoelasticidad y lubricación del líquido sinovial que se encuentra en las articulaciones están dadas por este, la osteoartritis es un proceso degenerativo, no reversible y progresivo donde se ve afectado de manera significativa el líquido sinovial. El ácido hialurónico se inyecta directamente a la articulación y sus efectos son alivio de dolor, mejora de calidad funcional y decelerar la progresión del deterioro articular¹⁶.

1.3.3 Dermatología y cosmética. La presencia de ácido hialurónico en la piel cumple la función de retener agua debido a las largas cadenas que puede llegar a formar por esta razón es utilizado en este campo de la medicina siendo las principales aplicaciones las que se observan en el **Cuadro 2**.

Cuadro 2. Aplicaciones del ácido hialurónico en dermatología y cosmética.

Producto	Aplicaciones
Producto obtenido mediante uniones o entrecruzamiento de ácido hialurónico con cationes poliméricos.	Aumenta sus efectos humectantes y suavizantes.
Ácido hialurónico polisulfatado.	Se emplea en necrosis tumoral, favoreciendo el desarrollo de células endoteliales.
Ácido hialurónico en forma de cremas.	Se emplea en el tratamiento del Escleroderma Sistemático localizado

Fuente: LAGO MENDOZA, G.; CREMATA, J. A. y COTO VALDÉS, G. Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones. En: Cubana De Farmacia. p. 100-190.

¹⁶ LAGO MENDOZA, G.; CREMATA, J. A. y COTO VALDÉS, G. Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones. En: Cubana De Farmacia. p. 100-190.

1.3.4 Oftalmología. Las principales aplicaciones en este campo de la medicina se pueden observar en el **Cuadro 3** y estas se deben a que el ácido hialurónico hace parte del cuerpo vítreo del ojo.

Cuadro 3. Aplicaciones del ácido hialurónico en oftalmología.

Aplicaciones	Acciones biológicas
Trasplante de cornea	Previene dislocaciones postoperatorias del injerto.
Operaciones de catarata	Reduce las complicaciones quirúrgicas y protege el endotelio, reduce el edema de la córnea.
Implante de lentes intraoculares	Protege el endotelio corneal.
Prótesis	Se emplea como lubricante en prótesis del bulbo ocular.
Síndrome del ojo seco	Se emplea el AH en solución salina isotopónica o propilenglicol.
Trabeculectomía	Se aplica en forma de hidrogeles entrecruzados, creando la viscosidad adecuada, dentro de la subconjuntiva.
Cirugía de la retina	Las soluciones al 1% ayudan a la manipulación de la retina en los procesos quirúrgicos.
Cirugía oftálmica general	Sustituto del humor vítreo.

Fuente: LAGO MENDOZA, G.; CREMATA, J. A. y COTO VALDÉS, G. Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones. En: Cubana De Farmacia. p. 100-190.

1.4 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO POR VÍA QUÍMICA

El ácido hialurónico de alto peso molecular se ha encontrado en muchas fuentes biológicas entre las cuales se encuentran las crestas de gallo, cordones umbilicales y glándulas submaxilares bovinas¹⁷, pero también se puede obtener con tejidos animales mostrados en el **Cuadro 4** que presentan alto contenido de ácido hialurónico.

Cuadro 4. Contenido de ácido hialurónico en varios tejidos.

Tejido o fluido corporal	Contenido (µg/mL)
Cresta de gallo	7.500
Cuerpo vítreo del ojo	140 – 340

¹⁷ COTO, Gabriel; PÉREZ, Carlos y et al. Isolation, purification and characterization of hyaluronan from human umbilical cord residues. En: Carbohydrate Polymers. vol. 62, p. 321-326.

Cuadro 4. (Continuación).

Tejido o fluido corporal	Contenido (µg/mL)
Líquido sinovial	1.400 – 3.600
Cartílago nasal bovino	1.200
Cordon umbilical	4.100
Epidermis humana	100
Dermis humana	200 – 500
Cerebro de conejo	65
Corazón de conejo	27
Fluido amniótico	20
Orina humana	0,1 – 0,3
Suero humano	0,01 – 0,1

Fuente: GARG, Hari y HALES, Charles. Chemistry and Biology of Hyaluronan. 1 ed. Boston: ELSEVIER, 2004. p. 1-6050 08 044382 6.

En un procedimiento completo para la obtención de ácido hialurónico por vía química incluye las etapas de homogeneización de tejidos, extracción, purificación y preparación del producto comercial final¹⁸.

Uno de los procesos más populares para la producción de ácido hialurónico por la vía química es a partir de crestas de gallo debido a que es el tejido con mayor cantidad de ácido hialurónico y se realiza de la siguiente manera: antes de la extracción las crestas de gallo se deben lavar a fondo con agua, acetona, etanol al 95% de pureza o una mezcla de etanol y cloroformo. Este procedimiento es necesario con el fin de evitar la destrucción enzimática y oxidativa del ácido hialurónico, que tiene un mecanismo de radicales libres con la participación de los iones de hierro, cobre y fosfato.

A continuación, los tejidos deben ser confinados en un homogeneizador, desintegrador o molino de bolas con el fin de permitir la máxima extracción. Diferentes disolventes podrían ser utilizados para la extracción, incluyendo agua destilada, a diferentes temperaturas, soluciones salinas y mezclas orgánicas acuosas; al momento de hacer la extracción al mismo tiempo, una inactivación de hialuronidasas se lleva a cabo, sin embargo, el ácido hialurónico se somete a la despolimerización parcial, independientemente de la hidrólisis enzimática. Por lo tanto, es necesario encontrar un rango óptimo de temperatura con el fin de garantizar la inactivación de las enzimas de descomposición por la alta temperatura y evitar o minimizar la destrucción del biopolímero¹⁹.

¹⁸ LAGO MENDOZA, G.; CREMATA, J. A. y COTO VALDÉS, G. Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones. En: Cubana De Farmacia. p. 100-190.

¹⁹ SELYANIN, Mikhail y BOYKOV, Petr. Hyaluronic Acid. Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine. 1 ed. Moscow: Wiley, 2015. p. 198978 1 118 63379 3.

1.5 PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO POR VÍA BIOTECNOLÓGICA

Desde el campo de las aplicaciones del ácido hialurónico se describe su gran importancia en la industria, por tal motivo se ha involucrado en la investigación el tema sobre su producción por vía microbiológica, la cual desde principios de 1980 se ha realizado con *Streptococos* del grupo C, entre los cuales se destaca como mayor productor de ácido hialurónico al microorganismo *Streptococcus zooepidemicus*; algunas cepas de este grupo ya sean de tipo salvaje o mutantes se han adaptado para producir este metabolito en alto rendimiento²⁰.

He aquí donde se centran las investigaciones en la actualidad, se profundiza más en factores de calidad del proceso tales como la pureza del ácido hialurónico, la distribución de tamaño y peso molecular, la separación del ácido y factores que involucren la economía del proceso.

1.5.1 Microorganismos. Dentro de la producción se debe tener en cuenta la cepa bacteriana a utilizar, la cual se va a encargar de realizar la fermentación dicha cepa puede ser un *Streptococo* del grupo A o del grupo C como los que se muestran a continuación, también se puede utilizar cepas mutantes las cuales son modificadas genéticamente para producir ácido hialurónico sin ningún conveniente como se puede tener al utilizar un *Streptococo* de estos grupos.

Las cepas recombinadas pueden ser *Streptococcus thermophilus*^{21,22}, *Pichia pastoris*²³, *Escherichia coli*²⁴ o *Bacillus subtilis*²⁵.

1.5.1.1 *Streptococcus zooepidemicus*. Es una subespecie de *Streptococcus equi*. crece a temperaturas cercanas a 37°C como un microorganismo facultativo anaeróbico, presente normalmente en los caballos como una flora bacteriana, y se ha podido aislar de mamíferos como vacas y conejos. Similar que otros *Streptococos*, esta bacteria es inmóvil, no esporulante, encapsulada, Gram positiva, presenta catalasa negativa y es una bacteria cocoide.

²⁰ FRANKE, Lukas; SMIRNOU, Dzianis y et al. Simultaneous determination of intracellular UDP-sugars in hyaluronic acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. En: Journal of Chromatography B. vol. 997, p. 194-199.

²¹ IZAWA, Naoki y SERATA, Mazaki. Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. vol. 111, no. 6, p. 665-670.

²² IZAWA, Naoki y HANAMIZU, Tomoko. *Streptococcus thermophilus* produces exopolysaccharides including hyaluronic acid. En: Journal of Bioscience and Bioengineering. vol. 107, no. 9, p. 119-123.

²³ JEONG, Euijoon y et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. En: Journal of Biotechnology. vol. 185, p. 28-36.

²⁴ YU, Huimin y STEPHANOPOULOS, Gregory. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. En: Metabolic Engineering. vol. 10, p. 24-32.

²⁵ WIDNER, B.; BEHR, R. y VON DOLLEN, S. Hyaluronic Acid production in *Bacillus subtilis*. En: Appl Environ Microbiol. vol. 71, no. 7, p. 3747-3752.

Es un *Streptococo* hemolítico β del grupo C que produce ácido hialurónico, estas bacterias en la microscopía óptica aparecen como células esféricas de un tamaño pequeño que crecen como pares o en cadenas rodeadas por una extensa cápsula extracelular, dicha cápsula es de ácido hialurónico la cual es tres veces el diámetro de la cápsula celular. Sus paredes celulares están compuestas por grupos de carbohidratos específicos y polímero mucopéptido.

En el proceso de fermentación este microorganismo puede producir tanto ácido hialurónico como ácido láctico, este último metabolito se puede regular si se reduce la eficiencia para la conversión del sustrato a ácido hialurónico. Cuando el microorganismo produce el ácido hialurónico la carga energética es inmensa, para elevar el rendimiento de las reacciones catabólicas se desea aumentar los niveles de NADH oxidasa nativa para disminuir y prevenir la formación de ácido láctico y posiblemente etanol. Estudios también demostraron que el polihidroxibutirato (PHB) puede regular la formación del metabolito al afectar el potencial celular de óxido-reducción, disminuyendo la fermentación de ácido láctico²⁶.

1.5.1.2 *Streptococcus equi*. Es un *Streptococo* tipo C que forma colonias en pares o cadenas, normalmente presente en caballos, es una bacteria facultativa anaerobia, presenta catalasa y oxidasa negativa, bacteria Gram positiva, es no móvil y se diferencia bioquímicamente de otro grupo C *Streptococo* por su incapacidad de fermentar sorbitol, lactosa y trehalosa.

Tiene un periodo de incubación de 3 a 21 días, las colonias son de color ámbar, provoca hemólisis, lo cual es la ruptura de glóbulos rojos en la sangre. Como es una bacteria invasiva utiliza como método de defensa la creación de una capsula de ácido hialurónico que la protege contra la fagocitosis²⁷.

1.5.1.3 *Streptococcus pyogenes*. Al igual que *Streptococcus zooepidemicus*, esta bacteria Gram positiva se clasifica como *Streptococo* β hemolítico ya que al cultivarse en agar sangre este rompe todas las células de la sangre. Este se clasifica en el grupo A debido a que en su pared celular se encuentra el antígeno A. Es la bacteria más patógena de todo el género *Streptococcus*.

Esta bacteria tiene proteínas que la hacen resistente a la fagocitosis. Además de la producción de ácido hialurónico, se han hecho varios estudios en biotecnología con este microorganismo sobre las enzimas que este libera y lo que esto puede

²⁶ [Anónimo] *Streptococcus zooepidemicus*. [Electronic(1)]. [Consultado el Noviembre/82015]. Disponible en: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_zooepidemicus.

²⁷ [Anónimo] *Streptococcus equi*. [Electronic(1)]. [Consultado el Abril/142016]. Disponible en: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_equi.

ayudar para prevenir enfermedades causadas por este microorganismo, a través de inhibición para evitar su unión al colágeno²⁸.

1.5.1.4 *Bacillus subtilis*. Este microorganismo anteriormente se conocía como *Vibrio subtilis*, también se conoce por *Bacillus uniflagellatus* o *Bacillus natto*. Estas bacterias son Gram positivas, con pared celular compuesta de peptidoglicano, se encuentran en el suelo y la vegetación en forma de barra, crecen en rangos de 25 a 35°C. este microorganismo ha desarrollado un conjunto de estrategias para la supervivencia en condiciones de escasos recursos, con la formación de endoesporas resistente a estrés de algún tipo físico. Estos microorganismos se han considerado estrictamente aerobios, es posible encontrarlos en suelos con mayores concentraciones de oxígeno y temperaturas relativamente suaves para ellos, estos también producen antibióticos y esporas de manera simultánea, antibióticos como polimixina o subtilina. Como regulación metabólica, los nutrientes requeridos por *Bacillus subtilis* al llegar a un punto máximo hace que se exhiba la actividad metabólica²⁹.

Al utilizar *Bacillus subtilis* para la producción de ácido hialurónico se debe emplear una cepa mutante, ya que esta no tiene el plásmido que tiene *Streptococcus zooepidemicus* para cumplir con la vía metabólica y sintetizar este compuesto.

1.5.1.5 *Streptococcus dysgalactiae*. Este microorganismo es un *Streptococo* del grupo C, bacteria gram positiva, se encuentra normalmente en animales como las vacas o corderos. Esta también al igual que *Streptococcus pyogenes* presenta factores patógenos. También hace parte de las bacterias ácido lácticas, donde su metabolismo de carbohidratos consiste en fermentaciones homolácticas o heterolácticas³⁰.

Sus usos en biotecnología a parte de la producción de ácido hialurónico se basan en el uso de la enzima hialuronidasa que puede degradar el ácido hialurónico y condroitina resultando en disacáridos no reductores, también se utiliza esta enzima para producir oligosacáridos.

1.5.2 Metabolismo. Como se observa en la **Figura 2** el proceso inicia con la glucosa la cual a través de la glucoquinasa pasa a glucosa 6-fosfato después con

²⁸ [Anónimo] *Streptococcus pyogenes*. [Electronic(1)]. [Consultado el Abril/202016]. Disponible en: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_pyogenes.

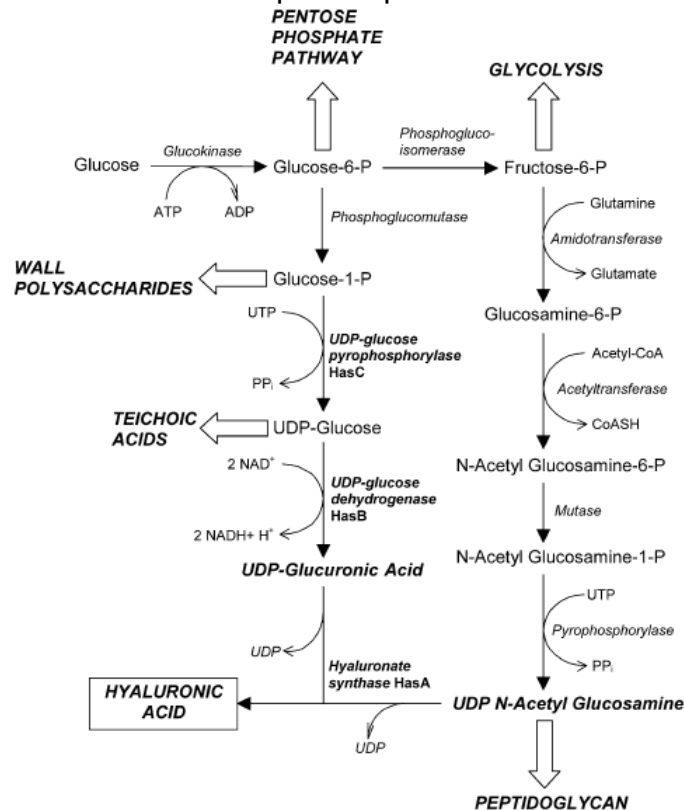
²⁹ [Anónimo] Taxonomy Browser (Bacteria). [Electronic(1)]. [Consultado el Noviembre/102015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=2&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

³⁰ [Anónimo] *Streptococcus dysgalactiae*. [Electronic(1)]. [Consultado el Abril/222016]. Disponible en: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_dysgalactiae.

la ayuda de la fosfoglucomutasa y la fosfoglucoisomerasa se producen respectivamente la glucosa 1-fosfato y la fructosa 6-fosfato, el primer camino a partir de la glucosa 1-fosfato con la presencia de la UDP-glucosapirfosforilasa la transforma en UDP-glucosa posteriormente una enzima del tipo deshidrogenasa forma el UDP – ácido glucurónico, por otro lado la fructosa 6-fosfato se convierte en glucosamina 6-fosfato con la actuación de una amidotransferasa.

Se sigue la ruta y se obtiene N-acetil glucosamina 6-fosfato con una enzima acetiltransferasa, se obtiene ahora N-acetilglucosamina 1-fosfato con una enzima mutasa y se remueve el grupo fosfato con la ayuda de la enzima pirofosforilasa para obtener UDP N-acetil glucosamina, este compuesto junto con el UDP- ácido glucurónico mediante una enzima llamada hialuronato sintetasa y con una remoción de UDP forma el ácido hialurónico.

Figura 2. Ruta metabólica para la producción de ácido hialurónico.



Fuente: BLANK, Lars y NIELSEN, Lars. Microbial Hyaluronic Acid production. En: Appl. Microbiol Biotechnol. vol. 66, p. 341-351.

1.5.3 Sustratos empleados. Para el proceso biotecnológico se han utilizado gran variedad de sustratos que cumplan con las necesidades que requiere el

microorganismo para poder desarrollarse y ejecutar la ruta metabólica que se muestra en la **Figura 2** estos pueden ser complejos como definidos teniendo como ventaja los medios de cultivo definidos ya que están químicamente definidos y se caracteriza con más exactitud su composición nutritiva, pero sin despreciar los sustratos complejos ya que al ser residuos industriales su valor comercial es bajo y puede tener la cantidad necesaria de carbohidratos para seguir esta ruta metabólica.

1.5.3.1 Sustratos definidos. Estos sustratos son de alto valor comercial y en su gran mayoría son hidrolizados que se preparan en agua destilada.

- Maltosa en concentraciones de 20 g/L.
- Glucosa en concentraciones de 60 g/L.
- Sacrosa y extracto de levadura en concentraciones de 70 g/L y 25 g/L respectivamente.
- Almidón, glucosa y peptona en concentraciones de 50 g/L, 3 g/L y 5 g/L respectivamente.
- Glucosa y extracto de levadura en concentraciones de (10 – 60) g/L y 10 g/L respectivamente.
- Glucosa y uridina en concentraciones de 20 g/L y 50 mg/L respectivamente³¹.

Entre muchos otros donde solo se varían las composiciones y concentraciones de carbohidratos y extractos de proteínas.

1.5.3.2 Sustratos complejos. Como sustratos complejos tenemos aquellos medios que no están definidos en su composición y calidad. En varias investigaciones se utilizan estos sustratos con el fin de determinar si el proceso es viable y aumentar su rentabilidad debido a que normalmente son residuos industriales o no tienen algún un valor reducirían considerablemente el costo total del proceso, estos son algunos utilizados en investigaciones previas:

- Aguas residuales de procesamiento de mejillones.
- Peptona de vísceras de atún³².
- Peptona de soya³³.
- Bagazo de manzana³⁴.

³¹ LIU, Long, et al. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. En: Microbial Cell Factories. vol. 10, no. 99, p. 1-9.

³² VÁZQUEZ, José, et al. Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. En: Microbial Cell Factories. vol. 9, no. 46, p. 1-10.

³³ BENEDINI, Leandro y ANDRADE, María. Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of Hyaluronic Acid. En: Bioresource Technology. vol. 130, p. 798-800.

- Suero de queso concentrado de proteínas³⁵.

1.5.4 Características de operación. Como cualquier proceso en ingeniería química se debe llevar un control de las variables del proceso y dentro de que rangos se pueden establecer éstas mismas. Para la obtención de ácido hialurónico se han hecho investigaciones donde se pueden ver diferentes variables, entre ellas:

1.5.4.1 Tiempo. Los tiempos de producción están muy ligados a los tiempos de crecimiento del microorganismo hasta la fase estacionaria, la cual para estos microorganismos mesófilos está entre 24 a 48 horas³⁶.

1.5.4.2 pH. Esta variable es importante tenerla en cuenta debido a que el microorganismo se podría morir a pesar que los utilizados para este proceso tienen un rango de tolerancia amplio, su rango siempre debe estar alrededor del pH neutro entre 6 a 8.

1.5.4.3 Temperatura. Al tratarse de un microorganismo mesófilo su rango de temperatura óptima se encuentra entre 35 y 45°C por lo que es primordial determinar la temperatura recomendable para su crecimiento y controlarla, así mismo para optimizar el proceso con el mayor crecimiento de bacterias, para microorganismos mesófilos el crecimiento empieza alrededor de 10°C hasta su temperatura óptima, luego estos empiezan a tener una lisis celular la cual llega hasta aproximadamente los 50°C donde pueden morir.

1.5.4.4 Agitación. Esta variable se controla por medio de agitadores, esta depende directamente del volumen a fermentar o de la viscosidad del caldo de fermentación, teniendo valores de 200, 400, 500 o 600 rpm, entre más viscoso sea el sustrato, más alta debe ser la agitación.

³⁴ DE MACEDO, A. C. y SANTANA, M. Hyaluronic acid depolymerization by ascorbate-redox effects of solid state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in cashew apple fruit bagasse. En: World Journal of Microbiology and Biotechnology. vol. 28, p. 2213-2219.

³⁵ AMADO, Isabel y VÁZQUEZ, Jose. Cheese wey: A cost effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. En: Food Chemistry. vol. 198, p. 54-61.

³⁶ PARÉS I FARRAS, R. Bioquímica De Los Microorganismos. Barcelona: Reverté, 2002. p. 38384 - 291 - 7454 – 0.

1.5.4.5 Aireación. Este proceso no presenta aireación debido a que los microorganismos utilizados en el proceso son facultativos anaeróbicos o se pueden tener niveles bajos de velocidades de aireación alrededor de 0, 0,05, 0,3, 0,5, 1 o 1,3 vvm con concentraciones de oxígeno disuelto de 10% aproximadamente³⁷.

1.5.4.6 Volumen. Los volúmenes de fermentaciones a escala laboratorio se han hecho en reactores batch con volúmenes de 100 a 500 mL y 1 a 7 L. De igual forma se han realizado estudios en biorreactores semibatch con volúmenes iguales. Y una escala mayor se ha tenido hasta volúmenes de 100 L.

1.6 METODOS DE PURIFICACION

Para obtener un alto grado de pureza de ácido hialurónico se debe tener en cuenta que después de todo el proceso por vía química, se obtienen más compuestos indeseados, es por eso que se debe hacer una separación y purificación respectivamente para obtener este producto final.

Sin embargo, el proceso no es igual siempre, depende de qué tipo de producto se desea y también de su fuente de producción o tejido, algunos ejemplos se encuentran en el **Cuadro 5**.

Cuadro 5. Métodos de extracción y purificación de ácido hialurónico.

Fuente	Extracción	Purificación	Producto final
Cresta de gallo	Agua 100°C, 6 tiempos.	Papaína; Ultrafiltración en 40% de mezcla agua – etanol.	Polvo liofilizado de hialuronato de sodio.
Cresta de gallo	Agua.	Extracto de calentamiento a 90 – 100°C; remoción de lípidos; filtración; tratamiento con carbón activado.	Polvo de hialuronano liofilizado.
Cresta de gallo y pollo.	Agua acidificada, pH 3 – 4 , 90 – 100°C, 40 – 50 min.	Tratamiento con carbón activado luego filtración con celulosa.	Polvo de hialuronano liofilizado con contenido de proteína debajo de 0.5%.

³⁷ LIU, Long, et al. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. En: Microbial Cell Factories. vol. 10, no. 99, p. 1-9.

Cuadro 5. (Continuación).

Fuente	Extracción	Purificación	Producto final
Cresta de gallo y pollo	Agua, 2 extracciones.	Tratamiento con cloroformo; precipitación con etanol.	Polvo de hialuronano liofilizado con contenido de proteína debajo de 0.05%.
Cresta de gallo.	Solución fisiológica, 80 – 90°C, 2 extracciones.	Filtración; precipitación con ácido acético saponificado con hidróxido de sodio a pH 7,0 – 7,3 ; el calentamiento a 80 – 90°C; filtración repetible.	Polvo liofilizado libre de ácidos nucleicos.
Cresta de gallo	Agua, 3 extracciones.	La precipitación con ácido tricloroacético (1 – 2%) a partir del volumen de extracto en 20 – 22°C para 1 – 2 h; La eliminación de lípidos y agua con acetona y éter tres veces.	Polvo liofilizado.
Cresta de gallo	1 – 15% solución NaCl a 60°C, Rendimiento 1,92% del material de partida.	Centrifugación; liofilización.	Similar a la fibra sustancia blanca; contenido de proteína 9 – 24%; densidad óptica de la solución acuosa del 0,1% 0,1 – 0,14 a 540 nm.

Fuente: SELYANIN, Mikhail y BOYKOV, Petr. Hyaluronic Acid. Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine. 1 ed. Moscow: Wiley, 2015. p. 198978 1 118 63379 3.

Por medio de la producción biotecnológica se han desarrollado varios métodos de separación y purificación del ácido, antes se utilizaba solventes como el cloruro de cetilpiridinio el cual era muy selectivo al ácido hialurónico o se usaban enzimas proteolíticas, muchos de estos métodos ya no se utilizan por sus operaciones multietapas, costos y los reactivos no convencionales debido a su toxicidad.

Garantizando un alto peso molecular de ácido hialurónico lo primero que se debe hacer es utilizar un bactericida para destruir los microorganismos por un método químico ya puede ser formaldehído o alcoholes como el isopropanol o etanol en concentraciones moderadas que eviten la aglomeración del ácido hialurónico. Posteriormente se hace uso de surfactantes que liberen la adhesión de este metabolito a las capsulas microbianas, utilizando NaCl, sulfato dodecil sódico o TWEEN 80, en concentraciones muy bajas³⁸.

Algunos procesos utilizan ácido tricloroacético (1 – 3%) y posteriormente un tratamiento con carbón activado para lograr una fácil separación del ácido hialurónico de otros componentes presentes; los procedimientos consiguientes pueden variar se pueden prefiltrar el caldo de fermentación para retirar las células muertas y sólidos en suspensión o hacer una centrifugación alrededor de las 6000 rpm por 1 hora, y finalmente se hace una microfiltración con bombeo de 0,22 a 0,45 μm ³⁹.

Otros métodos de separación indican una diafiltración con membrana permeable que se basa en fuerzas impulsoras para separar líquidos de sólidos⁴⁰, otros procesos pueden llevar una electrodeposición antes, procedida de una precipitación alcohólica con un tratamiento alcalino para recuperar el ácido hialurónico por suspensión alcalina⁴¹. También se ha hecho la separación mediante ultrafiltración⁴².

1.7 PARÁMETROS CINÉTICOS

Al trabajar con microorganismos es necesario tener en cuenta los siguientes parámetros, los cuales se pueden utilizar posteriormente para el diseño y estudio de biorreactores donde se involucran estos 3 tipos de velocidades de reacción.

1.7.1 Crecimiento microbiano. Para este proceso se tiene que tener en cuenta varios modelos de cinéticas, de acuerdo al proceso, para crecimiento microbiano se debe hacer un estudio a la fase de latencia donde la concentración de microorganismos está en función del periodo de latencia.

³⁸ CARLOS DURAN MOYA. Medio de cultivo y procedimiento para la preparación de ácido hialurónico de alto peso molecular. Inventor(es): FLAVIA CAZZOLA, MICHAEL O'REGAN y VINCENZA CORSA. 0716688. España, 2 211 883. p. 1-15. 2004.

³⁹ JAGADEESWARA, Reddy y KARUNAKARAN, K. T. Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain. En: Journal Bioscience Biotech. vol. 2, no. 3, p. 173-179.

⁴⁰ LEBLANC, Pierrick y OUESLATI, Nadia. A simple methodology for predicting the performances of hyaluronic acid purification by diafiltration. En: Journal of Membrane Science. vol. 490, p. 152-159.

⁴¹ MURADO, M. A. y MONTEMAYOR, M. I. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. En: Food and Bioproducts Processing. vol. 90, p. 491-498.

⁴² ZHOU, Haidong y NI, Jinren. Separation of hyaluronic acid from fermentation broth by tangential flow microfiltration and ultrafiltration. En: Separation and Purification Technology. vol. 52, p. 29-38.

Para representar el crecimiento microbiano se utiliza el modelo de crecimiento exponencial el cual está representado por la **Ecuación 2**, donde μ es la tasa de crecimiento específica y X es la concentración de biomasa que se puede obtener en un cultivo correspondiente.

Ecuación 2. Tasa de cambio de la concentración de biomasa contra el tiempo.

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

Resolviendo la **Ecuación 2** en los límites de $t = 0$ con $X = X_0$ (concentración de biomasa inicial), se obtiene la **Ecuación 3** que describe la fase exponencial, en función del tiempo⁴³.

$$\begin{aligned}\frac{dX}{X} &= \mu dt \\ \int_{X_0}^X \frac{dX}{X} &= \int_0^t \mu dt \\ \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) &= \mu t \\ \frac{X}{X_0} &= e^{\mu t}\end{aligned}$$

Ecuación 3. Concentración de biomasa en función del tiempo.

$$X = (X_0 e^{\mu t})$$

Durante la fermentación el microorganismo crece mediante un comportamiento muy complejo, se han realizado experimentaciones con ecuaciones logísticas donde se tiene en cuenta la fracción de carga que involucra la concentración de biomasa con la concentración máxima producida. La ecuación logística que describe el comportamiento de la biomasa se representa mediante la **Ecuación 4** donde se pueden representar varios sistemas de polisacáridos de fermentación, como es el caso presente.

⁴³ DORAN, Pauline. Bioprocess Engineering Principles. San Diego: Academic press inc., 1995. p. 4550-12-220855-2.

Ecuación 4. Ecuación logística para el crecimiento microbiano.

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

Donde X_m es la concentración máxima de biomasa, μ la tasa de crecimiento específica y X la concentración de biomasa, resolviendo la **Ecuación 4** en las condiciones de frontera de $X = X_0$ en $t = 0$, se puede obtener la **Ecuación 5**.

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)} = \int_0^t \mu dt$$

$$\ln\left(\frac{X}{1 - \frac{X}{X_m}}\right)_{X_0}^X = \mu t$$

$$\ln\left(\frac{\frac{X}{1 - \frac{X}{X_m}}}{\frac{X_0}{1 - \frac{X_0}{X_m}}}\right) = \mu t$$

$$\frac{X \left(1 - \frac{X_0}{X_m}\right)}{X_0 \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)} = e^{\mu t}$$

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

$$X(X_m - X_0) = X_0 e^{\mu t} (X_m - X)$$

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

Ecuación 5. Concentración de biomasa en función del tiempo.

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

1.7.2 Consumo de sustrato. Para el consumo de sustrato se utiliza la ecuación Leudeking – Piret – Like, utilizando un balance de masa generalizado, donde S es la concentración de sustrato en g/L y m_s es el coeficiente de mantenimiento (g_{glucosa} / g_{biomasa} h), el balance de masa generado se representa por la **Ecuación 6**.

Ecuación 6. Tasa de cambio de concentración de sustrato contra el tiempo.

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

Esta expresión evaluada desde unas condiciones iniciales $t = 0$ y $S = S_0$ (concentración de sustrato inicial) junto con la ecuación que se obtiene para el crecimiento del microorganismo en la **Ecuación 3**, resulta en la **Ecuación 7** que describe la concentración de sustrato en función del tiempo⁴⁴.

$$\begin{aligned} -\int_{S_0}^S dS &= \frac{1}{Y_{X/S}} \int_0^t dX + m_s \int_0^t X dt \\ -(S - S_0) &= \frac{1}{Y_{X/S}} (X)_0^t + m_s \int_0^t X_0 e^{\mu t} dt \\ -(S - S_0) &= \frac{1}{Y_{X/S}} (X_0 e^{\mu t} - X_0) + m_s (X_0 e^{\mu t} - X_0) \end{aligned}$$

Ecuación 7. Concentración de sustrato en función del tiempo.

$$S = S_0 - \frac{X_0 e^{\mu t}}{Y_{X/S}} + \frac{X_0}{Y_{X/S}} - \frac{m_s}{\mu} X_0 e^{\mu t} + \frac{X_0 m_s}{\mu}$$

Resolviendo la **Ecuación 6**, junto con la **Ecuación 5** que se obtuvo para el crecimiento microbiano se puede obtener una expresión para la cantidad de sustrato en función del tiempo con la **Ecuación 8**.

$$\begin{aligned} -\int_{S_0}^S dS &= \frac{1}{Y_{X/S}} \int_0^t dX + m_s \int_0^t X dt \\ -(S - S_0) &= \frac{1}{Y_{X/S}} (X)_0^t + m_s \int_0^t \frac{X_0 X_m e^{\mu t}}{(X_m - X_0 + X_0 e^{\mu t})} dt \\ -(S - S_0) &= \frac{1}{Y_{X/S}} \left(\frac{X_0 X_m e^{\mu t}}{(X_m - X_0 + X_0 e^{\mu t})} - \frac{X_0 X_m e^{\mu 0}}{(X_m - X_0 + X_0 e^{\mu 0})} \right) \\ &\quad + \frac{m_s X_m}{\mu} \text{Ln} \left(\frac{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu t}}{X_m} \right) \end{aligned}$$

⁴⁴ MAT DON, Mashitah y SHOPARWE, Noor Fazliani. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. En: Biochemical Engineering Journal. vol. 49, p. 95-103.

Ecuación 8. Concentración de sustrato en función del tiempo.

$$S = S_0 - \frac{X_0 X_m e^{\mu t}}{Y_{X/S} (X_m - X_0 + X_0 e^{\mu t})} + \frac{X_0}{Y_{X/S}} - \frac{m_s X_m}{\mu} \ln\left(\frac{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu t}}{X_m}\right)$$

1.7.3 Producción metabolito. Para la última fase se utiliza la ecuación cinética de Leudeking- Piret, donde la tasa de formación de producto (dP/dt) es función de la concentración instantánea de biomasa (X) y la tasa de crecimiento microbiano (dX/dt), donde se puede observar 2 constantes empíricas (α y β) que dependen tanto de las condiciones de operación y del microorganismo, estas expresiones de velocidades de reacción son muy útiles para ajustar datos de fermentaciones donde se obtienen productos como biopolímeros, también se puede determinar esta tasa de formación de producto (dP/dt) con una relación específica con la tasa de crecimiento microbiano mediante el rendimiento P/X, como se expresa en la **Ecuación 9**.

Ecuación 9. Tasa de cambio de concentración de producto contra el tiempo.

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

Esta ecuación se puede resolver introduciendo un parámetro de tiempo de retraso, debido a que la formación del producto en la fase de latencia es muy baja, con las nuevas modificaciones las condiciones de evaluación serán en $t = t - \Delta t$ y $t = 0 - \Delta t$, obteniendo la expresión de la **Ecuación 10**⁴⁵.

$$\int_0^P dP = Y_{P/X} \int_{0-\Delta t}^{t-\Delta t} dX$$

$$P = Y_{P/X} (X)_{0-\Delta t}^{t-\Delta t}$$

$$P = Y_{P/X} (X_0 e^{\mu t})_{0-\Delta t}^{t-\Delta t}$$

Ecuación 10. Concentración de producto en función del tiempo.

$$P = Y_{P/X} (X_0 e^{\mu_0(t-\Delta t)} - X_0 e^{-\mu_0 t})$$

⁴⁵ LIU, Long, et al. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. En: Bioresource Technology. vol. 99, p. 8532-8536.

Siguiendo el proceso de la ecuación logística se puede obtener la ecuación logística para la formación de ácido hialurónico reemplazando la **Ecuación 5** en la **Ecuación 9**, como se observa en la **Ecuación 11**.

Ecuación 11. Concentración de producto en función del tiempo.

$$P = Y_{P/X} \left(\frac{X_o X_m e^{\mu(t-\Delta t)}}{(X_m - X_o + X_o e^{\mu(t-\Delta t)})} - \frac{X_o X_m e^{-\mu \Delta t}}{(X_m - X_o + X_o e^{-\mu \Delta t})} \right)$$

1.7.4 Rendimientos. Los rendimientos que se calculan anteriormente para los 3 modelos dan una idea de que tan eficiente es el proceso, estos se describen de la siguiente forma de manera matemática⁴⁶⁴⁷:

Ecuación 12. Rendimiento biomasa – sustrato.

$$Y_{X/S} = -\frac{dX}{dS} = \frac{r_X}{r_S}$$

Ecuación 13. Rendimiento producto – sustrato.

$$Y_{P/S} = -\frac{dP}{dS} = \frac{r_P}{r_S}$$

Ecuación 14. Rendimiento producto – biomasa.

$$Y_{P/X} = \frac{dP}{dX} = \frac{r_P}{r_X}$$

⁴⁶ LIU, Long, et al. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. En: Bioresource Technology. vol. 99, p. 8532-8536.

⁴⁷ DORAN, Pauline. Bioprocess Engineering Principles. San Diego: Academic press inc., 1995. p. 4550-12-220855-2.

2. MATERIALES Y METODOS

En este capítulo se describirá los recursos que se van a utilizar durante toda la investigación, se detallaran herramientas físicas como son equipos, reactivos, materias primas, etc. Como herramientas teórico - prácticas como son caracterizaciones y métodos de cuantificación.

2.1 TIPO DE INVESTIGACION


A partir del documento tipología de proyecto de carácter científico, tecnológico e innovación emitido por Colciencias se puede clasificar este proyecto como una investigación científica de desarrollo experimental donde se va utilizar un conocimiento ya existente para la mejora sustancial del ya existente.

2.2 MATERIALES Y EQUIPOS




Para el desarrollo experimental es necesario utilizar varios equipos y materiales que se describen a continuación.

2.2.1 Materiales. Los materiales son utilizados para realizar las experimentaciones necesarias entre estos están los siguientes:




Cuadro 6. Materiales.

Material	Características	Uso	Imagen
Schott de vidrio tapa azul	Fabricado en vidrio borosilicato transparente, están adaptados a la norma ISO 4796, cuentan con anillo anti goteó, su tapa es de color azul y presenta resistencia hasta temperaturas de 140°C. Marca schott. Su volumen puede ser entre 200 mL a 1 L.	Por sus características de materiales, se pueden esterilizar con facilidad y son utilizados para realizar la fermentación.	Figura 3. Schott de tapa azul.  Fuente: Disponible en internet < http://www.mariefeld-superior.com/ >.




Cuadro 6. (Continuación).

Material	Características	Uso	Imagen
<p>Tubos de ensayo tapa rosca.</p>	<p>Estos tubos son hechos en vidrio borosilicato transparente, tapa negra y con arandela de butilo/PTFE lo que los hace altamente resistente a grandes temperaturas permitiendo así su esterilización. Sus dimensiones son de 15 x 150 mm y tiene aproximadamente un volumen de 20 mL.</p>	<p>Estos tubos son utilizados para realizar diluciones y así poder sembrar las bacterias correctamente al desarrollar la técnica de cuantificación UFC.</p>	<p>Figura 4. Tubo tapa rosca.</p>  <p>Fuente: Disponible en internet <http://www.equipamientonafinsa.com/>.</p>
<p>Cajas de Petri</p>	<p>Recipiente redondo, hecho de vidrio, posee diferentes diámetros, es de fondo bajo, con una cubierta de la misma forma que la placa, pero un poco más grande de diámetro, ya que se puede colocar encima y cerrar el recipiente.</p>	<p>Son utilizadas para realizar la siembra de la cepa ya sea para activarla, pruebas de temperatura o para la técnica de recuento en placa.</p>	<p>Figura 5. Caja de Petri.</p>  <p>Fuente: Disponible en internet <www.a3bs.com></p>
<p>Elementos de medición volumétrica</p>	<p>Son elementos de laboratorio normalmente de vidrio, que tiene como función medir con gran exactitud volúmenes de líquidos. Entre estos encontramos pipeta, probeta, vaso de precipitado, etc.</p>	<p>Son utilizados para medir volúmenes de reactivos para la preparación de otros.</p>	<p>Figura 6. Elementos de medición volumétrica.</p>  <p>Fuente: Disponible en internet <http://slideplayer.es/slide/1651920/></p>

Cuadro 6. (Continuación).




Material	Características	Uso	Imagen
Balón aforado	Son elementos de laboratorio volumétricos, normalmente fabricados en vidrio, con alto nivel de precisión en la medición. Su tamaño puede variar entre 100 mL o más de 1 L.	Utilizado para completar volúmenes necesarios en la preparación de reactivos.	<p>Figura 7. Balón aforado.</p>  <p>Fuente: Disponible en internet <www.labotienda.com></p>
Micropipeta	Es un instrumento de laboratorio utilizado para medir con exactitud volúmenes de líquido muy pequeños (menores a 1 mL).	Utilizado para tomar muestras pequeñas para realizar las diluciones y las siembras en la técnica de cuantificación de UFC/mL.	<p>Figura 8. Micropipeta.</p>  <p>Fuente: Disponible en internet <www.pfhlabmedic.com.pe></p>
Puntas azules	Son elementos de laboratorio, fabricados en plástico, desechables una vez utilizados. Son utilizados con la micropipeta, para sacar muestras de volúmenes muy pequeños de 0,1 a 1 mL.	Son utilizados para realizar las diluciones en la técnica de cuantificación UFC	<p>Figura 9. Puntas azules.</p>  <p>Fuente: Disponible en internet <www.elementosquimicos.com.co></p>

Cuadro 6. (Continuación).



Material	Características	Uso	Imagen
Tubos Falcon	Tubos de fondo cónico, fabricados en polipropileno, graduados, su volumen puede ser entre 15 mL y 50 mL.	Son utilizados para realizar centrifugaciones	<p>Figura 10. Tubos</p>  <p>Falcon.</p> <p>Fuente: Disponible en internet: <www.cientificaschonfeld.com.ar></p>
Frasco ámbar	Son frascos de cristal de topacio lo que le hace dar un color ámbar, puede tener diferentes tamaños y el color permite conservar sustancias sensibles a la luz.	Este frasco es utilizado para hacer y conservar el reactivo DNS.	<p>Figura 11. Frasco</p>  <p>ámbar.</p> <p>Fuente: Disponible en internet <www.reactivosyequipos.com.mx></p>
Rastrillo	Es un tubo de vidrio con la punta curva o doblada, puede ser una probeta que se haya roto y fue modificada.	Utilizado para homogenizar las siembras de las diluciones en las cajas de Petri en la técnica de cuantificación de UFC.	<p>Figura 12. Rastrillo.</p>  <p>Fuente: Disponible en internet <www.marienfeld-superior.com></p>

2.2.2 Equipos. Para poder realizar la experimentación es necesario utilizar equipos para generar las condiciones que requiere el proceso microbiológico entre los cuales se encuentran los siguientes:

Cuadro 7. Equipos.

Equipos	Características	Uso	Imagen
Incubadora	Equipos de diferentes características que tiene como función generar las condiciones adecuadas de temperatura y humedad para el crecimiento y reproducción de seres vivos.	Se utiliza para generar las condiciones adecuadas para la fermentación.	<p>Imagen 1. Incubadora.</p> 
Agitador	Equipo de laboratorio que se utiliza para revolver mezclas de químicos o para generar agitación en algún cultivo microbiológico. Modelo: DSR 2100V	Se utiliza para generar la agitación en la fermentación.	<p>Imagen 2. Agitador.</p> 
Espectrofotómetro	Es un equipo de análisis químico que se basa en la longitud de onda, este equipo proyecta una luz monocromática a través de una muestra y mide cuanta cantidad de luz es absorbida.	Este equipo es utilizado para realizar la técnica colorimétrica DNS.	<p>Imagen 3. Espectrofotómetro.</p> 

Cuadro 7. (Continuación).

Equipos	Características	Uso	Imagen
Baño termostataado	Es un instrumento de laboratorio, el cual consta de un recipiente y un intercambiador de calor pequeño con la finalidad de mantener una sustancia a una temperatura deseada, también utilizado para hacer baño maría.	Utilizado para preparar las muestras en la prueba de colorimetría DNS.	<p data-bbox="1174 359 1406 426">Imagen 4. Baño termostataado.</p> 
Centrífuga	Es un equipo que rota a velocidades grandes, por medio de la fuerza centrífuga hace aumentar la velocidad de sedimentación y/o hacer precipitar sólidos en suspensión en las muestras.	Se utiliza para preparar las muestras en la prueba de colorimetría DNS y cromatografía líquida.	 <p data-bbox="1133 1041 1446 1077">Imagen 5. Centrífuga.</p>

2.3 MATERIAS PRIMAS

A continuación, se describen las materias primas utilizadas en el proyecto, las cuales comprenden al microorganismo y los sustratos que se cuantificaron.

2.3.1 Cepa Bacteriana. La cepa utilizada en el proyecto es la *Streptococcus Pyogenes*, Gram positiva, la cual estaba conservada a -90°C , se activó primero ambientándola a temperatura adecuada para poder ser sembrada en agar sangre debido a que es un *Streptococo* β -hemolítico y tiene afinidad por este sustrato, posteriormente se lleva a incubadora durante 24 horas a 36°C , la cual es una temperatura a la cual este microorganismo crece a una alta velocidad, posteriormente se conserva en refrigeración.

2.3.2 Medios de cultivo. Los medios cultivos utilizados en este proyecto son el BHI (*Brain – Heart Infusion*) de origen comercial marca Merck fabricado en Alemania identificado con el número de orden: 1.10493.0500 y el suero de leche obtenido del proceso de fabricación de queso como un residuo de la industria de lácteos.

2.4 REACTIVOS

Los reactivos que se muestran en el **Cuadro 8** se van a emplear en el proyecto, son utilizados para preparar reactivos y realizar varias técnicas como son la coloración de Gram, el método colorimétrico DNS.

Cuadro 8. Reactivos.

Reactivo	Uso
Cristal Violeta de Gram.	Se utiliza para la prueba de coloración de Gram como colorante.
Lugol de Gram.	Se utiliza para fijar el colorante Cristal Violeta en la coloración de Gram.
Alcohol acetona de Gram.	Se utiliza para remover el exceso de colorante en la coloración de Gram.
Fucsina de Gram.	Se utiliza para la prueba de coloración de Gram como colorante de contraste.
DNS	Reactivo principal para realizar la prueba de colorimetría DNS.
Solución patrón glucosa 2g/L	Reactivo necesario para realizar la curva de calibración en prueba de colorimetría DNS.
Solución salina al 0,85% p/v	Se utiliza como solvente para realizar las diluciones para la siembra.
NaCl	Utilizado en el pretratamiento de las muestras para la prueba de HPLC.
SDS 5% p/v	Utilizado en el pretratamiento de las muestras para la prueba de HPLC.
Etanol 70% v/v	Utilizado como bactericida.

2.5 TECNICAS DE RECONOCIMIENTO

Las técnicas que se utilizaron en la siguiente experimentación se llevaron a cabo con el fin de determinar las características del microorganismo y su manipulación, y cuantificar por medio de estos el comportamiento de las variables involucradas

en el proceso como el crecimiento microbiano, el consumo de sustrato y la producción de ácido hialurónico.

2.5.1 Coloración de Gram. Este método de identificación se encarga de clasificar las bacterias en Gram positivas o Gram negativas, dependiendo de sus componentes en la pared celular, su fundamento se basa en un coloración diferencial donde se aplican colorantes selectivos en un orden específico, para determinar si la bacteria tiene una pared con gran o poca cantidad de peptidoglicano, y respectivamente determinar si la bacteria es Gram positiva o negativa, estos colorantes se utilizan con el fin de contrastar las células y así poder observarlas a través de un microscopio con mayor facilidad⁴⁸.

2.5.2 Método de recuento en placa. Es un método que se utiliza bastante cuando se debe determinar la población de bacterias en una muestra. Se basa en que cada microorganismo generara una colonia visible, debido a que la muestra no puede ser totalmente homogénea en cuanto a su composición microbiológica una colonia puede producirse a partir de uno o cientos de microorganismos, resultando con un conteo erróneo, también puede inferir las condiciones de operación como el pH, temperatura, composición y tiempo para que el microorganismo no crezca y el recuento sea inferior al real⁴⁹.

Es fundamental que cada colonia se forma por lo menos a partir de un microorganismo, considerando esto como una unidad formadora de colonia o UFC para obtener los resultados.

El desarrollo experimental se inicia con una suspensión preparada con 0,1 mL de muestra para preparar el inóculo, se preparan diluciones seriadas de 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000 del inóculo respecto a un volumen final de 10 mL. Se rotulan las cajas de Petri para cada dilución agregando una solución agar-agar, se incuban a 37°C y posteriormente se hacen conteos periódicamente. Se deben escoger las muestras que tengan entre 30 y 300 UFC y luego realizar el factor de dilución⁵⁰.

Ecuación 15. UFC/mL reales.

$$\frac{UFC}{mL} = (\# \text{ colonias entre } 30 \text{ y } 300) * (\text{dilución})^{-1} * 10$$

⁴⁸ MADIGAN, Michael y PARKER, Jack. Brock, Microbiología De Los Microorganismos. Barcelona: Pearson, 2008. p. 108984 - 205 - 3679 – 2.

⁴⁹ UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE, Facultad de agroindustrias. Trabajo práctico N°5 - Estudio cuantitativo de bacterias. [Electronic(1)]. [Consultado el Noviembre/52015]. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp5.pdf>

⁵⁰ MAT DON, Mashitah y SHOPARWE, Noor Fazliani. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. En: Biochemical Engineering Journal. vol. 49, p. 95-103.

2.5.3 Método colorimétrico DNS. El fundamento de este método se basa en que el reactivo DNS reacciona únicamente con los azúcares reductores, la sacarosa al ser un disacárido no es un azúcar reductor, pero por su hidrólisis se obtiene glucosa y fructosa que son reductores y reaccionan con el DNS generando una solución coloreada. La intensidad del color se puede medir mediante una técnica de espectrofotometría para determinar la concentración de sacarosa utilizando patrones con concentraciones de azúcares reductores conocidas para construir una curva de calibración que se ajuste a estos datos y así encontrar los valores desconocidos de las muestras a analizar.

Esta técnica emplea ácido 3,5 dinitrosalicílico para la hidrólisis de polisacáridos presentes en una muestra, junto con la presencia de azúcares reductores este reacciona y se reduce a ácido 3-amino 5-nitrosalicílico⁵¹. Se determinan las absorbancias por medio del espectrofotómetro a 540 nm, se utiliza para cuantificar azúcares reductores producidos o consumidos durante una fermentación o cuantificar productos de reacciones enzimáticas.

2.5.4 Cromatografía líquida de alta resolución. Esta técnica comúnmente conocida como HPLC (High Performance Liquid Chromatography), se realiza en una columna para análisis de compuestos químicos y bioquímicos. Se utilizan cromatografías de muchos tipos en los bioprocesos para la cuantificación de biomoléculas, en donde una muestra se distribuye en 2 fases basándose en diferentes tipos de interacciones químicas, en donde una permanece estacionaria y la otra es una fase móvil.

El proceso de cromatografía ocurre como resultado de repetidos equilibrios entre los componentes de la muestra presentes en las dos fases inmiscibles, donde estas fases se separan con ayuda de la fase estacionaria la cual contiene sólidos porosos que retienen las partículas y la fase móvil que puede llevar un componente que sea selectivo para separar el compuesto de interés con ayuda de un solvente. Los cromatógrafos deben constituirse de unos dispositivos de instrumentación debido a que las columnas modernas son de alta eficacia y las partículas en la fase estacionaria son de diámetros pequeños, los componentes de instrumentación a tener en cuenta son: dispositivos de suministro de eluyentes como bombas, dispositivos de inyección, conducciones y conexiones, detectores y registradores y la columna⁵².

⁵¹ MILLER, Gail. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. En: Pioneering Research Division. vol. 31, no. 3, p. 426-428.

⁵² GISMERA, María. Introducción a La Cromatografía Líquida De Alta Resolución. España: Universidad Autónoma de Madrid, 2009. 9788483441459 8483441454.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se describirá el proceso realizado para llevar a cabo la producción de ácido hialurónico a partir de sustratos como suero de leche y BHI, utilizando la cepa *Streptococcus pyogenes*, se describirán los diferentes procedimientos para realizar la fermentación y como se obtuvieron los resultados en las técnicas de reconocimiento y cuantificación.

3.1 CARACTERIZACION DEL MICROORGANISMO

Para realizar la fermentación se utilizó la cepa descrita anteriormente la cual se debe reconocer y caracterizar debidamente para evitar fallos en el proceso, ya que esta bacteria se encuentra en el grupo C de *Streptococos*, los cuales tienen como principal característica tener una cápsula extracelular hecha de ácido hialurónico como exopolisacárido.

Al caracterizar la bacteria se asegura en gran parte la producción de ácido hialurónico por fermentación microbiana, ya que se establecen propiedades que tiene este microorganismo y se evitan errores como usar una cepa inadecuada.

3.1.1 Coloración de Gram. La coloración de Gram como se explicó en el capítulo 2 es un método para determinar los componentes de la pared celular de las bacterias por coloración diferencial. Este método se realizó utilizando como reactivos:

- Cristal violeta.
- Lugol.
- Alcohol acetona.
- Fucsina.
- Aceite de inmersión.

Para realizar el método se requiere de un ambiente con condiciones estériles para evitar posible contaminación de endoesporas de otras bacterias u otros microorganismos; el procedimiento a realizar se expone con más detalle en el **Anexo A**, el cual explica paso a paso la coloración de Gram. Previamente se activó la bacteria 24 horas antes de la caracterización para tener suficiente muestra que analizar e inocular posteriormente para la fermentación.

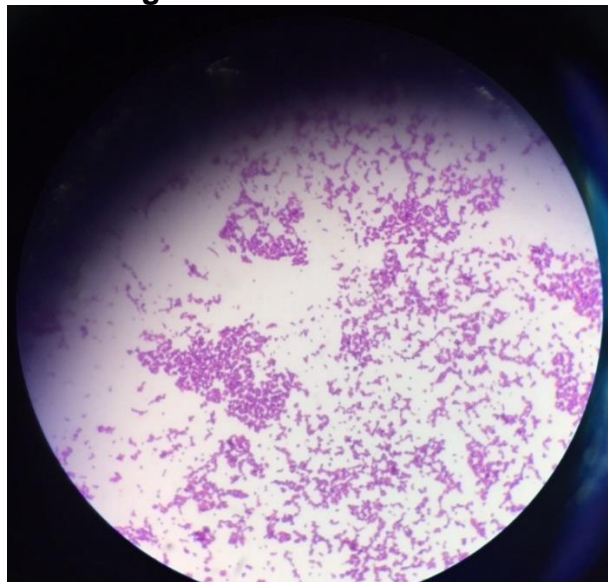
Siguiendo el proceso descrito en el **Anexo A** primero se realizó el frotis con el asa preliminarmente esterilizada tomando una muestra de la cepa previamente activada y se fijó la muestra al portaobjetos.

Posteriormente a tener la muestra fijada se le agrega el colorante cristal violeta durante 1 minuto donde este tiñe todas las bacterias, pasado el minuto se lava el exceso con agua. Una vez removido el exceso de colorante se agrega el Lugol durante un minuto el cual reacciona con el cristal violeta formando un complejo insoluble en agua.

Después que esta reacción se adiciona alcohol acetona que tiene como función remover el complejo que se formó de colorante donde a las bacterias Gram negativas por acción del alcohol acetona se les disuelve la membrana externa debido a que es un solvente lipídico y la capa delgada de peptidoglicano no es capaz de retener el complejo formado, por el contrario las bacterias Gram positivas por tener una capa gruesa de peptidoglicano logra contener el complejo colorante y permanecen de color violeta; luego de remover el exceso de alcohol acetona se adiciona fucsina como colorante contraste con el fin de que las bacterias Gram negativas tomen color y se puedan identificar al observar la muestra en el microscopio⁵³.

Finalmente, se observa en la **Imagen 6** la muestra en el microscopio.

Imagen 6. Coloración de Gram.



⁵³ UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL. Catedra De Biotecnología. Tinción y Observación De Microorganismos. [Electronic(1)]: 2009. p. 1-9.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS

Es necesario definir los medios cultivos por medio de una revisión bibliográfica con el fin de determinar si a través del medio cultivo la bacteria va crecer y realizar la ruta metabólica expuesta en **Figura 2**.

3.2.1 BHI. Su nombre se da por sus siglas en inglés (*Brain and Heart Infusion*). Este es un medio cultivo definido de la marca Merck, está hecho para cultivo de bacterias exigentes, normalmente utilizado para analizar como es el comportamiento de crecimiento de bacterias como, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Bacteroides fragilis*, *Haemophilus influenza*⁵⁴.

La composición de este medio cultivo se observa en el **Cuadro 9**.

Cuadro 9. Composición medio cultivo BHI.

Compuesto	Cantidad (g/L)
Digestión enzimática de tejidos animales	10
Infusión de cerebro de becerro deshidratado.	12,5
Infusión de corazón de vaca deshidratado.	5
Glucosa	2
NaCl	5
Na ₂ HPO ₄ , anhidro	2,5
pH a 25°C	7,4 ± 0,2

Fuente: MERCK. Ficha técnica medio de cultivo BHI.

3.2.2 Suero de leche. El suero de leche es un subproducto lácteo que se puede definir de diferente forma según de donde se obtuvo; si proviene de la leche después de la precipitación de la caseína se puede considerar como un líquido traslucido verde y si proviene de la separación de la cuajada en la elaboración de quesos se puede considerar como residuo líquido color amarillento⁵⁵.

La composición del suero puede variar dependiendo de las características del tipo de leche utilizada en la elaboración de queso, el tipo de queso y el proceso tecnológico empleado; existen 2 tipos de suero de leche más comunes, suero de leche dulce es el que se obtiene de la elaboración del queso mediante enzimas y

⁵⁴ MERCK. Ficha técnica medio de cultivo BHI.

⁵⁵ HERNANDEZ R., M. y VELEZ R., J. Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. En: Temas Selectos De Ingeniería De Alimentos. vol. 8, no. 2, p. 13-22.

suero de leche ácido es el que se obtiene mediante la precipitación ácida de la caseína y la composición de ambos tipos se puede ver en el **Cuadro 10**.

Cuadro 10. Composición de los sueros de leche.

Componente	Suero de leche dulce	Suero de leche ácido
Sólidos totales (g/L)	63,0 – 70,0	63,0 – 70,0
Lactosa (g/L)	46,0 – 52,0	44,0 – 46,0
Grasa (g/L)	0,0 – 5,0	0,0 – 5,0
Proteína (g/L)	6,0 – 10,0	6,0 – 8,0
Calcio (g/L)	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6
Fosforo (g/L)	0,4 – 0,7	0,5 – 0,8
Potasio (g/L)	1,4 - 1,6	1,4 – 1,6
Cloruros (g/L)	2,0 – 2,2	2,0 – 2,2
pH	4,4 – 4,6	4,4 – 4,6

Fuente: URRIBARRI, Lauris; VIELMA, Alex y et al. Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. En: FCV-LUZ. vol. 14, no. 4, p. 297-302.

El suero de leche es un sustrato complejo debido a que no se conoce la composición exacta de sus componentes, la posible composición se puede definir de la siguiente forma:

- Contiene cuatro proteínas principales β -Lactoglobulina (β -LG), α -lactoalbúmina (α -La) aproximadamente del 20 al 25% del total de las proteínas, albúmina de suero sanguíneo (BSA) e inmunoglobulina (Ig) aproximadamente del 10 al 15% del total de las proteínas y también contiene lactoferrina, transferrina y la fracción lactolín proteosa-peptona (pp).
- Porcentaje de Nitrógeno disponible: El suero de leche contiene aproximadamente 0,2 % de nitrógeno disponible.
- Porcentaje de Azufre disponible: Las proteínas del suero tienen aminoácidos que contienen azufre (cisteína, metionina).
- Porcentaje de Iones (Ca, K, Fe, Mg) disponible: Es aproximadamente 8 a 10%.
- Calcio (0,4 – 0,6 g/l en suero de leche dulce y 1,2 – 1,6 g/l en lactosuero ácido), potasio, fosforo, sodio y magnesio.
- Vitaminas disponibles: tiamina 0,38 mg/ml; riboflavina 1,2 mg/ml; ácido nicotínico 0,85 mg/ml; ácido pantoténico 3,4mg/ml; piridoxina 0,42mg/ml; cobalamina 0,03mg/ml; ácido ascórbico 2,2mg/ml⁵⁶.

⁵⁶ POVEDA, Elpidia. Whey, generalities and potential use as source of calcium from high bioavailability. En: Rev. Chil. Nutr. vol. 40, no. 4, p. 397-403.

3.3 DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO

Para la determinación de la temperatura de crecimiento fue necesario realizar un experimento donde se pueda comparar el comportamiento de la bacteria con respecto a su crecimiento variando solo la temperatura, para este se realizaron 3 siembras por estrías⁵⁷ donde se esparce la cepa en agar sangre, se llevaron a incubar durante 24 horas a 35°C, 37°C y 39°C respectivamente, estas temperaturas fueron escogidas debido a que la cepa bacteriana que se utiliza en el proyecto es una bacteria mesófila la cual tiene su rango óptimo de temperatura entre 35°C y 45°C, pasada las 24 horas se realizó un recuento en placa para determinar las UFC presentes en cada una de estas siembras obteniendo los resultados de la **Tabla 3**.

Tabla 3. UFC en diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	UFC/mL	Log (UFC/mL)
35	4,20E+07	7,6232
37	3,10E+08	8,4914
39	1,20E+07	7,0792

3.4 FERMENTACIÓN MICROBIANA

Con la caracterización del microorganismo y los sustratos que se emplearon, se procedió a realizar la fermentación, primero se profundizó sobre las condiciones de operación que se utilizaban para la fermentación de ácido hialurónico utilizando la cepa *Streptococcus zooepidemicus* y se garantizaron estos parámetros, a continuación, se expondrán los pasos claves para desarrollar la producción de este metabolito.

3.4.1 Condiciones de operación. Lo primero que se realizó fue adecuar una incubadora donde se evitará la transferencia de calor hacia el exterior, es decir, un sistema adiabático, esto con el fin de garantizar que la temperatura se mantuviera constante durante el tiempo de la fermentación, esta se regulaba mediante un circuito eléctrico variando el voltaje para obtener la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo. Se utilizó un termómetro para medir la temperatura del sistema durante el proceso.

Este parámetro se encuentra entre las condiciones de operación que se deben tener en cuenta, la cual es diferente para cada microorganismo que se utiliza, en

⁵⁷ UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL. Catedra De Biotecnología. Tinción y Observación De Microorganismos. [Electronic(1)]: 2009. p. 1-9.

este caso *Streptococcus pyogenes* se mantendrá la temperatura a 37°C, a la cual su velocidad de crecimiento es la mayor comparada con otras temperaturas; se garantizó este parámetro en toda la incubadora como se explicó anteriormente utilizando un sistema que aislara el calor de todo el sistema y evitara su salida al exterior.

Como segunda condición de operación se estableció el pH del caldo de fermentación, dentro de un rango que estuviera cerca de las condiciones de neutralidad entre 6 y 8. La siguiente condición fue la agitación, esta se ajustó utilizando un agitador a 150 rpm, siendo este constante durante todo el tiempo de fermentación.

En muchas investigaciones donde se utilizaba *Streptococcus zooepidemicus* se tenía un tiempo de fermentación de 12 a 24 horas, debido a que esta cepa crece más lento se estipuló un tiempo de producción de 32 horas. Por último, se estableció el volumen a fermentar de sustrato, este fue de 500 mL con un inóculo del 10% v/v.

3.4.2 Preparación del inóculo. Teniendo fijo ya el volumen de fermentación y la concentración de inóculo inicial, 24 horas antes de la fermentación se prepararon 50 mL de este, se tomó una cantidad pequeña de cepa *Streptococcus pyogenes* con un asa metálica, previamente activada y cultivada en un medio nutritivo para su crecimiento, esta se adicionó a un medio de cultivo BHI para su crecimiento en la fase de latencia, y se incubó a 37°C por 24 horas.

Para ambas fermentaciones se adaptó la bacteria a este medio para garantizar una concentración inicial de fermentación de 10^7 a 10^8 células/mL, utilizando el patrón 0,5 de McFarland. Los patrones de McFarland se utilizan para la preparación de inóculos, estos se preparan adicionando ácido sulfúrico en una solución de cloruro de bario, para generar un precipitado de sulfato de bario, el cual forme una solución turbia, realizando los patrones y midiendo su turbidez, se comparó el inóculo después de las 24 horas con el patrón estándar 0,5 de McFarland el cual equivale a $1,5 \times 10^8$ células de *Escherichia coli*/mL⁵⁸.

3.4.3 Fermentación. La fermentación se inició con la adecuación de la incubadora en un lugar aséptico, con condiciones estériles, se utilizó un schott de 1 L con 500 mL de sustrato, previamente autoclavado a 120°C por 2 horas. Se climatizó el sustrato y el inóculo hasta la temperatura de fermentación (37°C) antes de mezclarlos.

⁵⁸ BD. Patrón de turbidez BBL preparado. [Print(0)]. [Consultado el Mayo/152016]. Disponible en: [http://bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421\(0205\)_es.pdf](http://bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421(0205)_es.pdf).

Una vez ambos estuvieran a 37°C se añadieron 50 mL de inóculo a los 500 mL de sustrato y se empezó la fermentación durante 32 horas, con un sistema de agitación a 150 rpm asegurando el frasco para evitar posibles derrames o problemas. Al iniciar el proceso se tomaron muestras de 5 a 15 mL de caldo de fermentación para su posterior análisis, estas se tomaban cada 4 horas iniciando en el momento que se mezcla el inóculo con el medio cultivo, obteniendo 9 muestras por fermentación; en total 18. Las muestras eran tomadas de manera adecuada para evitar contaminación con el exterior para una posible alteración del proceso.

3.5. MÉTODO DE RECUENTO EN PLACA

Para el método de recuento en placa se sembraron las 9 muestras de cada fermentación en cajas de Petri con solución agar – agar BHI, este método se considera directo ya que se pueden ver los microorganismos directamente, en este caso unidades formadoras de colonia (UFC).

3.5.1 Diluciones. Si se realizan las siembras directamente de la muestra puede que el resultado después de la incubación muestre tantas UFC hasta el punto que sea imposible contarlas, es por eso que se deben realizar diluciones seriadas, para garantizar un número de colonias entre 30 y 300, y luego llevar a su valor real. Para realizar estas diluciones se utilizó 1 mL de cada muestra y se añadió a 9 mL de solución salina al 0,85% p/v, para obtener una dilución 10^{-1} , posteriormente se tomó 1 mL de esta solución y se llevó de nuevo a 9 mL de solución salina para obtener la dilución 10^{-2} , y así sucesivamente hasta tener las diluciones seriadas propuestas para cada muestra, estas diluciones se realizaron en condiciones asépticas para evitar posible contaminación de las muestras.

3.5.2 Siembra. Teniendo ya las diluciones seriadas para cada muestra, se eligieron las diluciones a sembrar de cada muestra, teniendo en cuenta que a las primeras horas del proceso la cantidad de microorganismo es menor con respecto a la mitad o al fin del proceso, en este caso se sembraron respectivamente diluciones más concentradas y luego diluciones menos concentradas.

Para el proceso de siembra, nuevamente se garantizaron condiciones asépticas, y se tomó 0,1 mL de cada dilución a sembrar, se añadió esta cantidad a cada caja de Petri; para cada muestra se tomaron las diluciones a sembrar y se agregaron de más a menos concentrada, y se homogenizó en sentido contrario utilizando rastrillos estériles para cada muestra. Terminado esto se llevaron todas las cajas a incubación a 37°C por 24 horas para el posterior conteo.

Las siembras de las muestras de la fermentación con sustrato BHI, se hicieron por duplicado para comparar aproximadamente la cantidad de UFC/mL y contar las que se vieran con mayor facilidad; para la fermentación con suero de leche se escogieron menos siembras tomando como base los resultados obtenidos en la primera fermentación.

3.5.3 Obtención de datos. 24 horas después de la siembra se hizo el conteo respectivo para las fermentaciones con BHI y suero de leche, se obtuvieron las cantidades de UFC/mL para las muestras que se realizó el conteo y se utilizó la **Ecuación 15** para calcular los valores reales de UFC/mL; los valores obtenidos para ambas fermentaciones se observan en la **Tabla 4** y la **Tabla 5** respectivamente, para hacer los análisis respectivos se tomaran los logaritmos en base 10 de las concentraciones de biomasa obtenidas.

Tabla 4. Crecimiento microbiano para fermentación de BHI.

Tiempo (h)	n (UFC/mL)	Log (n)
0	5,90E+07	7,7709
4	4,20E+09	9,6232
8	7,70E+09	9,8865
12	5,60E+10	10,7482
16	1,30E+11	11,1139
20	2,60E+11	11,4150
24	3,90E+12	12,5911
28	2,40E+12	12,3802
32	2,40E+11	11,3802

Tabla 5. Crecimiento microbiano para fermentación de suero de leche.

Tiempo (h)	n (UFC/mL)	Log (n)
0	2,20E+08	8,3424
4	1,30E+09	9,1139
8	2,30E+09	9,3617
12	7,00E+09	9,8451
16	3,00E+10	10,4771
20	1,00E+10	10,0000
24	2,00E+09	9,3010
28	3,00E+09	9,4771
32	1,00E+10	10,0000

3.6 MÉTODO COLORIMETRICO DNS

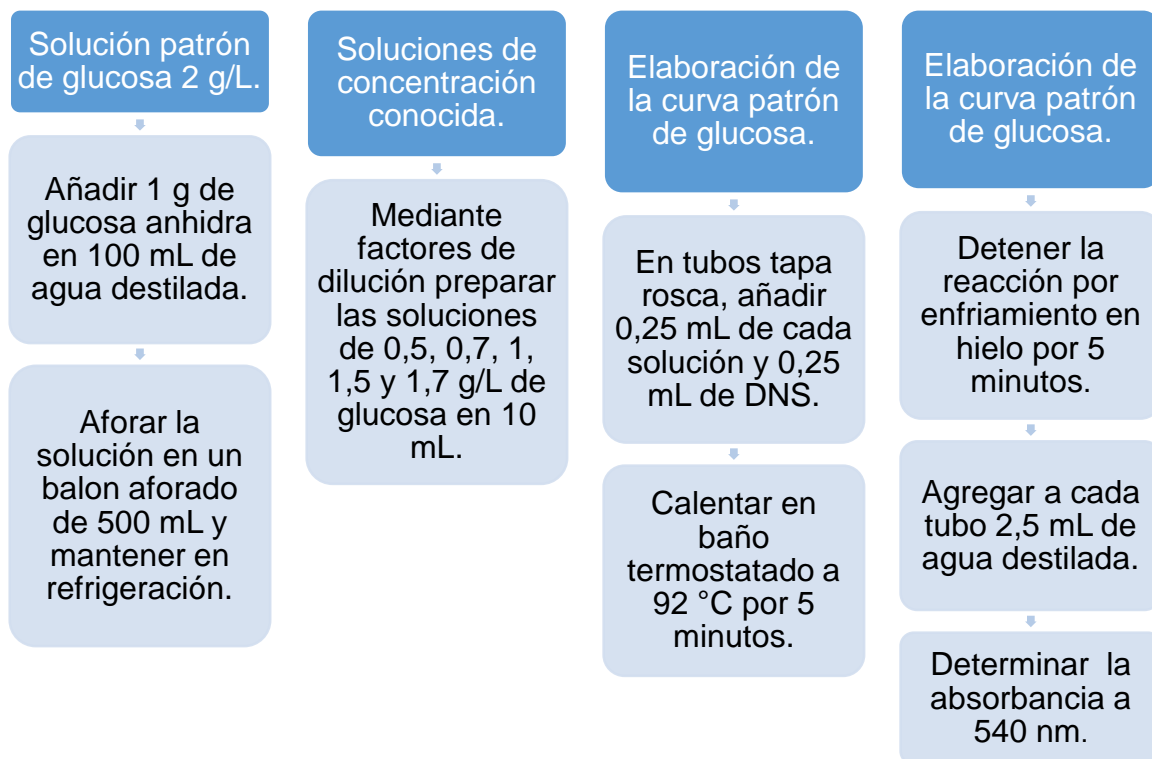
La prueba colorimétrica DNS se realizó en 3 etapas: preparación de reactivo DNS, preparación de curva de calibración y determinación de concentración de muestras; estos pasos se realizaron siguiendo los protocolos propuestos en el manual de laboratorio de procesos biotecnológicos de la Pontificia Universidad Javeriana.

El primer paso que se realizó fue la preparación del reactivo DNS y se llevó a cabo a través del siguiente protocolo:

- En un vaso de precipitado con 50 mL de agua destilada, se añadió 1,6 g de hidróxido de sodio y se disolvió con agitación magnética a temperatura ambiente.
- Se adiciono 43,8 g de tartrato de sodio y potasio, lentamente hasta disolver por completo la solución.
- Se agregó lentamente 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y se protegió el reactivo de la luz, tapando los recipientes con papel aluminio.
- Luego se aforó la solución hasta 100 mL con agua destilada en un balón aforado de 100 mL y se dejó en agitación por 12 horas en un frasco ámbar.

Después de preparar el reactivo se procede a preparar la curva de calibración siguiendo el protocolo descrito en el **Diagrama 1**.

Diagrama 1. Preparación de la curva de calibración.



La preparación de la curva se realizó mediante estas condiciones para garantizar que la reacción de reducción ocurriera, está siempre ocurre a la temperatura de ebullición del agua, siempre protegiendo los tubos de la luz para evitar la alteración del reactivo DNS.

La curva de calibración se hizo a partir de una solución de glucosa 2 g/L, bajo el fundamento de la reacción que ocurre entre el DNS y los azúcares reductores presentes en la glucosa, a partir de la solución de glucosa preparada se realizaron las diluciones con las cantidades expuestas en la **Tabla 6** y se prepararon las muestras de acuerdo a la metodología expuesta en el

Cuadro 11, después del proceso de calentamiento y enfriamiento es donde se agregó la cantidad final de agua destilada que se muestra.

Tabla 6. Preparación de soluciones de glucosa.

Concentración de glucosa (g/L)	Volumen de solución patrón de glucosa 2 g/L (mL)	Volumen de agua destilada (mL)
0,0 (Blanco analítico)	0,0	10,0
0,5	2,5	7,5
0,7	3,5	6,5
1,0	5,0	5,0
1,5	7,5	2,5
1,7	8,5	1,5
2,0	10,0	0,0

Cuadro 11. Metodología para elaborar curva patrón de glucosa.

Reactivo	Blanco	Concentración (g/L)					
		0,5	0,7	1,0	1,5	1,7	2,0
Glucosa (mL)	-	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agua (mL)	0,25	-	-	-	-	-	-
Reactivo DNS (mL)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Agua destilada (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Una vez las muestras estuvieron listas se procede a pasarlas por el espectrofotómetro previamente preparadas como se describe en el **Diagrama 1** y se determina la absorbancia de las diluciones obteniendo los resultados expuestos en la **Tabla 7**, a la primera medición la absorbancia de la muestra de 2 g/L de

glucosa arrojo un dato mayor a 1, por lo cual se realizaron diluciones 1:10 para determinar las absorbancias y así generar la curva de calibración.

Tabla 7. Resultados curva de calibración.

Concentración de glucosa (g/L)	Absorbancia
0	0
0,5	0,034
0,7	0,042
1	0,055
1,5	0,076
1,7	0,091
2	0,117

Una vez obtenida la curva patrón de glucosa se procede a realizar la prueba para las muestras tomadas de las fermentaciones a través del protocolo descrito en el **Diagrama 2** obteniendo como resultado las absorbancias de las muestras de la fermentación con BHI y la fermentación con suero de leche expuestas en la **Tabla 8** y la **Tabla 9**, respectivamente.

Diagrama 2. Determinación de la concentración de las muestras.

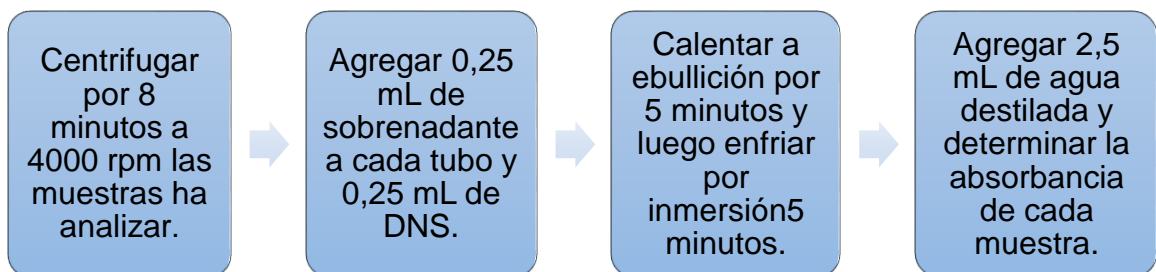


Tabla 8. Absorbancias para muestras con BHI.

Tiempo (h)	Absorbancia
0	0,276
4	0,230
8	0,198
12	0,182
16	0,170
20	0,152
24	0,133
28	0,127
32	0,144

Tabla 9. Absorbancias para muestras con suero de leche.

Tiempo (h)	Absorbancia
0	0,377
4	0,349
8	0,337
12	0,319
16	0,298
20	0,292
24	0,301
28	0,312
32	0,325

La centrifugación se realizó con el objetivo de remover los sólidos en suspensión y las células que aun estuvieran en las muestras.

3.7 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO POR HPLC

Para poder realizar la prueba de cuantificación de ácido hialurónico por HPLC es necesario realizarle un pretratamiento a las muestras por medio de 2 protocolos descritos en el **Diagrama 3** y **Diagrama 4**, es necesario tener en cuenta ambos protocolos debido a que no se sabe con precisión el peso molecular del ácido hialurónico producido, al utilizar un determinado protocolo la muestra se puede ver afectada y se pierde la naturaleza de la misma, así mismo las muestras pretratadas de diferente forma sirven como replicas para corroborar los resultados obtenidos en las cromatografías.

Básicamente ambos protocolos tratan las muestras con un bactericida y luego un surfactante o un reactivo que logre la separación del ácido hialurónico de las capsulas bacterianas.

La adición de etanol al 70% v/v se hace con el fin de matar las bacterias y evitar que continúen creciendo y produciendo más metabolito primario que puedan llegar a afectar las muestras, en ambos protocolos se adiciona un surfactante sulfato dodecil sódico al 5% p/v y cloruro de sodio respectivamente en cada muestra para separar el ácido hialurónico de las células, la gran diferencia de los protocolos se encuentra en la centrifugación de las muestras la cual se realiza con el fin de retirar sólidos en suspensión que puedan llegar a presentarse como picos en la muestra afectando los resultados y la microfiltración se realiza con el fin de retener las bacterias muertas y evitar que el peptidoglicano presente en la membrana celular sea detectado por el equipo.

Diagrama 3. Pretratamiento no. 1 de las muestras para HPLC.

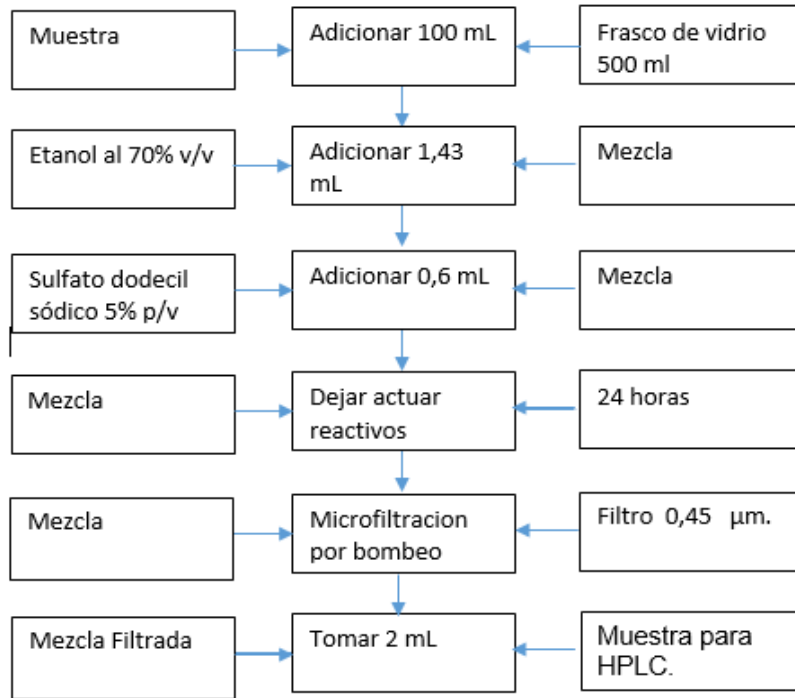
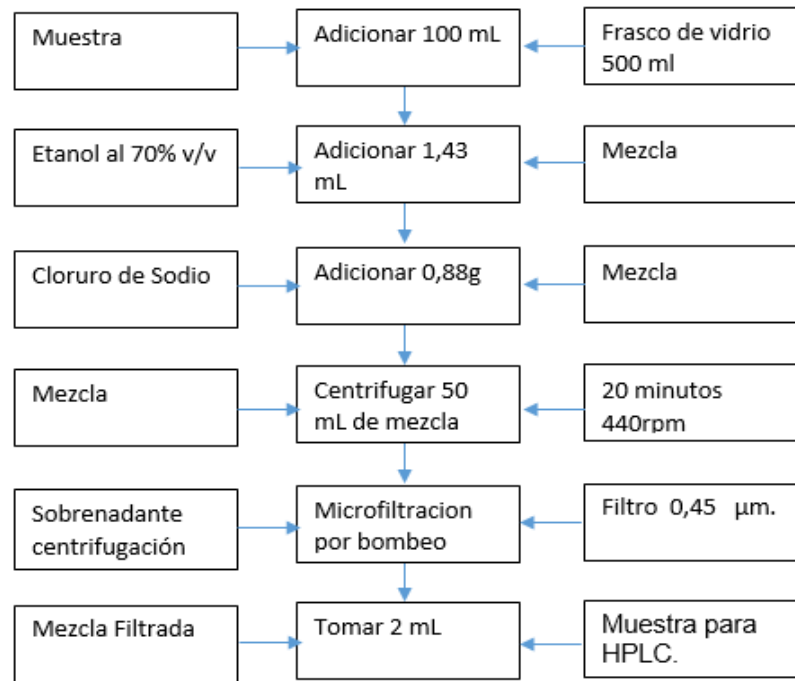


Diagrama 4. Pretratamiento no. 2 de las muestras para HPLC.



Las muestras pretratadas son llevadas posteriormente al análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento donde se utiliza una columna *Ultrahydrogel Linear* de 7,8 mm x 300 mm, con un tamaño de partícula de 10 μm y *Ultrahydrogel guard column* de 6 mm x 40 mm, con un tamaño de partícula de 6 μm , esta columna es la indicada para detectar la presencia de ácido hialurónico⁵⁹.

El detector usado es por índice de refracción; la columna opera a temperatura ambiente con un volumen de inyección de 20 μL ⁶⁰, se utilizó un patrón de ácido hialurónico con peso molecular de 1,5 a 1,8 MDa.

⁵⁹ WATERS. Gel permeation chromatography (GPC) columns and consumables. p. 309-326.

⁶⁰ WATERS. Care and use manual. Ultrahydrogel columns. [Electronic(1)]. [Consultado el Mayo/242016]. Disponible en: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/wat011556.pdf>.

4. ANALISIS DE RESULTADOS

En este capítulo se analizarán los resultados obtenidos en el capítulo anterior, interpretando el crecimiento del microorganismo, sus propiedades, las condiciones de operación de la fermentación, el consumo de sustrato y la producción de ácido hialurónico.

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO

Mediante la coloración de Gram, la cepa *Streptococcus pyogenes* resultó siendo una bacteria gram positiva lo cual concuerda con lo profundizado sobre sus propiedades, esta bacteria al ser Gram positiva se caracteriza por la composición de su pared celular la cual es diferente a la que posee una bacteria Gram negativa.

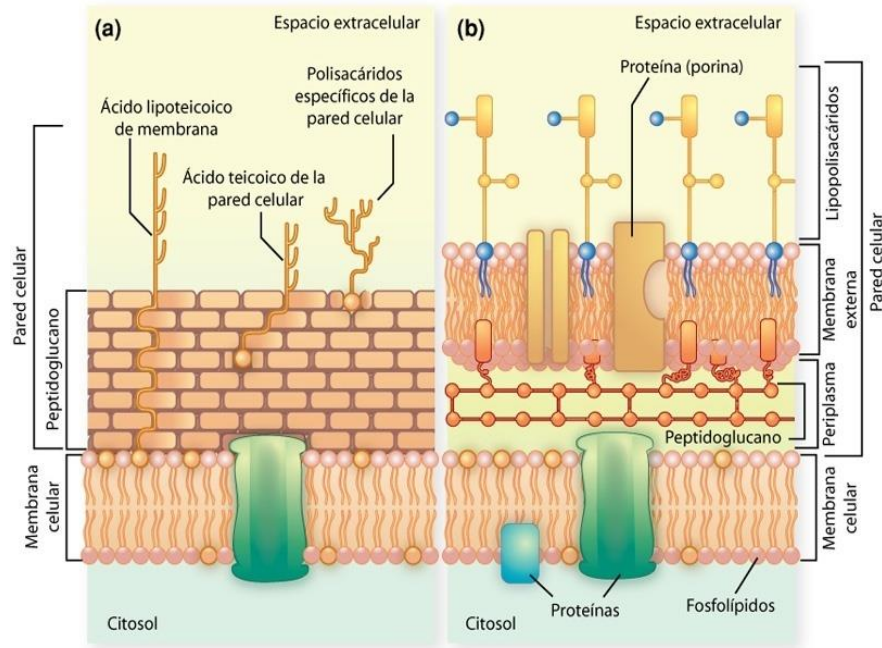
Las bacterias Gram positivas se caracterizan por tener una pared compuesta de peptidoglicano, esta estructura también llamada tetrapéptido del glicano está formada por 2 derivados de carbohidratos, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, estos se unen entre sí por puentes peptídicos para formar este compuesto el cual representa hasta el 90% de la pared celular en estas bacterias, mientras que en las bacterias Gram negativas solo cubre un 10% de todos los componentes que conforman la pared celular. Se pueden encontrar bacterias con una sola capa de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram positivas pueden tener hasta 25 capas en algunos casos. La diferencia entre ambas bacterias se representa mediante la **Figura 13**, donde a y b son respectivamente las paredes de una bacteria Gram positiva y Gram negativa.

La pared celular de las bacterias Gram positivas también se caracteriza por tener polisacáridos ácidos que atraviesan o están incrustados en la pared celular, estos se denominan ácidos lipoteicoicos y ácidos teicoicos, donde los primeros se diferencian por atravesar la pared hasta la membrana citoplasmática y estar unidos a los fosfolípidos de esta.

Al hacer la tinción de Gram, el colorante cristal violeta se adhiere a la gruesa capa de peptidoglicano presente en la bacteria, esto se debe a que este colorante el cual es usado frecuentemente para este método está cargado positivamente y se enlaza fuertemente con cargas negativas presentes en las bacterias Gram positivas, estas cargas son generadas por los ácidos teicoicos y lipoteicoicos presentes en la pared celular. Al adicionar la solución de Lugol esta reacciona con el cristal de violeta presente en la pared celular para romper las fuerzas formadas anteriormente, junto con el alcohol este colorante sale de la célula; al tener demasiado peptidoglicano esta pared sigue sin decolorarse, si fuera una bacteria

Gram negativa esta se decolora. Por último, al agregar el colorante de contraste este no puede penetrar en la pared de bacterias Gram positivas debido a que esta ya tiene sus componentes de pared enlazados fuertemente al colorante cristal violeta.

Figura 13. Comparación bacterias Gram positivas y Gram negativas.



Fuente: Disponible en internet < <https://biotechmind.wordpress.com/tag/gram-positivo/>>

4.2 CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS

Para entender cómo se formula un medio de cultivo es obligatorio tener en cuenta las necesidades nutricionales que necesitan los microorganismos, unos nutrientes son necesarios en una mayor cantidad y son llamados macronutrientes y son utilizados para que los microorganismos puedan realizar las rutas metabólicas; los otros son llamados micronutrientes son necesarios en una cantidad menor y cumplen funciones específicas; los macronutrientes se encuentran en el **Cuadro 12** y los micronutrientes son se encuentran en el **Cuadro 13**. Algunos micronutrientes en especial no son necesarios para el crecimiento de algunas bacterias, en ciertas palabras no son tan indispensables.

Cuadro 12. Macronutrientes.

Elemento	Forma del nutriente en el ambiente	Forma suministrada en el medio cultivo
Carbono (C)	CO ₂ , Compuestos orgánicos.	Glucosa, malato, acetato, piruvato, aminoácidos, cientos de otros compuestos o mezclas complejas (extracto de levadura, peptona, etc.).
Hidrogeno (H)	H ₂ O, Compuestos orgánicos.	H ₂ O, Compuestos orgánicos
Oxígeno (O)	H ₂ O, O ₂ , Compuestos orgánicos	H ₂ O, O ₂ , Compuestos orgánicos.
Nitrógeno (N)	NH ₃ , NO ₃ , N ₂ , Compuestos orgánicos nitrogenados.	Inorgánico: NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃ , N ₂ Orgánicas: aminoácidos, bases nitrogenadas de nucleótidos, muchos otros compuestos orgánicos con N.
Fosforo (P)	PO ₄ ³⁻	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ PO ₄
Azufre (S)	H ₃ S, SO ₄ ²⁻ , Compuestos orgánicos con S, sulfuros metálicos (FeS, CuS, ZnS, NiS, etc)	Na ₂ SO ₄ , Na ₂ S ₂ O ₃ , Na ₂ S, Cisteína u otros compuestos orgánicos azufrados.
Potasio (K)	K ⁺ en solución o como varias sales con K	KCl, KH ₂ PO ₄ .
Magnesio (Mg)	Mg ²⁺ , en solución o como varias sales con Mg	MgCl ₂ , MgSO ₄ .
Sodio (Na)	Na en solución, NaCl o como otras sales con Na	NaCl.
Calcio (Ca)	Ca ²⁺ en solución, CaSO ₄ o como otras sales con Ca	CaCl ₂ .
Hierro (Fe)	Fe ²⁺ o Fe ³⁺ en solución, FeS ₂ , Fe(OH) ₃ , o como otras sales con Fe	FeCl ₃ , FeSO ₄ , Varias soluciones de hierro quelado (Fe ³⁺ EDTA, Fe ³⁺ citrato, etc).

Fuente: MADIGAN, Michael y PARKER, Jack. Brock, Microbiología De Los Microorganismos. Barcelona: Pearson, 2008. p. 108984 - 205 - 3679 – 2.

Cuadro 13. Micronutrientes.

Elemento	Función celular
Cromo (Cr)	Requerido por los mamíferos para el metabolismo de la glucosa; se desconoce si los microorganismos lo requieren.
Cobalto (Co)	Vitamina B ₁₂ ; transcarboxilasa (bacterias del ácido propanoico).
Cobre (Cu)	En la respiración, citocromo c oxidasa; en fotosíntesis, plastocianina y en algunas superóxido dismutasas.
Manganeso (Mn)	Activador de muchas enzimas; presente en algunas superóxido dismutasas y en la enzima que rompe el agua en fotótrofos oxigenicos.
Molibdeno (Mo)	Algunas enzimas que contienen flavinas; nitrogenasa, nitrato reductasa, sulfito oxidasa, DMSO-TMAO reductasas y algunas formatodeshidrogenasas.
Níquel (Ni)	La mayoría de las hidrogenasas; coenzima F de metanogenos, deshidrogenasa del monozido de carbono y ureasa.
Selenio (Se)	Formato deshidrogenasa; algunas hidrogenasas y el aminoácido selencisteina.
Tungsteno (W)	Algunas formatodeshidrogenasas y oxotransferasas de los hipertermofilos.
Vanadio (V)	Vanadio nitrogenasa; bromoperoxidasa.
Zinc (Zn)	Anhidrasa carbonica, alcohol deshidrogenasa, RNA y DNA polimerasas, y muchas proteínas que se unen al DNA.
Hierro (Fe) ⁺	Citrocromos, catalasas, peroxidasas, proteínas con hierro y azufre, oxigenasas y todas las nitrogenasas.

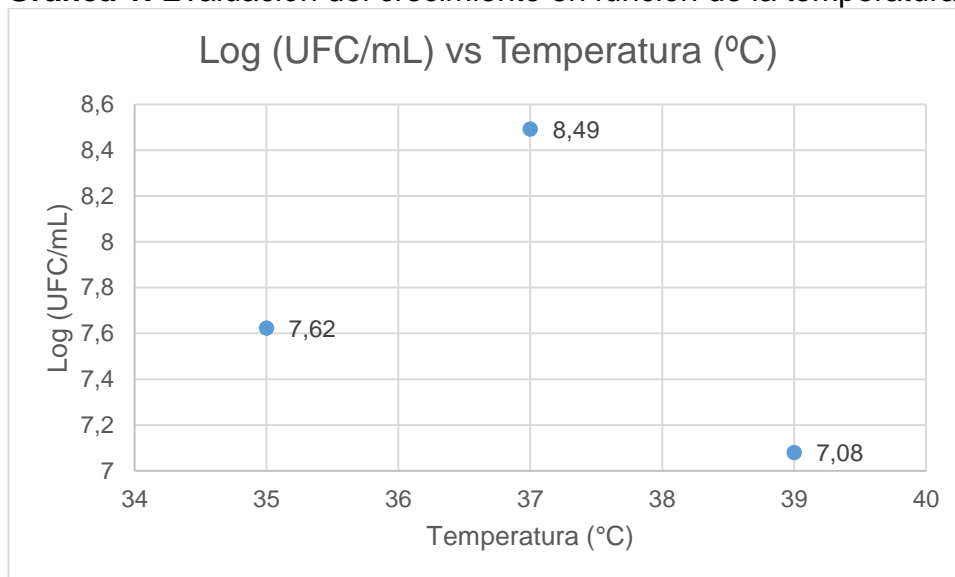
Fuente: MADIGAN, Michael y PARKER, Jack. Brock, Microbiología De Los Microorganismos. Barcelona: Pearson, 2008. p. 108984 - 205 - 3679 – 2.

Teniendo en cuenta los nutrientes previamente expuestos y considerando la descripción realizada de los sustratos en el capítulo 3 se considera que los sustratos empleados son adecuados para el crecimiento de la bacteria porque contienen todos los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo metabólico, en el caso del BHI es un sustrato diseñado específicamente para este tipo de bacterias por lo que es claro que contiene todos los macro y micronutrientes requeridos por la bacteria, debido a su rica composición en nutrientes que proviene de la infusión de cerebro y corazón, en el caso del suero de leche contiene los macronutrientes y micronutrientes de la siguiente forma: el carbono está presente en lactosa, el hidrogeno y oxigeno está presente en agua, nitrógeno y azufre presente en las proteínas, el fosforo, magnesio, calcio, hierro y potasio están presentes como iones, los micronutrientes se encuentran en forma de vitaminas y como iones libres cabe recordar que no es necesario la presencia de todos los micronutrientes para el crecimiento de la bacteria.

4.3 DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA TEMPERATURA

A partir de la **Tabla 3**, se obtiene la **Gráfica 1** donde se observa claramente que es a los 37°C donde se presenta la mayor cantidad de unidades formadoras de colonias, esta temperatura se encuentra entre los valores medios del rango óptimo de temperatura de la bacteria y se explica debido a que por ser una bacteria que normalmente crece en seres vivos donde la temperatura promedio se encuentra alrededor de los 37°C.

Gráfica 1. Evaluación del crecimiento en función de la temperatura.



4.4 FERMENTACIÓN

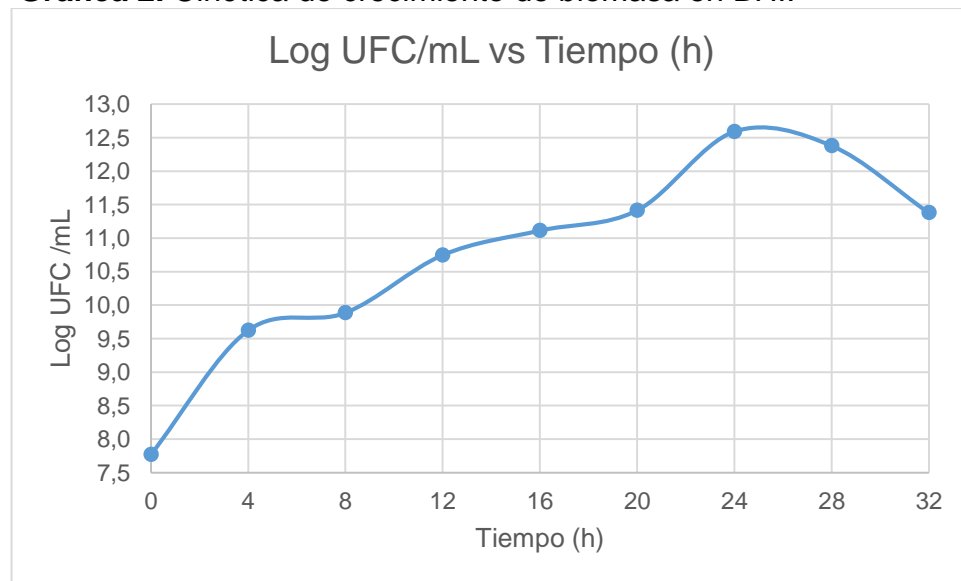
Al observar los resultados de las diversas pruebas que se realizaron durante todo el proyecto se puede decir que las fermentaciones se llevaron a cabo de una manera adecuada, debido a que en estos se evidencia que los tiempos de fermentación se escogieron adecuadamente observándose varias fases de la cinética microbiana esto también indica que la temperatura y la agitación fueron las correctas; en el conteo de UFC/mL se evidencia que la fermentación no se contaminó con algún otro microorganismo que hubiera podido afectar el resultado de la misma consumando que la fermentación se llevó a cabo en buenas condiciones asépticas.

4.5 CINETICA MICROBIANA

Después de hacer el método de recuento en placa por superficie para ambas fermentaciones se obtuvieron los resultados expuestos en el anterior capítulo; ambas cinéticas de crecimiento empiezan desde la fase exponencial, esto se debe a que 24 horas antes de la fermentación se preparó un inóculo para iniciar la fase de latencia y evitar contratiempos en el proceso fermentativo, y garantizar que la bacteria si creciera en los sustratos propuestos.

Representando los datos obtenidos en la **Tabla 4**, la cual representa los conteos realizados para las muestras de la fermentación con BHI, se obtiene la **Gráfica 2**. Donde se observa como es el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* en este sustrato en función del tiempo, se logra diferenciar cuando inicia y termina la fase exponencial, la cual tarda 24 horas aproximadamente para este caldo de fermentación; por otro lado la fase estacionaria debería comenzar a las 24 horas terminada la fase exponencial, debido a que el método utilizado para el recuento de microorganismos se basa en aproximaciones, a pesar de ser el más utilizado⁶¹, los datos que se recolectan para las concentraciones de biomasa se acercan mucho al comportamiento de crecimiento de esta bacteria, pero no expresan el comportamiento esperado para esta fase, por último la fase de muerte se logra distinguir pasadas las 24 horas de fermentación.

Gráfica 2. Cinética de crecimiento de biomasa en BHI.

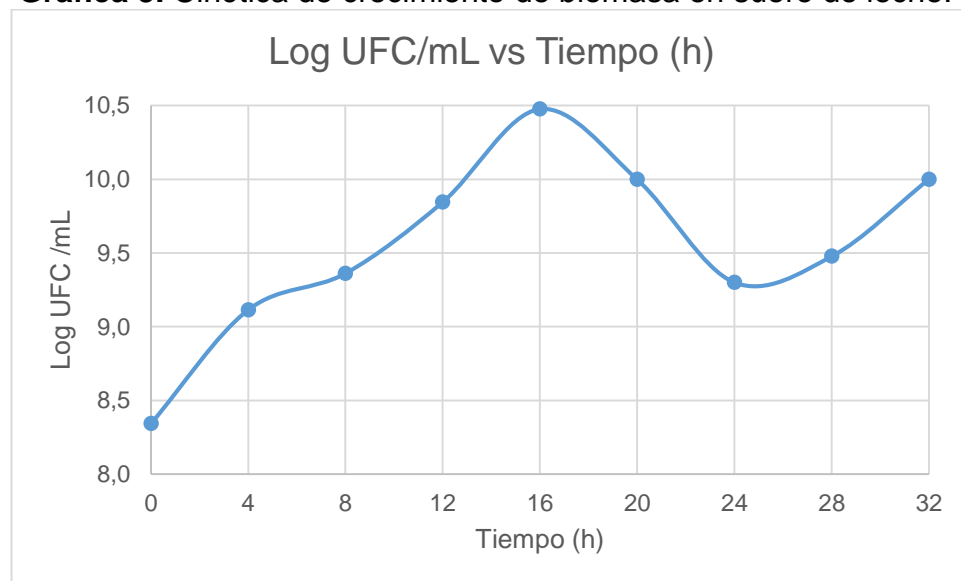


⁶¹ MADIGAN, Michael y PARKER, Jack. Brock, Microbiología De Los Microorganismos. Barcelona: Pearson, 2008. p. 108984 - 205 - 3679 - 2.

De igual forma se obtiene la **Gráfica 3**, representando los datos obtenidos en las muestras de fermentación con suero de leche que se expresaron en la **Tabla 5**. Para esta fermentación la fase exponencial dura 16 horas, como anteriormente se explicó las aproximaciones de este método no se logra diferenciar una fase estacionaria, por otro lado, después de las 16 hasta las 24 horas se evidencia una pequeña fase de muerte, pero el microorganismo desde las 24 hasta las 32 horas vuelve a crecer, en este punto se puede analizar una posible fase de diauxia.

Esta bacteria al ser un microorganismo mesófilo a parte de tener como característica principal un rango de temperaturas de crecimiento muy cercano a las temperaturas de personas y animales, se puede determinar el tiempo que puede demorarse en crecer, esta variable para estas bacterias se encuentra entre 24 a 48 horas, lo cual indica que el comportamiento de la biomasa si puede tener una fase diaúxica, esto se debe a que el sustrato empleado para esta fermentación es un sustrato complejo, donde no se conocen la composición exacta de sus componentes nutritivos principales, esta fase de diauxia se puede presentar porque un nutriente se acaba primero que otro y luego se empieza a consumir otro nutriente diferente, esto suele suceder cuando se utilizan sustratos complejos⁶².

Gráfica 3. Cinética de crecimiento de biomasa en suero de leche.

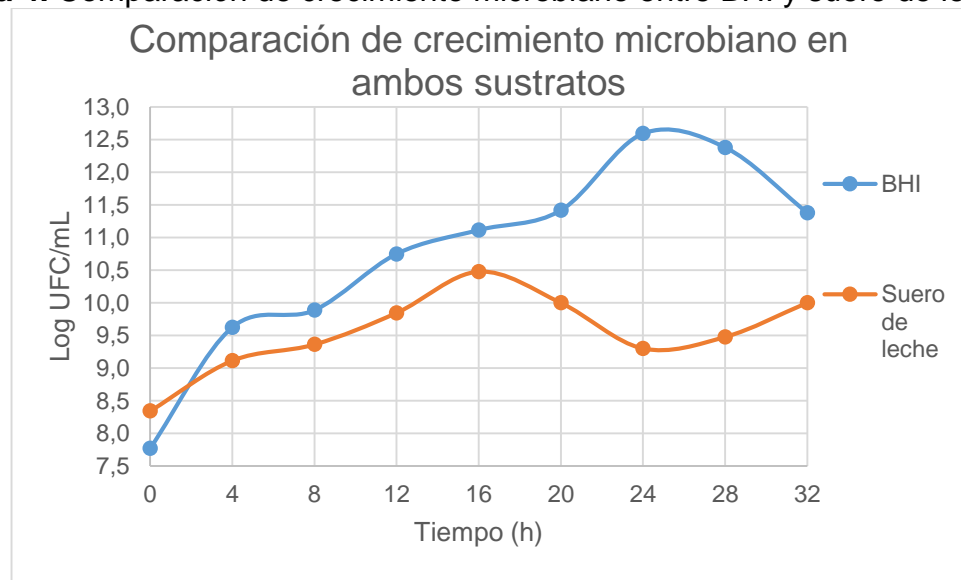


Comparando ambas cinéticas de crecimiento podemos observar que las fases exponenciales están entre las 16 a 24 horas, la representación de estas 2 curvas

⁶² PRESCOTT, Lansing y HARLEY, John. Microbiology. 6 ed. Colorado: McGraw Hill, 2005. p. 11300072951753

se observa en la **Gráfica 4**. No obstante, podemos determinar que el sustrato BHI produce más biomasa que el sustrato suero de leche, respectivamente se observa que la diferencia entre la biomasa producida entre ambos sustratos no varía hasta la fase exponencial del suero de leche (16 horas), como se explicó anteriormente, un nutriente que se ha agotado en este último sustrato complejo puede frenar el crecimiento del microorganismo; después de las 16 horas se observa que *Streptococcus pyogenes* sigue creciendo de manera exponencial en la primera fermentación donde se utilizó BHI; el BHI al ser un sustrato con alto contenido de proteínas y carbohidratos debido a su infusión de cerebro y corazón tiene un impacto positivo en la nutrición microbiana de esta bacteria, siendo el sustrato que favorece un mejor crecimiento de la biomasa.

Gráfica 4. Comparación de crecimiento microbiano entre BHI y suero de leche.



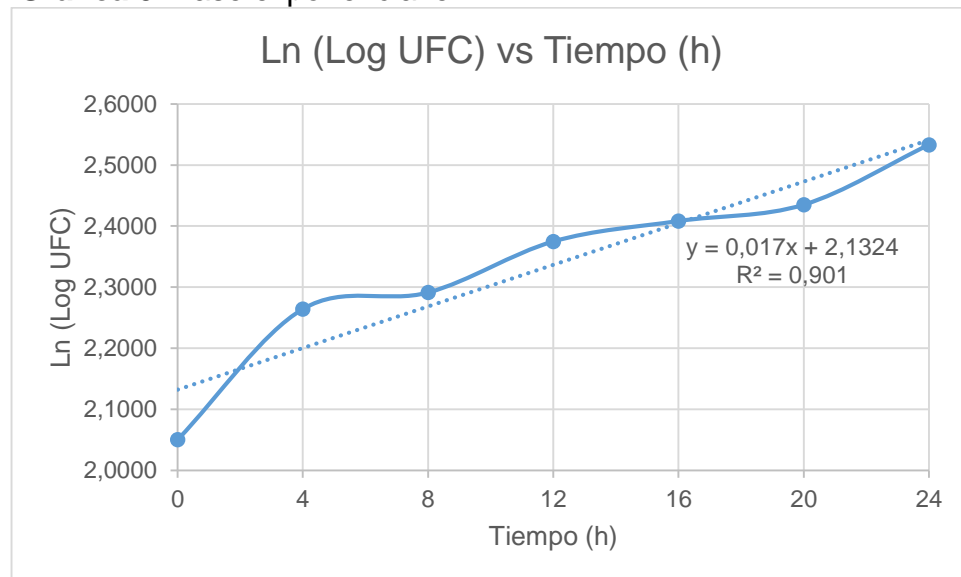
Estudiando las velocidades de formación de biomasa, se remite a la **Ecuación 2** y la **Ecuación 3**, donde se estudia la variable descrita anteriormente y la concentración de biomasa como una función del tiempo respectivamente. Los gráficos expuestos anteriormente representan como es el cambio de la concentración de biomasa con respecto al tiempo, para una limitación de la investigación solo se trabajaron los cálculos en la fase exponencial, debido a que el ácido hialurónico al ser un metabolito primario está asociado con el crecimiento del microorganismo⁶³ y cuando este deja de crecer automáticamente se deja de producir el ácido hialurónico. Eso no desprecia los análisis hechos para los resultados obtenidos después de esta fase exponencial.

⁶³ TORTORA, Gerard. Introducción a La Microbiología. 9 ed. Argentina: Medica panamericana, 2007. p. 963978 950 06 0740 7.

El comportamiento que refleja la concentración de biomasa con respecto al tiempo, está dado por una función exponencial que depende de 2 parámetros constantes, μ y X_0 . Para este caso el resultado que se obtiene de la **Ecuación 3**, al linealizar esta función con propiedades logarítmicas obtenemos una ecuación de la recta donde la pendiente va ser igual a μ en h^{-1} y el intercepto va ser $\ln X_0$.

Como se puede observar la linealización en la **Gráfica 5** se obtuvo un R^2 de 0,901, si se quiere más precisión se podrían descartar datos debido a la aproximación del método utilizado, pero al hacerlo se puede observar un comportamiento muy cercano al de una línea recta, donde su pendiente es 0,017; este valor es igual a μ y el intercepto es 2,1324 igual a $\ln X_0$.

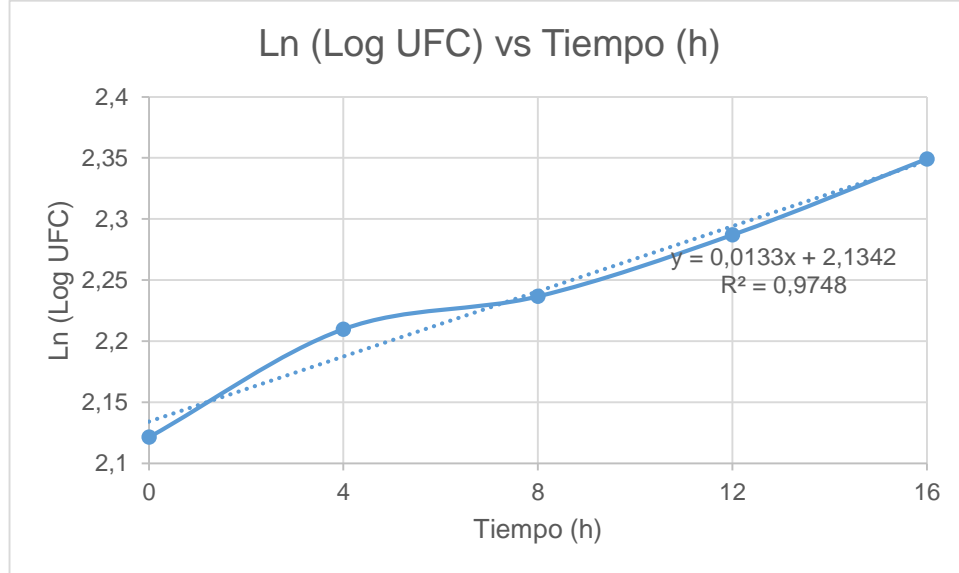
Gráfica 5. Fase exponencial en BHI.



El mismo análisis se realizó para la fermentación hecha con suero de leche, la linealización para este caso dio un R^2 de 0,9748, este coeficiente siendo más cercano a 1 refleja datos más precisos en cuanto a la cinética microbiana; para estos resultados los valores de μ y $\ln X_0$ son $0,0133 h^{-1}$ y 2,1342 respectivamente, como se observa en la **Gráfica 6**.

Los modelos logísticos representados por la **Ecuación 5** se ajustaron usando Polymath v6.10, y los resultados se encuentran en el **Anexo M**. Comparando con los parámetros obtenidos por ambos modelos, se observa que los valores de los parámetros obtenidos para el suero de leche son más cercanos entre sí que los parámetros que se hallaron para la fermentación con BHI, estos resultados se observan en el **Cuadro 14**.

Gráfica 6. Fase exponencial en suero de leche.



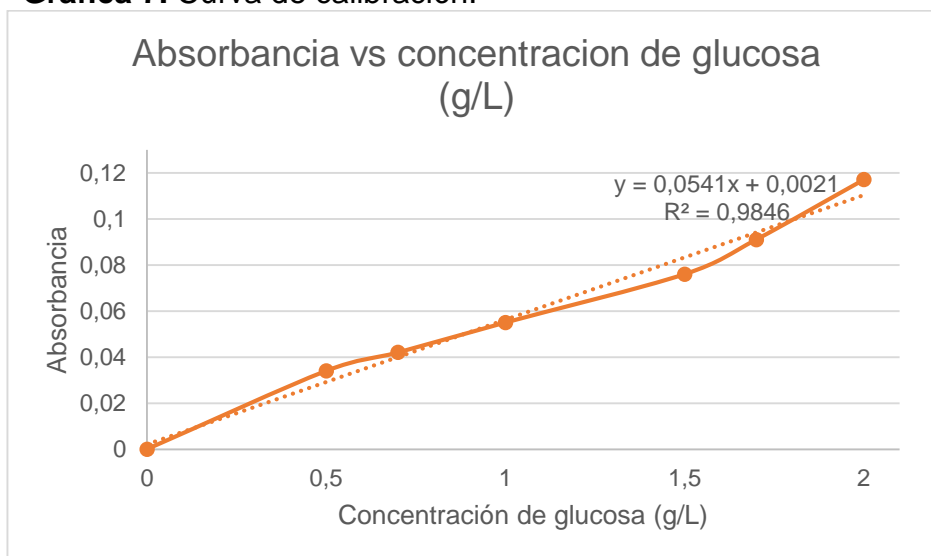
Cuadro 14. Comparación de parámetros de velocidad de formación de biomasa.

Parámetro	BHI		Suero de leche	
	Crecimiento exponencial	Ecuación logística	Crecimiento exponencial	Ecuación logística
μ (h ⁻¹)	0,017	0,0786	0,0133	0,01325
X_m (Log (UFC/mL))	-	13,416	-	18,014
X_o (Log (UFC/mL))	8,4351	8,109	8,4503	8,426
R^2	0,901	0,92	0,9748	0,956

4.6 CONSUMO DE SUSTRATO

Como primer paso para analizar esta sección se debe hacer la implementación de la curva de calibración realizada en el capítulo anterior, se procedió a medir la absorbancia de soluciones de 0, 0,5, 0,7, 1, 1,5, 1,7 y 2 g/L de glucosa y los resultados se determinaron en la **Tabla 7**, la curva de calibración se realizó con el fin de determinar las concentraciones de glucosa de las muestras extraídas de ambas fermentaciones para poder analizar el consumo de sustrato en ambas fermentaciones y observar cual sustrato tiene mejor rendimiento con respecto a la biomasa. La curva de calibración se representa en la **Gráfica 7**.

Gráfica 7. Curva de calibración.



El resultado de esta curva dio un coeficiente de correlación (R^2) igual a 0,9846, lo cual indica que la preparación del reactivo DNS fue exitosa, las soluciones patrón de glucosa fueron preparadas de manera adecuada y se tuvo el respectivo cuidado al realizar las reacciones de azúcares reductores entre las soluciones de glucosa y el reactivo DNS, protegiendo los tubos de la luz.

Para interpretar los resultados obtenidos en el método colorimétrico para las muestras de ambas fermentaciones, de la ecuación obtenida mediante una regresión lineal de la curva de calibración realizada se despejó la variable de concentración en función de la absorbancia medida. Para la primera fermentación realizada con BHI, los datos tabulados en la **Tabla 8** determinan cuanto es la absorbancia para cada muestra, con la ecuación previamente despejada se obtienen las concentraciones de azúcares reductores para cada muestra de esta fermentación, en función del tiempo.

Tabla 10. Concentraciones de glucosa en BHI.

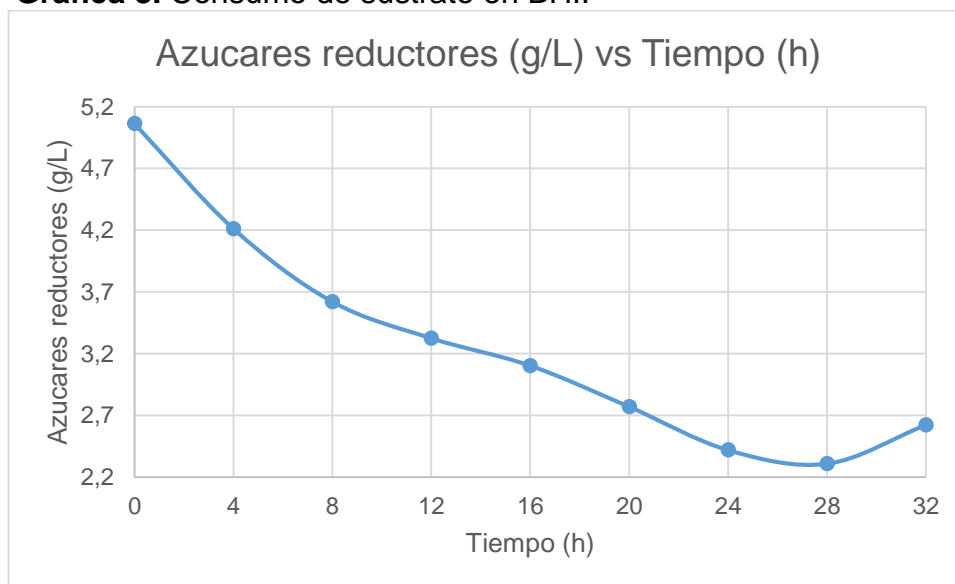
Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración azúcares reductores (g/L)
0	0,276	5,063
4	0,230	4,213
8	0,198	3,621
12	0,182	3,325
16	0,170	3,104
20	0,152	2,771

Tabla 10. (Continuación).

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración azúcares reductores (g/L)
24	0,133	2,420
28	0,127	2,309
32	0,144	2,623

Representando los datos obtenidos en la **Tabla 10** se observa como es el consumo de sustrato en esta fermentación en función del tiempo, mediante la **Gráfica 8**. Donde se alcanza a observar que el consumo de sustrato se realiza hasta la hora 24 al igual que el crecimiento del microorganismo y que de aquí en adelante la concentración de azúcares reductores aumenta, esto se puede analizar desde el punto de vista microbiológico, ya que las bacterias al morir sufren una lisis celular, dentro de la cual se puede determinar presencia de azúcares reductores que hayan sido liberados por estos microorganismos; el consumo de sustrato se puede analizar desde una concentración inicial de glucosa de 5 g/L presente en el sustrato BHI y que desciende hasta un mínimo de 2,3 g/L aproximadamente; el sustrato no se agotó del todo ya sea por condiciones de operación o del microorganismo.

Gráfica 8. Consumo de sustrato en BHI.



Por otro lado, usando de nuevo el método colorimétrico DNS, se analizaron las muestras obtenidas para la fermentación de suero de leche expresando sus resultados en la **Tabla 9**, realizando los cálculos nuevamente con la ecuación de

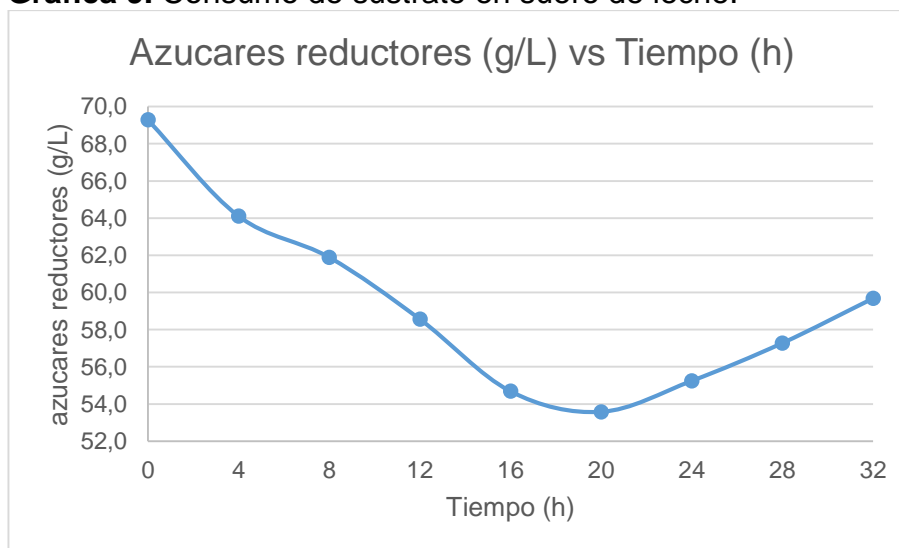
la curva de calibración previamente despejada se obtienen los resultados para la concentración de glucosa en suero de leche en función del tiempo del proceso de la fermentación en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Concentración de azúcares reductores en suero de leche.

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración azúcares reductores (g/L)
0	0,377	69,298
4	0,349	64,122
8	0,337	61,904
12	0,319	58,577
16	0,298	54,695
20	0,292	53,586
24	0,301	55,250
28	0,312	57,283
32	0,325	59,686

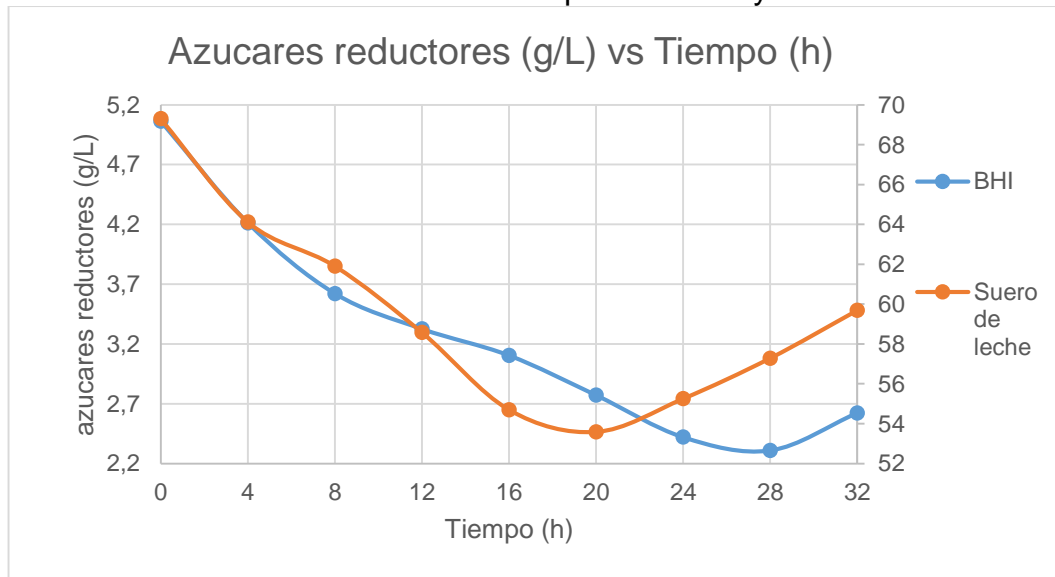
Con estos resultados ahora se representa el consumo de sustrato en función del tiempo para la segunda fermentación, expuesto en la **Gráfica 9**. Para este proceso el sustrato desciende desde una concentración de 69 g/L hasta 55 g/L entre la fase exponencial de la bacteria, después de este punto el microorganismo deja de consumir los azúcares reductores disponibles desde un comienzo y empieza a incrementar la concentración de estos; como anteriormente se explicó debido a la lisis celular que ocurre cuando esta bacteria entra en la fase de muerte se pueden hallar azúcares reductores presentes en las estructuras de los microorganismos.

Gráfica 9. Consumo de sustrato en suero de leche.



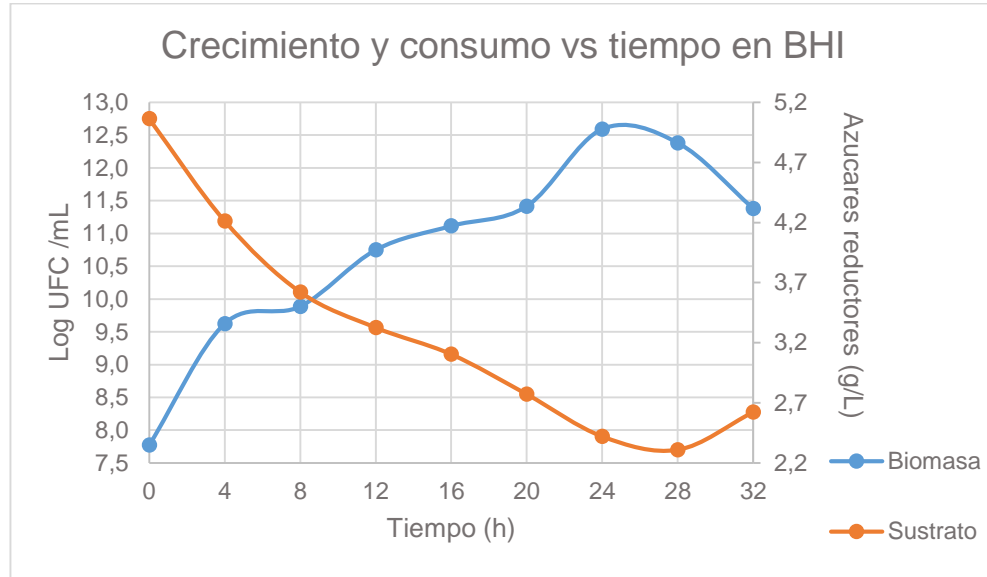
Ahora comparando ambas fermentaciones se obtiene la **Gráfica 10**, donde se puede observar como es el consumo de azúcares reductores en ambos sustratos, y determinar en qué momento el sustrato empieza a escasear. Observando estos comportamientos se refleja algo muy diferente a la comparación establecida entre el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* para los 2 sustratos como se observaba en la **Gráfica 4**. Ahora se debería esperar que el sustrato se agotara por completo cuando la fase exponencial haya terminado, pero para el sustrato BHI la concentración de azúcares reductores sigue disminuyendo en las 4 horas siguientes, y lo mismo ocurre para el suero de leche, a las 24 y 16 horas respectivamente para cada sustrato; esto se debe a varios factores, entre los cuales este método puede dar una idea de donde se encuentra la fase estacionaria la cual dura aproximadamente 4 horas en cada sustrato, después se observa la fase de muerte y con ella un incremento en la concentración de azúcares reductores, lo cual indica que los azúcares liberados en la lisis celular si son reconocidos por este método, pero no se tienen en cuenta para realizar cálculos de parámetros cinéticos o rendimientos.

Gráfica 10. Consumo de sustrato comparando BHI y suero de leche.



Analizando ahora el crecimiento de biomasa y el consumo de sustrato se observa la **Gráfica 11** en función del tiempo, para el proceso con BHI. Se puede determinar que la velocidad de formación de biomasa y la velocidad de consumo de sustrato están ligadas entre sí y se puede expresar que el consumo de sustrato está involucrado con el crecimiento de la biomasa, porque se observa que la fase exponencial presenta los mismos cambios para ambos y cuando la bacteria ha muerto el sustrato vuelve a aumentar.

Gráfica 11. Comparación del crecimiento de biomasa y consumo de sustrato en BHI.



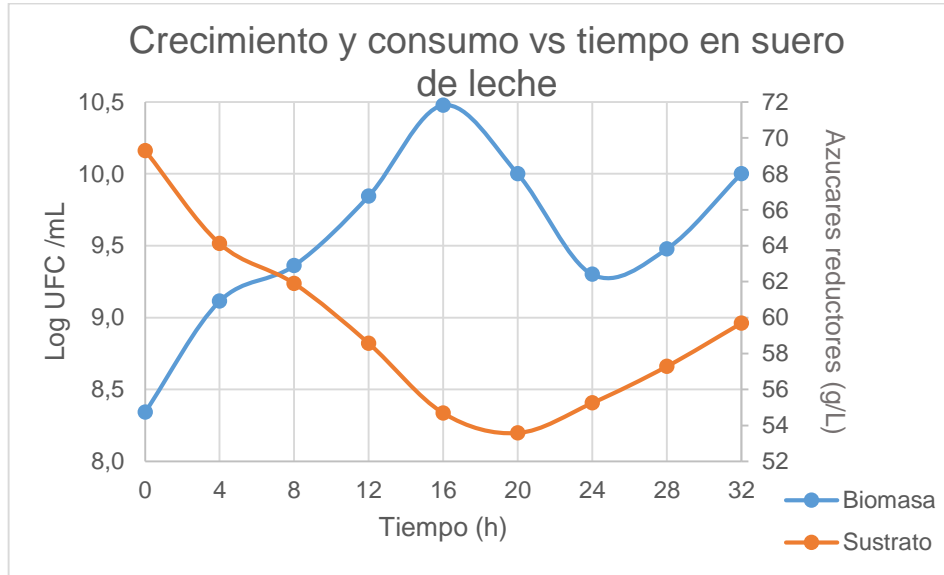
Paralelamente se puede observar algo similar en el suero de leche, donde la fase exponencial tiene relacionadas mutuamente al crecimiento y al consumo de sustrato; pero se observa algo diferente después en la fase de diauxia, el microorganismo sigue creciendo y a su vez los azúcares reductores aumentan en su concentración, esto se puede deber a varios aspectos, primero que algunas bacterias mueran y otras se alimenten de estas y segundo debido a que es un sustrato complejo se puede empezar a disminuir la concentración de otro nutriente ya sea una proteína o aminoácidos presentes en el suero de leche y los azúcares liberados en la lisis celular no se consuman durante unos periodos de tiempo.

Vale aclarar que la fermentación en suero de leche puede provocar la formación de más biomasa después de la fase de diauxia, caso que no se estudió debido a que se establecieron 32 horas de fermentación, pero puede llegar hasta las 48 horas al estar trabajando con un microorganismo mesófilo⁶⁴.

El comportamiento del crecimiento de biomasa y consumo de sustrato para la fermentación donde se usó suero de leche se representa en la **Gráfica 12**, como una función del tiempo.

⁶⁴ MADIGAN, Michael y PARKER, Jack. Brock, Microbiología De Los Microorganismos. Barcelona: Pearson, 2008. p. 108984 - 205 - 3679 - 2.

Gráfica 12. Comparación del crecimiento de biomasa y consumo de sustrato en suero de leche.



Para analizar la parte del rendimiento con respecto a la biomasa y el sustrato $Y_{X/S}$, se calcularon 2 tipos de rendimiento en este caso un rendimiento instantáneo como se observa en la **Tabla 12** y la **Tabla 13** para la fermentación con BHI y suero de leche respectivamente. El cual se calcula mediante cambios en las concentraciones de azúcares reductores y de biomasa entre periodos específicos, para los cuales están divididos cada 4 h; los cálculos se pueden observar en el **Anexo J**.

Tabla 12. Rendimientos instantáneos para BHI.

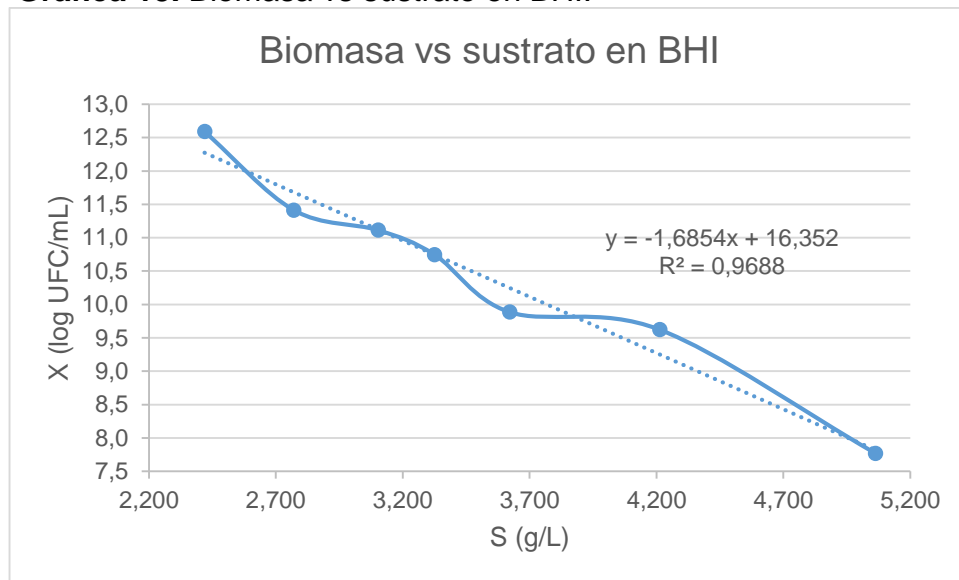
Tiempo (h)	$Y_{X/S}$ (log UFC/ g glucose)
0 – 4	2,179
4 – 8	0,445
8 – 12	2,914
12 – 16	1,649
16 – 20	0,905
20 – 24	3,349

Tabla 13. Rendimientos instantáneos para suero de leche.

Tiempo (h)	$Y_{X/S}$ (log UFC/ g glucose)
0 – 4	0,149
4 – 8	0,112
8 – 12	0,145
12 – 16	0,163

Así como se puede calcular el rendimiento instantáneo se puede calcular un rendimiento global mediante una regresión lineal en graficas de concentración de biomasa vs concentración de glucosa⁶⁵. Para los datos obtenidos con BHI se representa la **Gráfica 13**, la linealización arrojo un coeficiente de correlación R^2 igual a 0,9688, al obtener la pendiente se tiene que el rendimiento es igual a 1,6854 Log UFC/g glucosa; la pendiente negativa indica que con un incremento de la biomasa hay una disminución en la concentración de glucosa.

Gráfica 13. Biomasa vs sustrato en BHI.



Para el caso del sustrato suero de leche, se obtiene mediante la regresión lineal una ecuación de una línea recta con un coeficiente R^2 igual a 0,9979; esto indica que los datos de biomasa y sustrato representan un comportamiento lineal, dando un resultado para el rendimiento global de 0,1443 Log UFC/g glucosa. Estos datos se obtienen de la **Gráfica 14**.

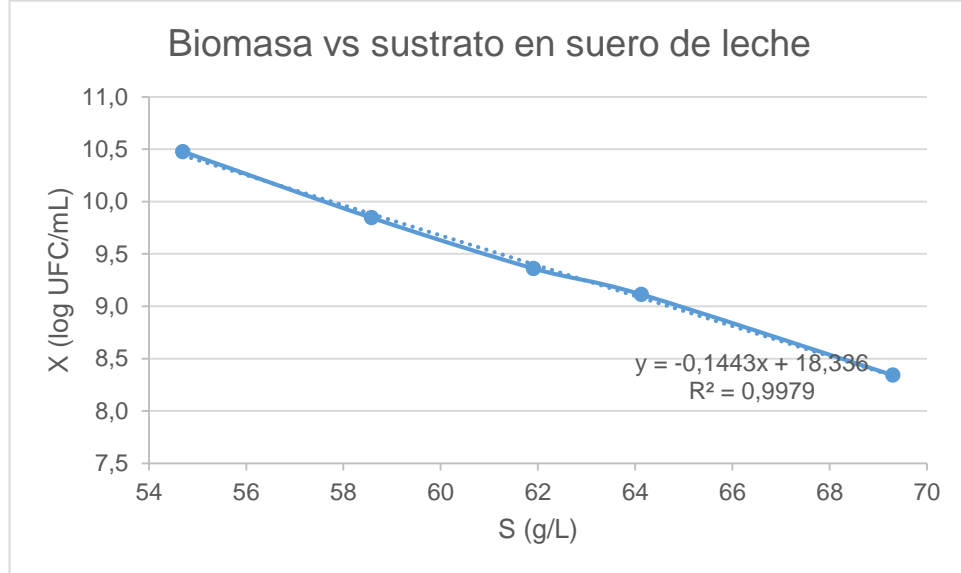
Los datos obtenidos de rendimientos globales para ambos sustratos se encuentran en el **Cuadro 15**. Lo cual indican que en el BHI se forman más UFC/mL que en suero de leche al consumir 1 g de glucosa.

Cuadro 15. Rendimientos globales de biomasa – sustrato.

Sustrato	BHI	Suero de leche
Rendimiento (Log UFC/g glucosa)	1,6854	0,1443

⁶⁵ DORAN, Pauline. Bioprocess Engineering Principles. San Diego: Academic press inc., 1995. p. 4550-12-220855-2.

Gráfica 14. Biomasa vs sustrato en suero de leche.



Utilizando Polymath V6.10, se ajustó la **Ecuación 7** y la **Ecuación 8**, para ambos sustratos para hallar el valor ajustable de S_0 en g glucosa/mL, $Y_{X/S}$ en Log UFC/g glucosa y m_s en g glucosa/Log UFC*h, los valores encontrados se encuentran en el **Cuadro 16**.

Cuadro 16. Comparación de parámetros de velocidad de consumo de sustrato.

Parámetro	BHI		Suero de leche	
	Crecimiento exponencial	Ecuación logística	Crecimiento exponencial	Ecuación logística
S_0 (g glucosa/mL)	4,631	4,949	68,463	68,847
m_s (g glucosa*Log UFC ⁻¹ *h ⁻¹)	-1,2E-3	-2,5E-3	6,591E-3	-7,95E-2
$Y_{X/S}$ (Log UFC/g glucosa)	1,5796	1,344	0,1558	0,0773
R^2	0,881	0,975	0,965	0,973

Al ajustar los datos podemos comparar los rendimientos obtenidos con los globales y analizar que ambos resultados fueron adecuados y se aproximan uno al otro; la comparación se encuentra en el **Cuadro 17**.

Cuadro 17. Comparación de rendimientos obtenidos.

Método	BHI	Suero de leche
Crecimiento exponencial	1,5796	0,1558
Ecuación logística	1,344	0,0773
Regresión lineal	1,685	0,1443

Los reportes obtenidos por el software utilizado se encuentran en el **Anexo M**, se puede analizar que el rendimiento biomasa – sustrato es mayor en BHI que en suero de leche, lo que indica que el microorganismo por cada g de glucosa crece 10 veces más en BHI que en suero de leche; la interpretación se hace así debido a que el rendimiento está en unidades de Log UFC/mL.

4.7 PRODUCCIÓN DE ACIDO HIALURONICO

Para poder analizar las cartas obtenidas de la cromatografía líquida de alta resolución es necesario tener presente que esta técnica se basa en la separación de componentes por tamaño, entre más tarde salgan más pequeña será la molécula, también hay que tener en cuenta que se utilizó la columna *Ultrahydrogel linear* la cual presenta afinidad al analizar muestras de tipo biológicas tales como polisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas y péptidos⁶⁶, el pretratamiento donde se adiciona alcohol para matar las bacterias, seguido de un surfactante con el fin de desprender el ácido hialurónico de la membrana celular y se pasa por una microfiltración a través de un filtro de 0,45 µm. Al hacer la microfiltración se garantiza el paso de moléculas de ácido hialurónico con bajo y alto peso molecular, una molécula de ácido hialurónico con 500 kDa de peso molecular tiene un radio atómico de 95 nm aproximadamente, lo cual equivale a 0,095 µm⁶⁷

Al observar los resultados de las pruebas en el **Anexo L** se puede observar que en todas muestras se encuentran un pico prominente alrededor de los 13 minutos y lo que quiere decir que se trata de las misma molécula, al ver las cartas del patrón el cual su peso molecular esta entre 1,5 y 1,8 MDa se observa que los picos son alrededor de los 9 minutos esto indica que la molécula que muestra el pico de los 13 minutos en las muestras es una molécula de menor peso molecular que la utilizada como patrón, pero se trata del ácido hialurónico debido a que es la molécula de mayor peso molecular formada durante el metabolismo de la bacteria, los otros metabolitos presentes tienen pesos moleculares inferiores a 1 MDa por lo que saldrían en picos después de transcurrido un tiempo considerable, la otra molécula que podría ser separada por la afinidad de la columna sería el peptidoglicano al ser un biopolímero presente en gran cantidad en la membrana

⁶⁶ WATERS. Gel permeation chromatography (GPC) columns and consumables. p. 309-326.

⁶⁷ GARG, Hari y HALES, Charles. Chemistry and Biology of Hyaluronan. 1 ed. Boston: ELSEVIER, 2004. p. 1-6050 08 044382 6.

celular por tratarse de una bacteria Gram positiva, esta se descarta por el pretratamiento realizado donde se hace la microfiltración y retienen todas las bacterias muertas por ende no puede pasar a formar parte de la muestra. El peso molecular inferior al de la muestra se puede dar por que la cepa bacteriana usada no es la misma con la que se produjo el patrón y a pesar que la bacteria si produjo ácido hialurónico puede que las condiciones de fermentación y sustrato empleados no son los óptimos para que la bacteria produzca un ácido de alto peso molecular.

5. CONCLUSIONES

- Los 2 sustratos utilizados para la producción de ácido hialurónico son afines con la bacteria debido a sus características nutricionales.
- Los resultados obtenidos del experimento determinaron que la mejor temperatura entre 35, 37 y 39°C fue 37°C. Esta temperatura no varía respecto al sustrato, puede que en un sustrato sea mayor el crecimiento microbiano, pero a 37°C va ser la tasa más alta.
- Respecto al rendimiento producto – biomasa y producto – sustrato, no se pueden cuantificar y se determinó que el ácido hialurónico producido en el proceso es de menor peso molecular comparándolo con el patrón utilizado (1,5 - 1,8 MDa).
- El rendimiento biomasa – sustrato se calculó de manera global para la fermentación con BHI resultando 1,685, 1,5796 y 1,344 Log UFC/g glucosa, para la regresión lineal, crecimiento exponencial y ecuaciones logísticas respectivamente; en la fermentación con suero de leche este valor se ajustó en 0,1443, 0,1558 y 0,0773 Log UFC/g para la regresión lineal, crecimiento exponencial y ecuaciones logísticas respectivamente, los datos obtenidos nos indican que el sustrato BHI represento un crecimiento de la biomasa 10 veces mayor respecto al crecimiento en el sustrato suero de leche.
- Para el sustrato BHI el modelo de ecuaciones logísticas se ajustó mejor a la cinética de crecimiento y al consumo de sustrato con unos coeficientes de correlación de 0,92 y 0,975 respectivamente.
- Para el sustrato Suero de leche el modelo de crecimiento exponencial se ajustó mejor a la cinética de crecimiento y el modelo de ecuaciones logísticas para el consumo de sustrato con unos coeficientes de correlación de 0,9748 y 0,973 respectivamente.

6. RECOMENDACIONES

- Basándose en los resultados obtenidos en el proyecto se recomienda continuar la investigación realizando pruebas más específicas para la cuantificación del ácido hialurónico producido por la bacteria como la prueba de Carbazol explicada en el **Anexo N**, así mismo realizar pruebas de cromatografía líquida con patrones de menor peso molecular con el fin de determinar el peso molecular del ácido hialurónico producido en el proyecto para poder realizar un modelamiento de los datos que puedan servir para diseñar un proceso a escala industrial.
- Por ser un proyecto con un proceso biotecnológico, más variables pueden llegar a afectar los resultados como son el pH, aeración y/o agitación, al determinar que la bacteria presenta afinidad por los sustratos utilizados y determinar que la temperatura adecuada se recomienda realizar la evaluación de como las variables nombradas puedan influir en el proceso.
- La investigación también puede ser continuada basándose en los datos de crecimiento microbiano y consumo de sustrato, utilizando el conocimiento adquirido en el área de bioprocesos para realizar el diseño de un biorreactor adecuado para realizar el proceso industrialmente.
- Como el ácido hialurónico es de alto valor comercial se recomienda aplicar los conocimientos adquiridos en diversas áreas de la ingeniería química para realizar un diseño del proceso de separación y purificación del ácido hialurónico, obteniéndolo puro como resultado final y así poder comercializarlo.

BIBLIOGRAFÍA

AMADO, Isabel y VÁZQUEZ, Jose. Cheese wey: A cost effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. En: FOOD CHEMISTRY. vol. 198, p. 54-61.

ARMSTRONG, David y JOHNS, Michael R. Culture Conditions Affect the Molecular Weight Properties of Hyaluronic Acid Produced by *Streptococcus zooepidemicus* . En: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. vol. 63, no. 7, p. 2759-2764.

BD. Patron De Turbidez BBL Preparado. [Print(0)]. [Consultado el Mayo/152016]. Disponible en: [http://bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421\(0205\)_es.pdf](http://bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421(0205)_es.pdf).

BENEDINI, Leandro y ANDRADE, María. Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of Hyaluronic Acid. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. vol. 130, p. 798-800.

BERND, H. y REHM, A. Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursor. Nueva Zelanda: Caister Academic Press, 2009. 294 p. ISBN 978-1-904455-36-3.

BLANK, Lars y NIELSEN, Lars. Microbial Hyaluronic Acid production. En: APPL. MICROBIOL BIOTECHNOL. vol. 66, p. 341-351.

CARDONA, Jesús. La Viscosuplementación como tratamiento alternativo en la osteoartritis. En: MEDIGRAPHIC.

Carlos DURAN MOYA. Medio De Cultivo y Procedimiento Para La Preparación De Ácido Hialurónico De Alto Peso Molecular. Inventor(es): FLAVIA CAZZOLA; MICHAEL O'REGAN y VINCENZA CORSA. 0716688. España, 2 211 883. 1-15. 2004.

[Anónimo]Clínica Gbcom, Reporte Marcas Con Permiso De Comercialización, España. [Print(0)]. [Consultado el Noviembre/32015]. Disponible en: <http://www.gbcom.es/>

COTO, Gabriel; PÉREZ, Carlos y et al. Isolation, purification and characterization of hyaluronan from human umbilical cord residues. En: CARBOHYDRATE POLYMERS. vol. 62, p. 321-326.

DE MACEDO, A. C. y SANTANA, M. Hyaluronic acid depolymerization by ascorbate-redox effects of solid state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* in cashew apple fruit bagasse. En: WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. vol. 28, p. 2213-2219.

DORAN, Pauline. Bioprocess Engineering Principles. San Diego: Academic press inc., 1995. 455 p. ISBN 0-12-220855-2.

FRANKE, Lukas; SMIRNOU, Dzianis y et al. Simultaneous determination of intracellular UDP-sugars in hyaluronic acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. En: JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B. vol. 997, p. 194-199.

GARG, Hari y HALES, Charles. Chemistry and Biology of Hyaluronan. 1st ed. Boston: ELSEVIER, 2004. 1-605 p. ISBN 0 08 044382 6.

GISMERA, María. Introducción a La Cromatografía Líquida De Alta Resolución. España: Universidad Autónoma de Madrid, 2009. ISBN 9788483441459 8483441454.

HERNANDEZ R., M. y VELEZ R., J. Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. En: TEMAS SELECTOS DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS. vol. 8, no. 2, p. 13-22.

[Anónimo] Hyaluronic Acid Market by Products (Single Injection, Three Injection, Five Injection), by Application (Osteoarthritis, Adhesive Prevention, Drug Delivery, Dermal Fillers) is Expected to Reach USD 10.80 Billion by 2020. [Electronic(1)]. [Consultado el Noviembre/12015]. Disponible en: <http://www.grandviewresearch.com/press-release/global-hyaluronic-acid-market>

[Anónimo] Hyaluronic Acid Price, Hyaluronic Acid Price Suppliers and Manufacturers at Alibaba.Com. [Electronic(1)]. [Consultado el Octubre/162015]. Disponible en: <http://www.alibaba.com/showroom/hyaluronic-acid-price.html>

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación. Presentación De Tesis, Trabajos De Grado y Otros Trabajos De Investigación. NTC 1486. 6th ed. Bogotá D.C.: 2008. 42 p.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Referencias Bibliográficas. Contenido, Forma y Estructura. NTC 5613. Bogotá D.C.: 2008. 38 p.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Referencias Documentales para Fuentes de Información Electrónica. NTC 4490. Bogotá D.C.: 1998. 27p.

IZAWA, Naoki y HANAMIZU, Tomoko. *Streptococcus thermophilus* produces exopolysaccharides including hyaluronic acid. En: JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING. vol. 107, no. 9, p. 119-123.

IZAWA, Naoki y SERATA, Mazaki. Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. En: JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING. vol. 111, no. 6, p. 665-670.

JAGADEESWARA, Reddy y KARUNAKARAN, K. T. Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus* strain. En: JOURNAL BIOSCIENCE BIOTECH. vol. 2, no. 3, p. 173-179.

JEONG, Euijoon y et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. En: JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. vol. 185, p. 28-36.

LAGO MENDOZA, G.; CREMATA, J. A. y COTO VALDÉS, G. Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones. En: CUBANA DE FARMACIA. p. 100-190.

LEBLANC, Pierrick y OUESLATI, Nadia. A simple methodology for predicting the performances of hyaluronic acid purification by diafiltration. En: JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE. vol. 490, p. 152-159.

LIU, Long, et al. Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. En: BIORESOURCE TECHNOLOGY. vol. 99, p. 8532-8536.

LIU, Long, et al. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. En: MICROBIAL CELL FACTORIES. vol. 10, no. 99, p. 1-9.

MADIGAN, Michael y PARKER, Jack. Brock, Microbiología De Los Microorganismos. Barcelona: Pearson, 2008. 1089 p. ISBN 84 - 205 - 3679 - 2.

MAT DON, Mashitah y SHOPARWE, Noor Fazliani. Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. En: BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL. vol. 49, p. 95-103.

MERCK. Ficha técnica medio de cultivo BHI.

MEYER, Karl y PALMER, John. The polysaccharide of the vitreous humor. En: JOURNAL BIOLOGICAL CHEMISTRY. p. 629-634.

MILLER, Gail. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. En: PIONEERING RESEARCH DIVISION. vol. 31, no. 3, p. 426-428.

MURADO, M. A. y MONTEMAYOR, M. I. Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. En: FOOD AND BIOPRODUCTS PROCESSING. vol. 90, p. 491-498.

NECAS, J., et al. Hyaluronic acid (hyaluronan). En: VETERINARNI MEDICINA. vol. 53, no. 8, p. 397-411.

PARÉS I FARRAS, R. Bioquímica De Los Microorganismos. Barcelona: Reverté, 2002. 383 p. ISBN 84 - 291 - 7454 - 0.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA. Manual De Laboratorio De Procesos Biotecnológicos. Bogotá D.C.: 2007.

POVEDA, Elpidia. Whey, generalities and potential use as source of calcium from high bioavailability. En: REV. CHIL. NUTR. vol. 40, no. 4, p. 397-403.

PRESCOTT, Lansing y HARLEY, John. Microbiology. 6th ed. Colorado: McGraw Hill, 2005. 1130 p. ISBN 0072951753.

PRUSOVA, Alena. The Hydration of Hyaluronic Acid. Brno.: Brno University of technology, 2008. p. 1-82.

SARANJA, P. Hyaluronic Acid Production and its Applications. En: INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOLOGICAL ARCHIVES. p. 853-859.

SCHIRALDI, Chiara; LA GATTA, Annalisa y DE ROSA, Mario. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. En: [Anónimo] Biopolymers. INTECH, 2010. 387-412 p. ISBN 978-953-307-109-1.

SELYANIN, Mikhail y BOYKOV, Petr. Hyaluronic Acid. Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine. 1st ed. Moscow: Wiley, 2015. 198 p. ISBN 978 1 118 63379 3.

[Anónimo] *Streptococcus Dysgalactiae*. [Electronic(1)]. [Consultado el Abril/222016]. Disponible en: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_dysgalactiae

[Anónimo] *Streptococcus Equi*. [Electronic(1)]. [Consultado el Abril/142016]. Disponible en: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_equi

[Anónimo] *Streptococcus Pyogenes*. [Electronic(1)]. [Consultado el Abril/202016]. Disponible en: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_pyogenes

[Anónimo] *Streptococcus Zooepidemicus*. [Electronic(1)]. [Consultado el Noviembre/82015]. Disponible en: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Streptococcus_zooepidemicus

[Anónimo] Taxonomy Browser (Bacteria). [Electronic(1)]. [Consultado el Noviembre/102015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=2&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

TORTORA, Gerard. Introducción a La Microbiología. 9th ed. Argentina: Medica panamericana, 2007. 963 p. ISBN 978 950 06 0740 7.

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE, Facultad de agroindustrias. Trabajo Práctico N°5 - Estudio Cuantitativo De Bacterias. [Electronic(1)]. [Consultado el Noviembre/52015]. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp5.pdf>

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL. Catedra De Biotecnología. Tinción y Observación De Microorganismos. [Electronic(1)]:2009. 1-9

URRIBARRI, Lauris; VIELMA, Alex y et al. Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. En: FCV-LUZ. vol. 14, no. 4, p. 297-302.

VÁZQUEZ, José, et al. Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. En: MICROBIAL CELL FACTORIES. vol. 9, no. 46, p. 1-10.

WATERS. Care and use Manual. Ultrahydrogel Columns. [Electronic(1)]. [Consultado el Mayo/242016]. Disponible en: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/wat011556.pdf>

WATERS. Gel permeation chromatography (GPC) columns and consumables. p. 309-326

WIDNER, B.; BEHR, R. y VON DOLLEN, S. Hyaluronic Acid production in *Bacillus subtilis*. En: APPL ENVIRON MICROBIOL. vol. 71, no. 7, p. 3747-3752.

YOMOTA, C. y OKADA, S. Ultrasonid depolymerization of hyaluronic acid. En: POLYMER DEGRADATION AND STABILITY. vol. 74, p. 77-85.

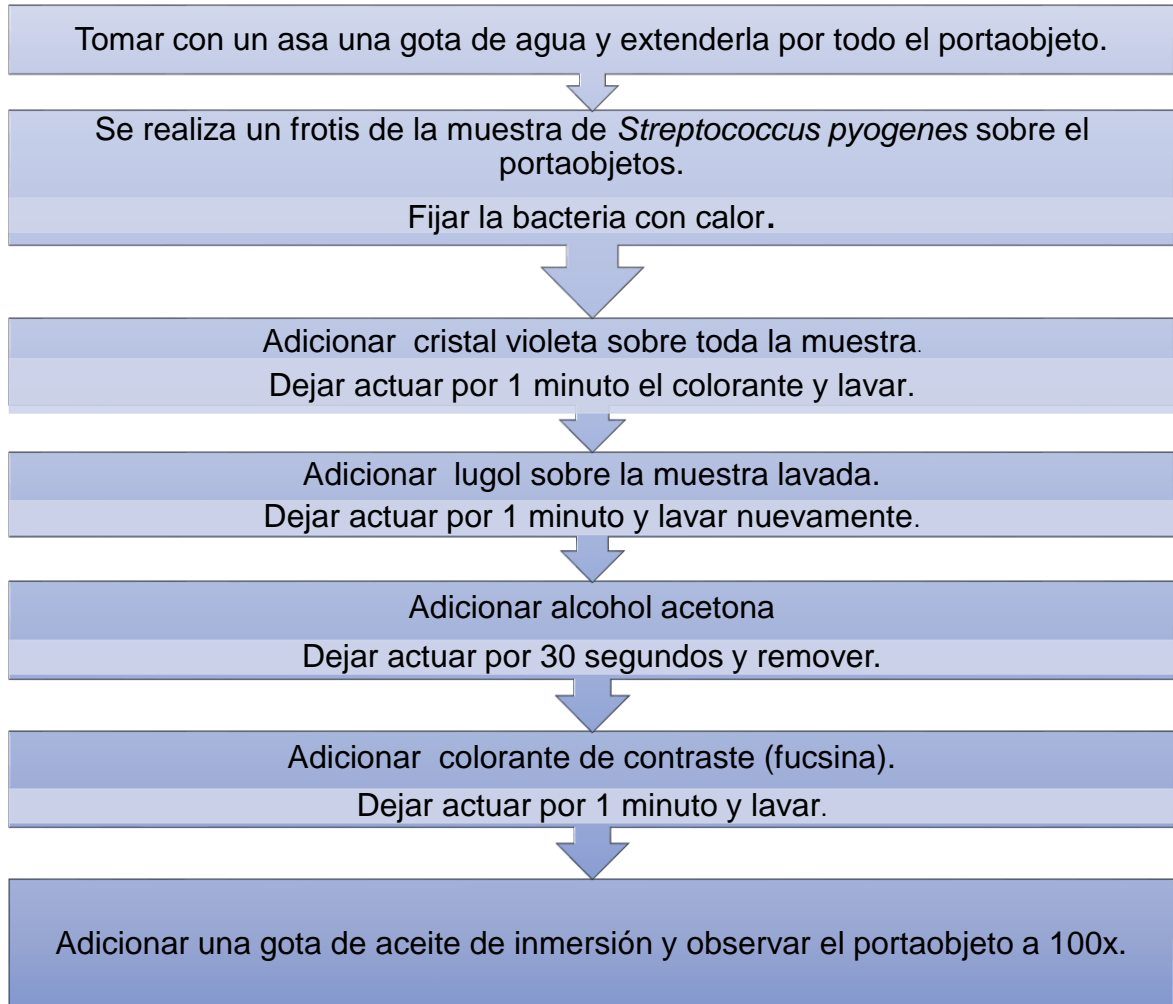
YU, Huimin y STEPHANOPOULOS, Gregory. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. En: METABOLIC ENGINEERING. vol. 10, p. 24-32.

ZHOU, Haidong y NI, Jinren. Separation of hyaluronic acid from fermentation broth by tangential flow microfiltration and ultrafiltration. En: SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY. vol. 52, p. 29-38.

ANEXOS

ANEXO A.
DIAGRAMA COLORACIÓN DE GRAM

Procedimiento de coloración de Gram.



Anexo B

Diluciones y siembras realizadas para sustrato BHI

Hora	Dilución teórica	Dilución sembrada
0	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
1	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
2	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
3	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
4	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
5	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
	10^{-8}	10^{-8}

Hora	Dilución teórica	Dilución sembrada
6	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
	10^{-8}	10^{-8}
	10^{-9}	10^{-9}
7	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
	10^{-8}	10^{-8}
	10^{-9}	10^{-9}
8	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
	10^{-8}	10^{-8}
	10^{-9}	10^{-9}

Anexo C

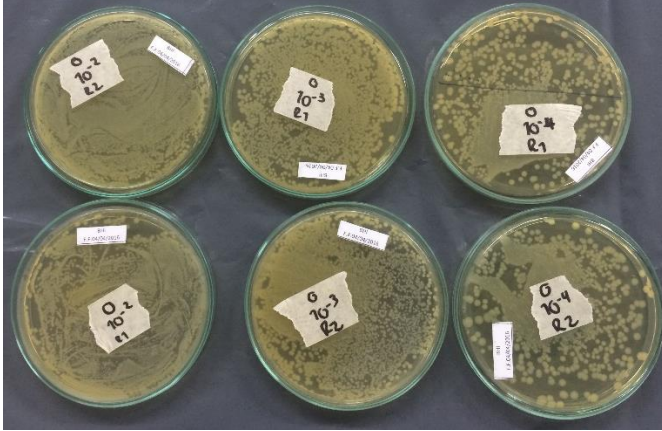
Diluciones y siembras realizadas para suero de leche

Hora	Dilución teórica	Dilución sembrada
0	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
1	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
2	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
3	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
	10^{-8}	10^{-8}
4	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
	10^{-8}	10^{-8}

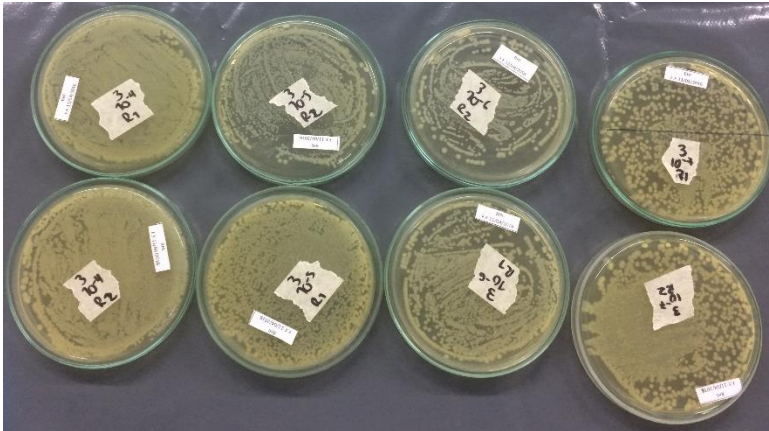
Hora	Dilución teórica	Dilución sembrada
5	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
	10^{-8}	10^{-8}
	10^{-9}	10^{-9}
6	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
	10^{-8}	10^{-8}
	10^{-9}	10^{-9}
	10^{-10}	10^{-10}
7	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
	10^{-8}	10^{-8}
	10^{-9}	10^{-9}
	10^{-10}	10^{-10}
8	10^{-1}	10^{-1}
	10^{-2}	10^{-2}
	10^{-3}	10^{-3}
	10^{-4}	10^{-4}
	10^{-5}	10^{-5}
	10^{-6}	10^{-6}
	10^{-7}	10^{-7}
	10^{-8}	10^{-8}
	10^{-9}	10^{-9}

Anexo D
Imágenes de siembras realizadas de BHI para conteo

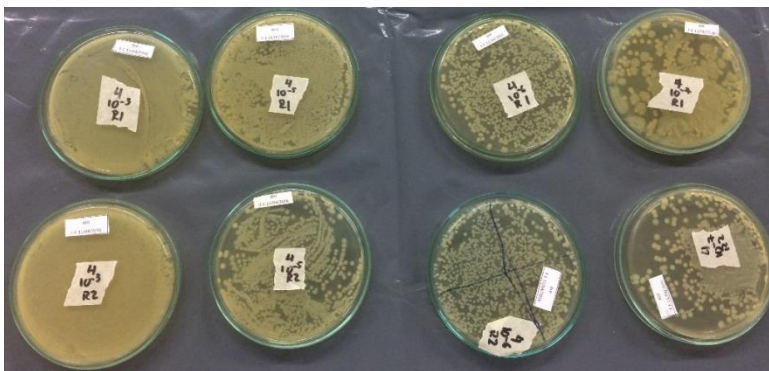
- Hora 0:



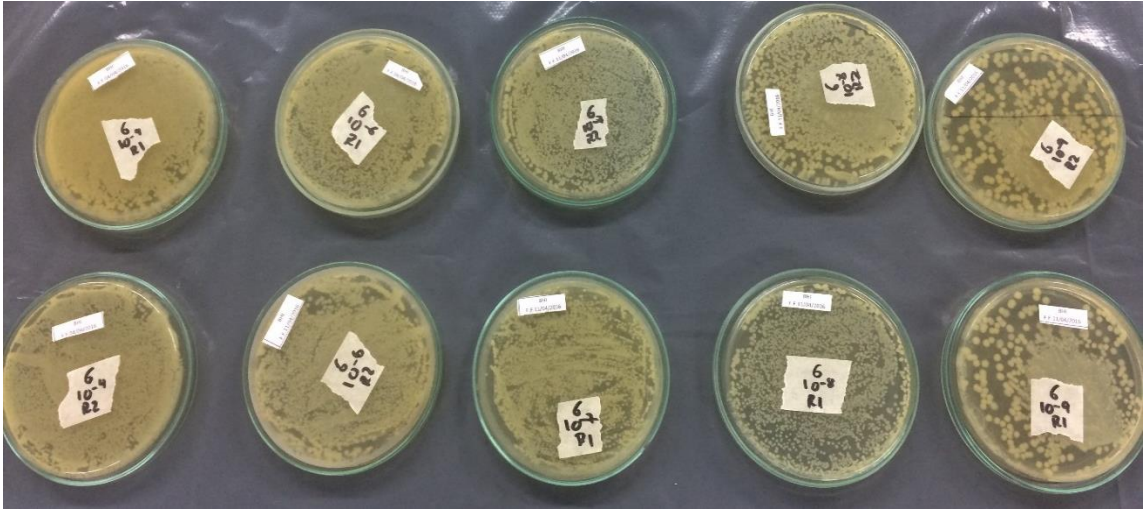
- Hora 12:



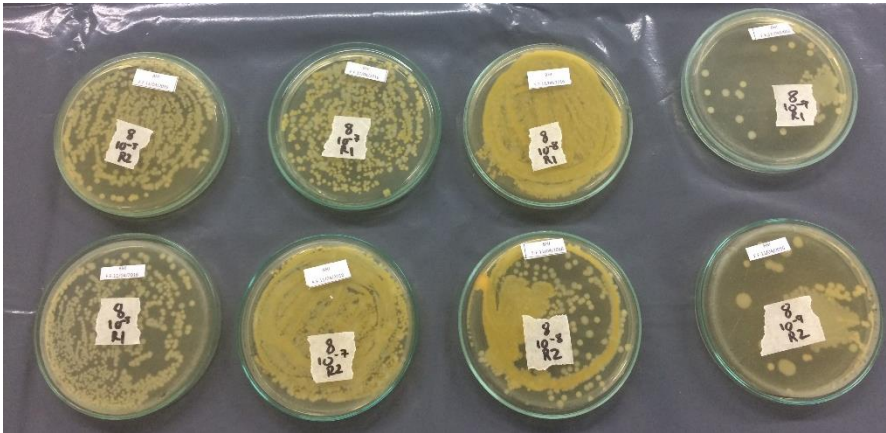
- Hora 16:



- Hora 24:

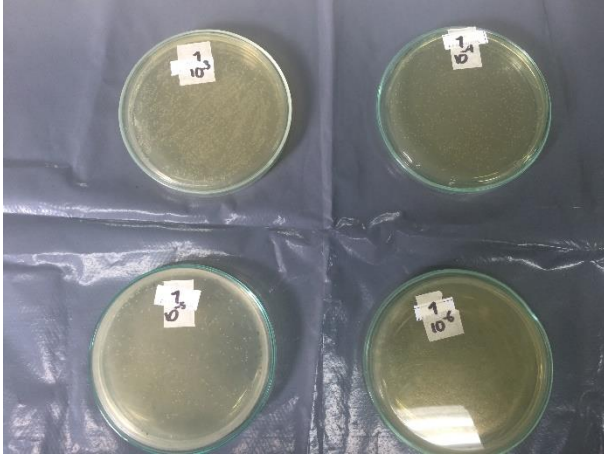


- Hora 32:

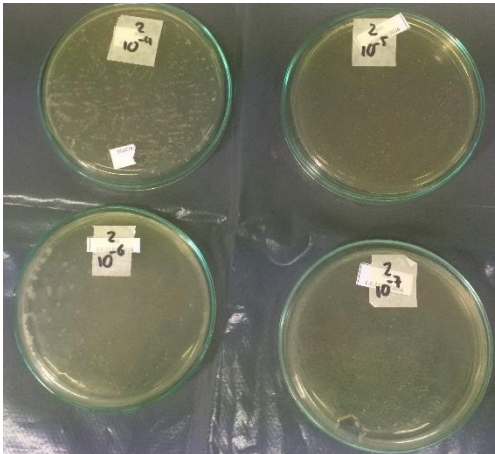


Anexo E
Imágenes de siembras realizadas de suero de leche para conteo

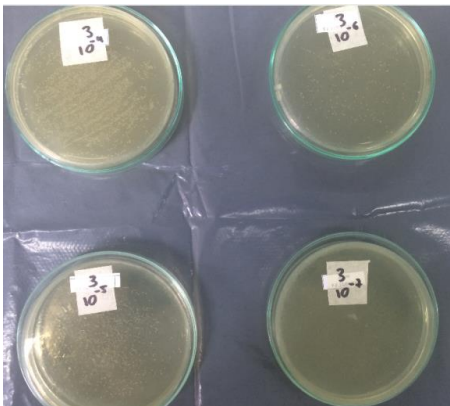
- Hora 0



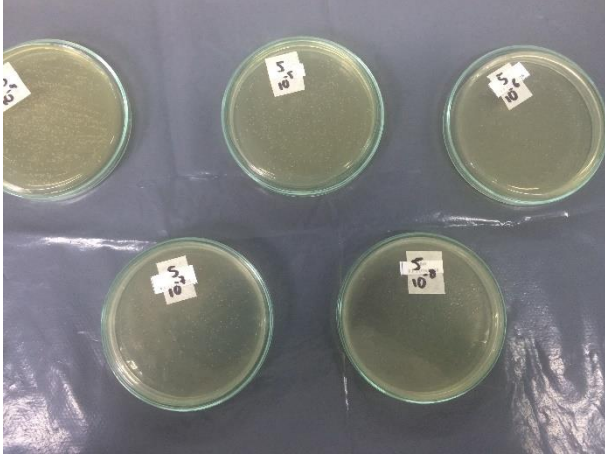
- Hora 4:



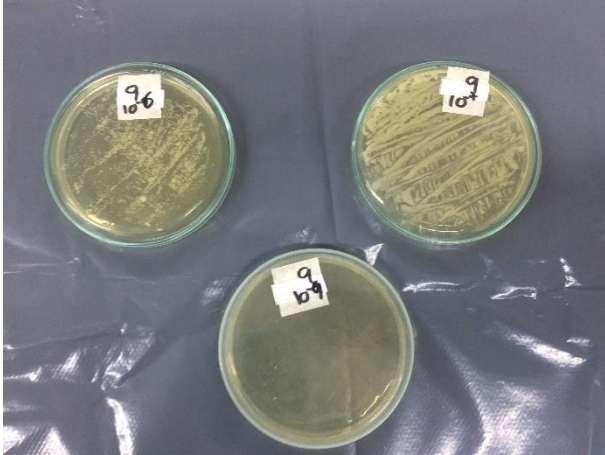
- Hora 8:



- Hora 16:



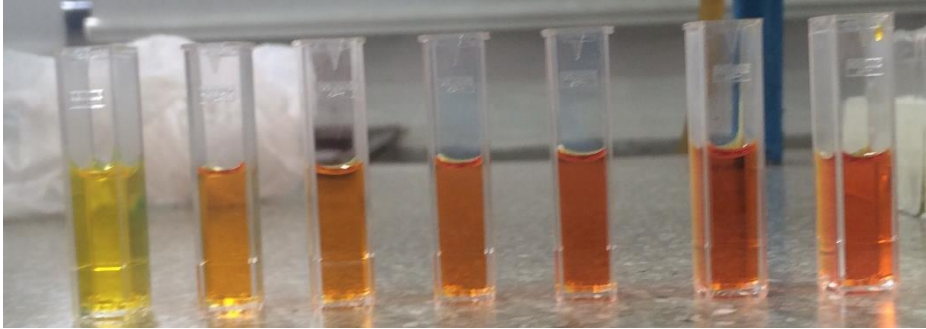
- Hora 32:



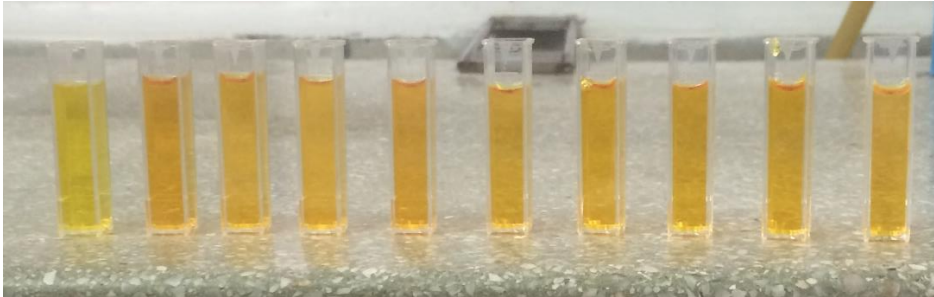
Anexo F

Muestras colorimetría DNS

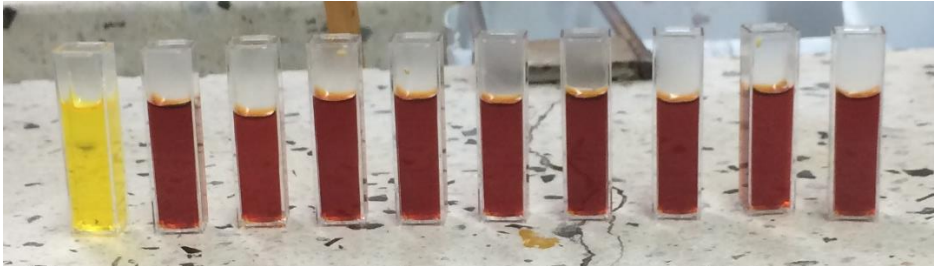
- Muestras – curva de calibración:



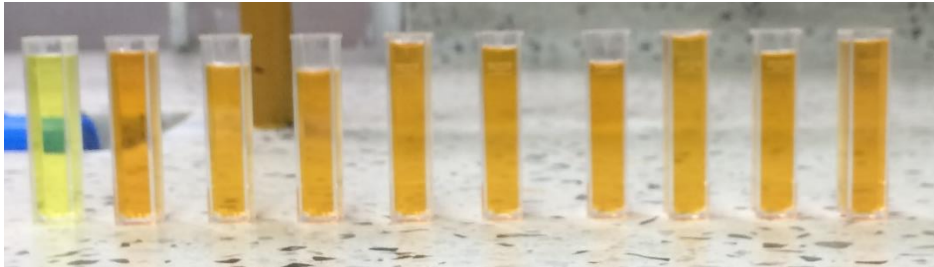
- Muestras – fermentación BHI:



- Muestras – fermentación suero de leche:



- Muestras – fermentación suero de leche, diluidas:



Anexo G
Cálculos UFC/mL

- BHI:

$$\text{Hora 0} = 590 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^4 = 59x10^6 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 4} = 420 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^6 = 42x10^8 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 8} = 766 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^6 = 77x10^8 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 12} = 560 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^7 = 56x10^9 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 16} = 1284 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^7 = 13x10^{10} \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 20} = 264 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^8 = 26x10^{10} \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 24} = 392 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^9 = 39x10^{11} \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 28} = 236 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^9 = 24x10^{11} \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 32} = 24 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^9 = 24x10^{10} \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

- Suero de leche:

$$\text{Hora 0} = 216 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^5 = 22x10^7 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 4} = 13 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^7 = 13x10^8 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 8} = 23 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^7 = 23x10^8 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 12} = 7 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^8 = 70x10^8 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 16} = 30 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^8 = 30x10^9 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 20} = 10 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^8 = 10x10^9 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 24} = 2 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^8 = 20x10^8 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 28} = 3 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^8 = 30x10^8 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

$$\text{Hora 32} = 1040 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} * 10 * 10^6 = 10x10^9 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

Anexo H

Concentraciones de curva de calibración

$$V_1 = \frac{V_2 * C_2}{V_1}$$

- Solución 0,5 g/L de glucosa.

$$V_{0,5} = \frac{10 \text{ mL} * 0,5 \text{ g/L}}{2 \text{ g/L}} = 2,5 \text{ mL}$$

- Solución 0,7 g/L de glucosa.

$$V_{0,7} = \frac{10 \text{ mL} * 0,7 \text{ g/L}}{2 \text{ g/L}} = 3,5 \text{ mL}$$

- Solución 1,0 g/L de glucosa.

$$V_{1,0} = \frac{10 \text{ mL} * 1 \text{ g/L}}{2 \text{ g/L}} = 5 \text{ mL}$$

- Solución 1,5 g/L de glucosa.

$$V_{1,5} = \frac{10 \text{ mL} * 1,5 \text{ g/L}}{2 \text{ g/L}} = 7,5 \text{ mL}$$

- Solución 1,7 g/L de glucosa.

$$V_{1,7} = \frac{10 \text{ mL} * 1,7 \text{ g/L}}{2 \text{ g/L}} = 8,5 \text{ mL}$$

Anexo I

Concentraciones de glucosa en muestras de BHI y suero de leche

- BHI:

$$\text{Concentración de glucosa } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{\text{Absorbancia} - 0,0021}{0,541}$$

$$\text{Hora 0 } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{0,276 - 0,0021}{0,541} = 5,063 \text{ g/L}$$

$$\text{Hora 4 } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{0,23 - 0,0021}{0,541} = 4,213 \text{ g/L}$$

$$\text{Hora 8 } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{0,198 - 0,0021}{0,541} = 3,621 \text{ g/L}$$

$$\text{Hora 12 } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{0,182 - 0,0021}{0,541} = 3,325 \text{ g/L}$$

$$\text{Hora 16 } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{0,170 - 0,0021}{0,541} = 3,104 \text{ g/L}$$

$$\text{Hora 20 } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{0,152 - 0,0021}{0,541} = 2,771 \text{ g/L}$$

$$\text{Hora 24 } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{0,133 - 0,0021}{0,541} = 2,420 \text{ g/L}$$

$$\text{Hora 28 } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{0,127 - 0,0021}{0,541} = 2,309 \frac{g}{L}$$

$$\text{Hora 32 } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{0,144 - 0,0021}{0,541} = 2,623 \text{ g/L}$$

- Suero de leche:

$$\text{Hora 0 } \left(\frac{g}{L}\right) = \left(\frac{0,377 - 0,0021}{0,541}\right) * 10 = 69,298 \text{ g/L}$$

$$\text{Hora 4 } \left(\frac{g}{L}\right) = \left(\frac{0,349 - 0,0021}{0,541}\right) * 10 = 64,122 \text{ g/L}$$

$$\text{Hora 8 } \left(\frac{g}{L}\right) = \left(\frac{0,337 - 0,0021}{0,541}\right) * 10 = 61,904 \text{ g/L}$$

$$\text{Hora 12 } \left(\frac{g}{L}\right) = \left(\frac{0,319 - 0,0021}{0,541}\right) * 10 = 58,577 \text{ g/L}$$

$$\begin{aligned} \text{Hora 16 } \left(\frac{g}{L}\right) &= \left(\frac{0,298 - 0,0021}{0,541}\right) * 10 = 54,695 \text{ g/L} \\ \text{Hora 20 } \left(\frac{g}{L}\right) &= \left(\frac{0,292 - 0,0021}{0,541}\right) * 10 = 53,586 \text{ g/L} \\ \text{Hora 24 } \left(\frac{g}{L}\right) &= \left(\frac{0,301 - 0,0021}{0,541}\right) * 10 = 55,250 \text{ g/L} \\ \text{Hora 28 } \left(\frac{g}{L}\right) &= \left(\frac{0,312 - 0,0021}{0,541}\right) * 10 = 57,283 \text{ g/L} \\ \text{Hora 32 } \left(\frac{g}{L}\right) &= \left(\frac{0,325 - 0,0021}{0,541}\right) * 10 = 59,686 \text{ g/L} \end{aligned}$$

Anexo J
 Calculo de rendimientos instantáneos biomasa – sustrato

$$Y_{X/S} = \frac{-\Delta X}{\Delta S}$$

- BHI:

$$Y_{X/S} \text{ entre 0 y 4 h} = \frac{-(9,6232 - 7,7709)}{4,213 - 5,063} = 2,179 \frac{\text{Log UFC}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{X/S} \text{ entre 4 y 8 h} = \frac{-(9,8865 - 9,6232)}{3,621 - 4,213} = 0,445 \frac{\text{Log UFC}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{X/S} \text{ entre 8 y 12 h} = \frac{-(10,7482 - 9,8865)}{3,325 - 3,621} = 2,914 \frac{\text{Log UFC}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{X/S} \text{ entre 12 y 16 h} = \frac{-(11,1139 - 10,7482)}{3,104 - 3,325} = 1,649 \frac{\text{Log UFC}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{X/S} \text{ entre 16 y 20 h} = \frac{-(11,415 - 11,1139)}{2,771 - 3,104} = 0,905 \frac{\text{Log UFC}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{X/S} \text{ entre 20 y 24 h} = \frac{-(12,5911 - 11,415)}{2,42 - 2,771} = 3,349 \frac{\text{Log UFC}}{\text{g glucosa}}$$

- Suero de leche:

$$Y_{X/S} \text{ entre 0 y 4 h} = \frac{-(9,1139 - 8,3424)}{64,122 - 69,298} = 0,149 \frac{\text{Log UFC}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{X/S} \text{ entre 4 y 8 h} = \frac{-(9,3617 - 9,1139)}{61,904 - 64,122} = 0,112 \frac{\text{Log UFC}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{X/S} \text{ entre 8 y 12 h} = \frac{-(9,8451 - 9,3617)}{58,577 - 61,904} = 0,145 \frac{\text{Log UFC}}{\text{g glucosa}}$$

$$Y_{X/S} \text{ entre 12 y 16 h} = \frac{-(10,4771 - 9,8451)}{54,695 - 58,577} = 0,163 \frac{\text{Log UFC}}{\text{g glucosa}}$$

Anexo K

Calculo de volúmenes para el pretratamiento de caldos de fermentación

$$V_1 = \frac{V_2 * C_2}{C_1}$$

- Volumen de etanol:

$$V_1 = \frac{100 \text{ mL} * 1\% \text{ v/v}}{70\% \text{ v/v}} = 1,429 \text{ mL}$$

- Volumen de sulfato dodecil sódico:

$$V_1 = \frac{100 \text{ mL} * 0,03\% \text{ p/v}}{5\% \text{ p/v}} = 0,6 \text{ mL}$$

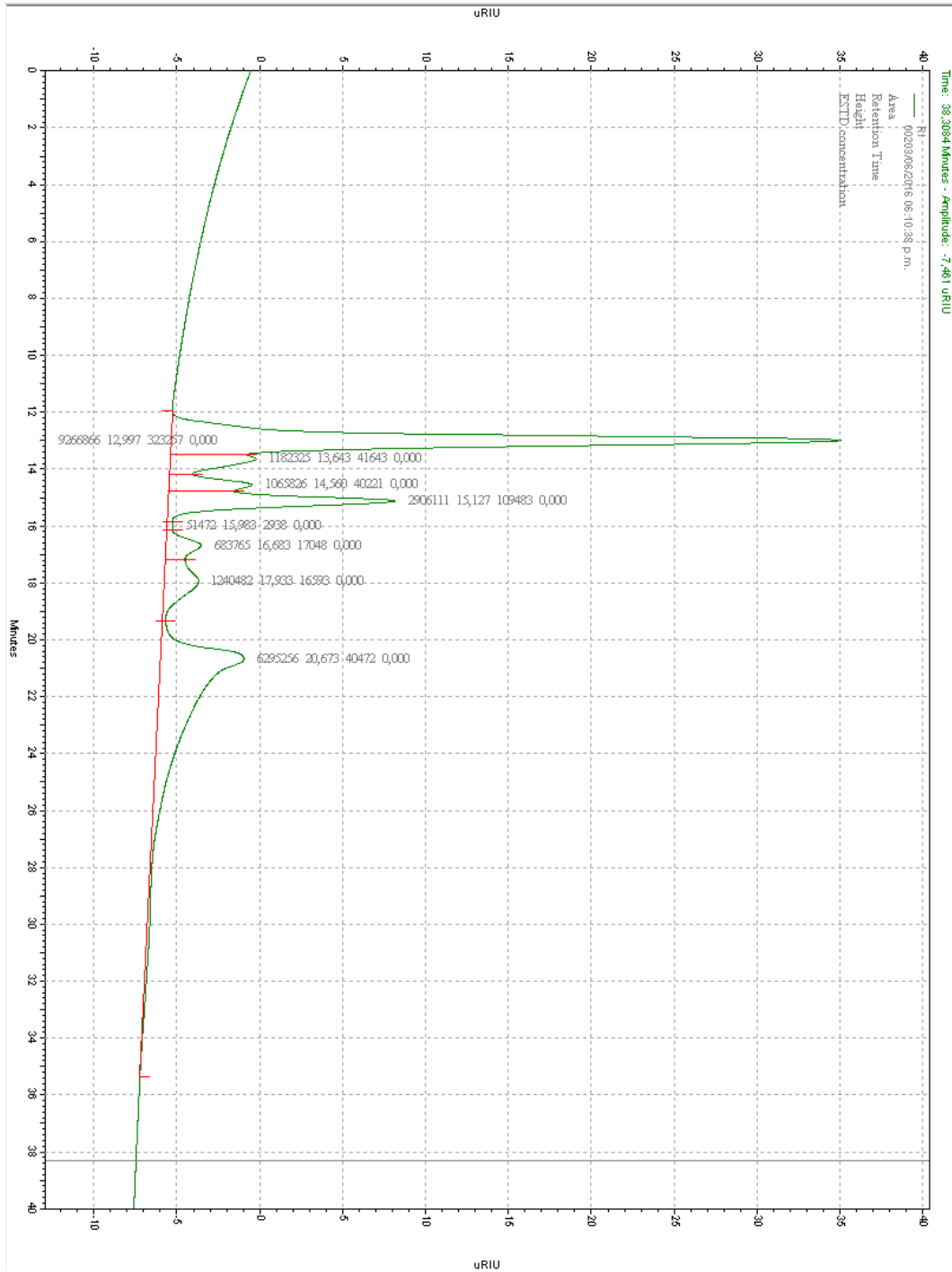
- Masa de cloruro de sodio:

$$M_1 = \frac{0,15 \text{ mol NaCl}}{1 \text{ L}} * \frac{58,44 \text{ g NaCl}}{1 \text{ mol NaCl}} * \frac{1 \text{ L sln}}{1000 \text{ mL sln}} * 100 \text{ mL sln} = 0,877 \text{ g NaCl}$$

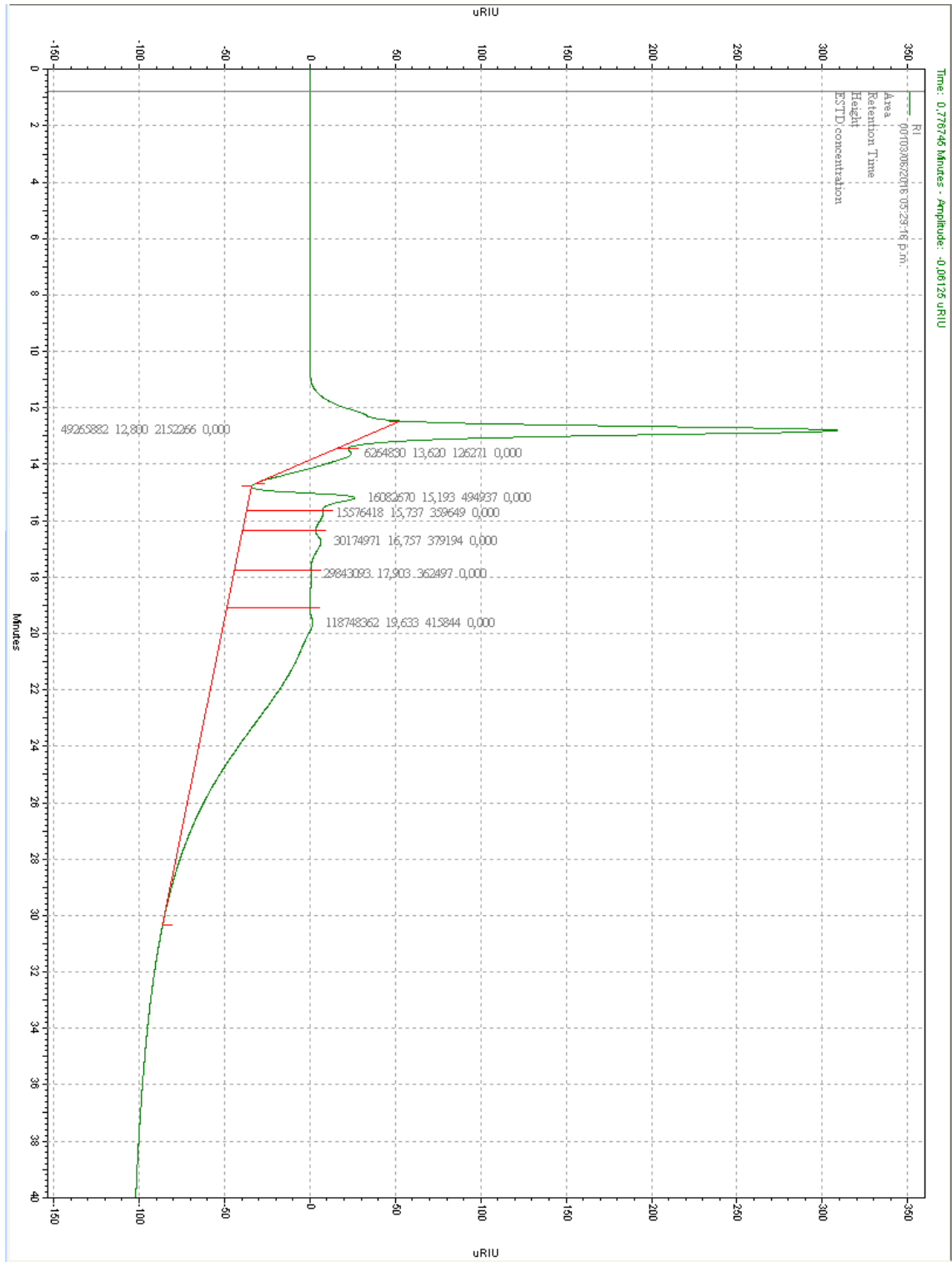
Anexo L

Cartas Cromatografía líquida de alta resolución

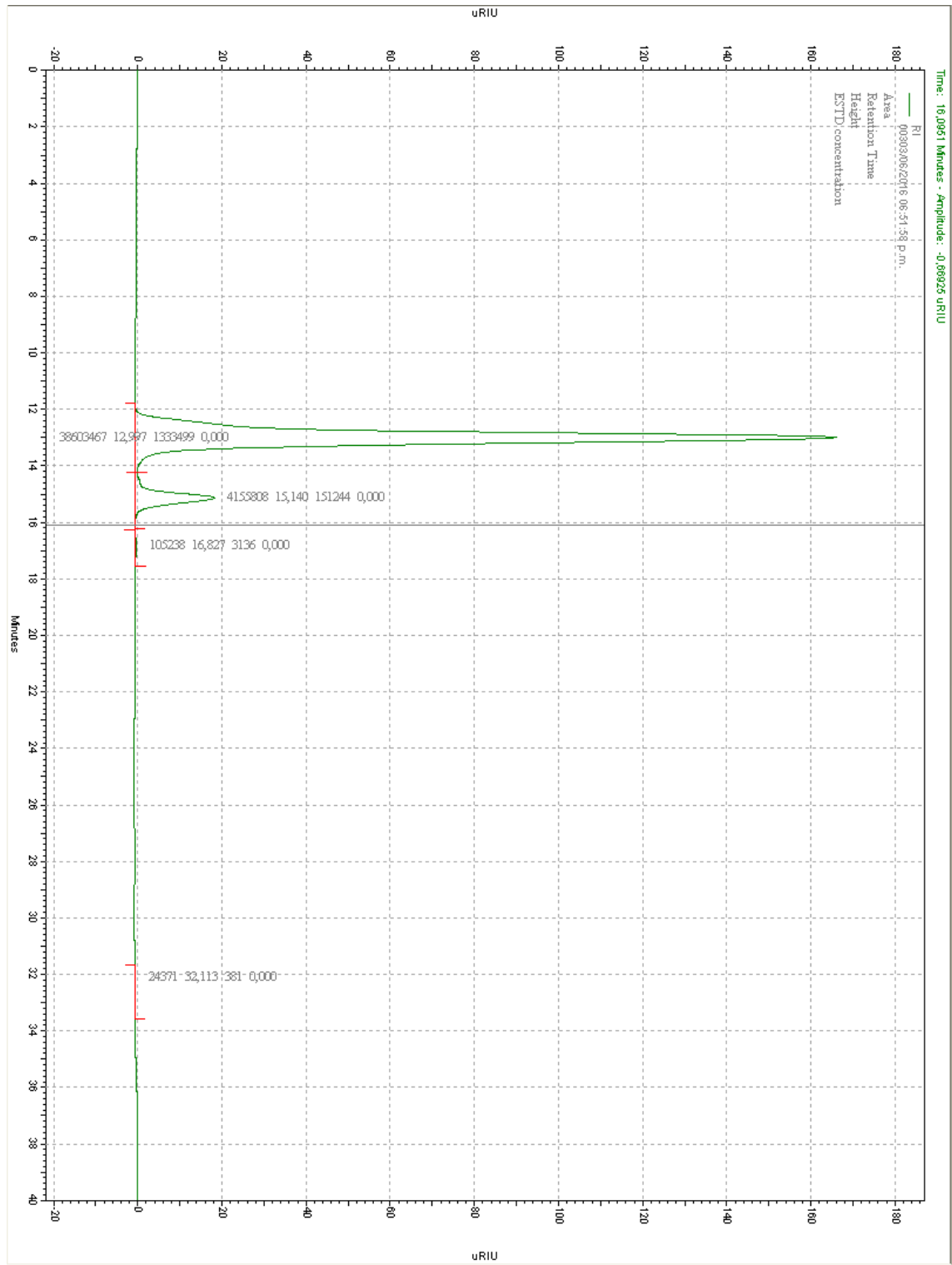
- Muestra BHI 1:



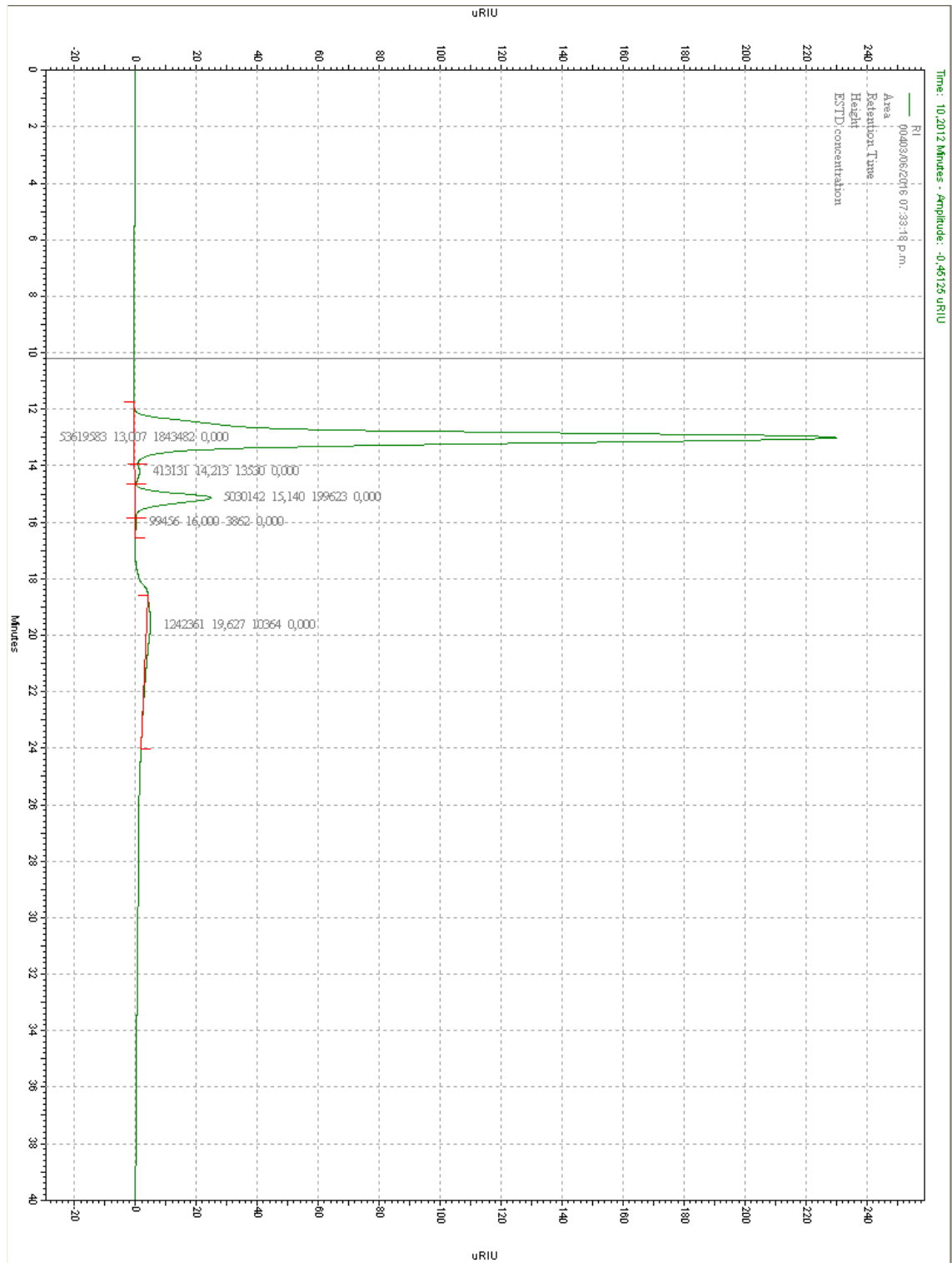
• Muestra BHI 2:



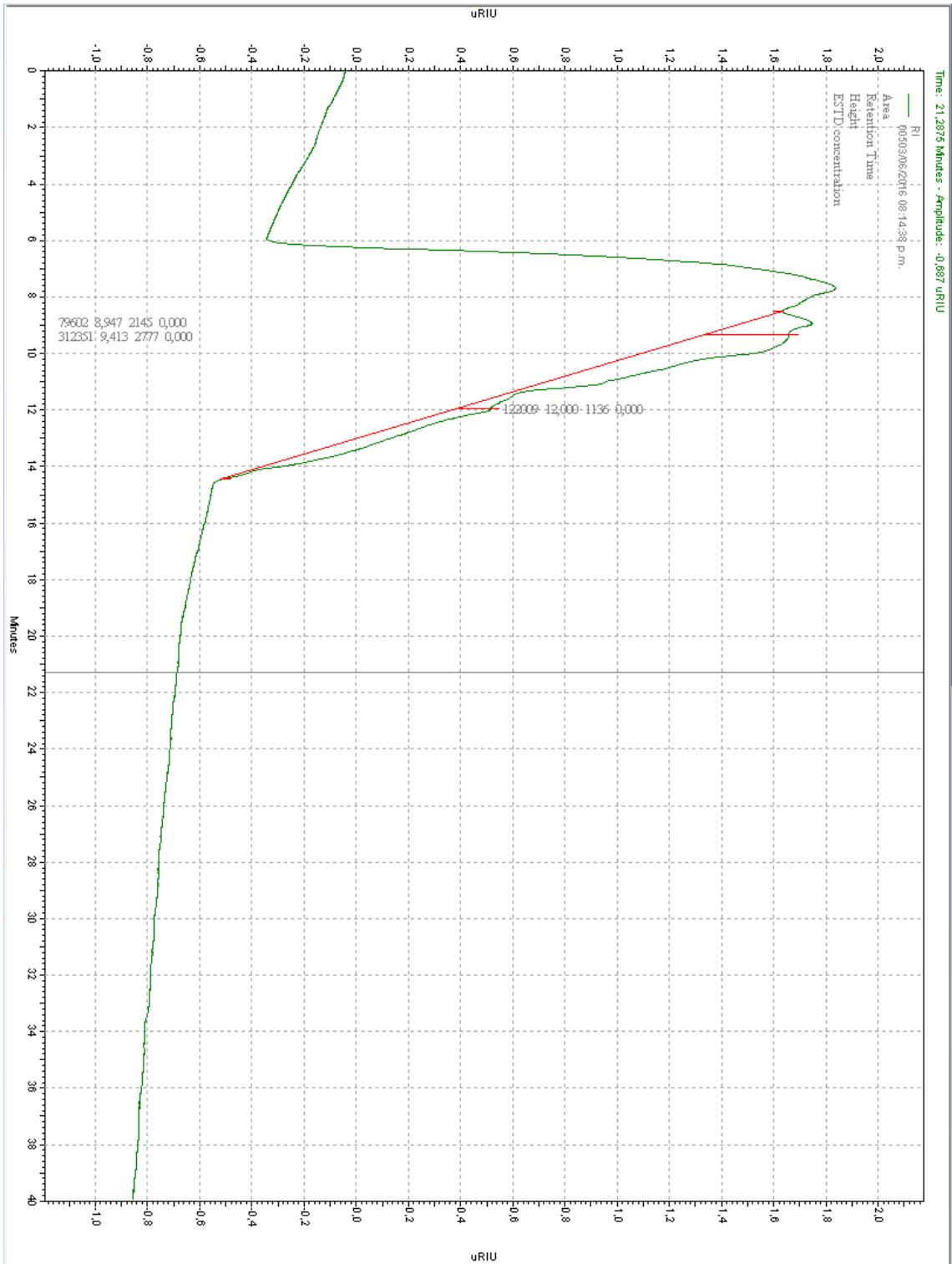
- Muestra suero de leche 1:



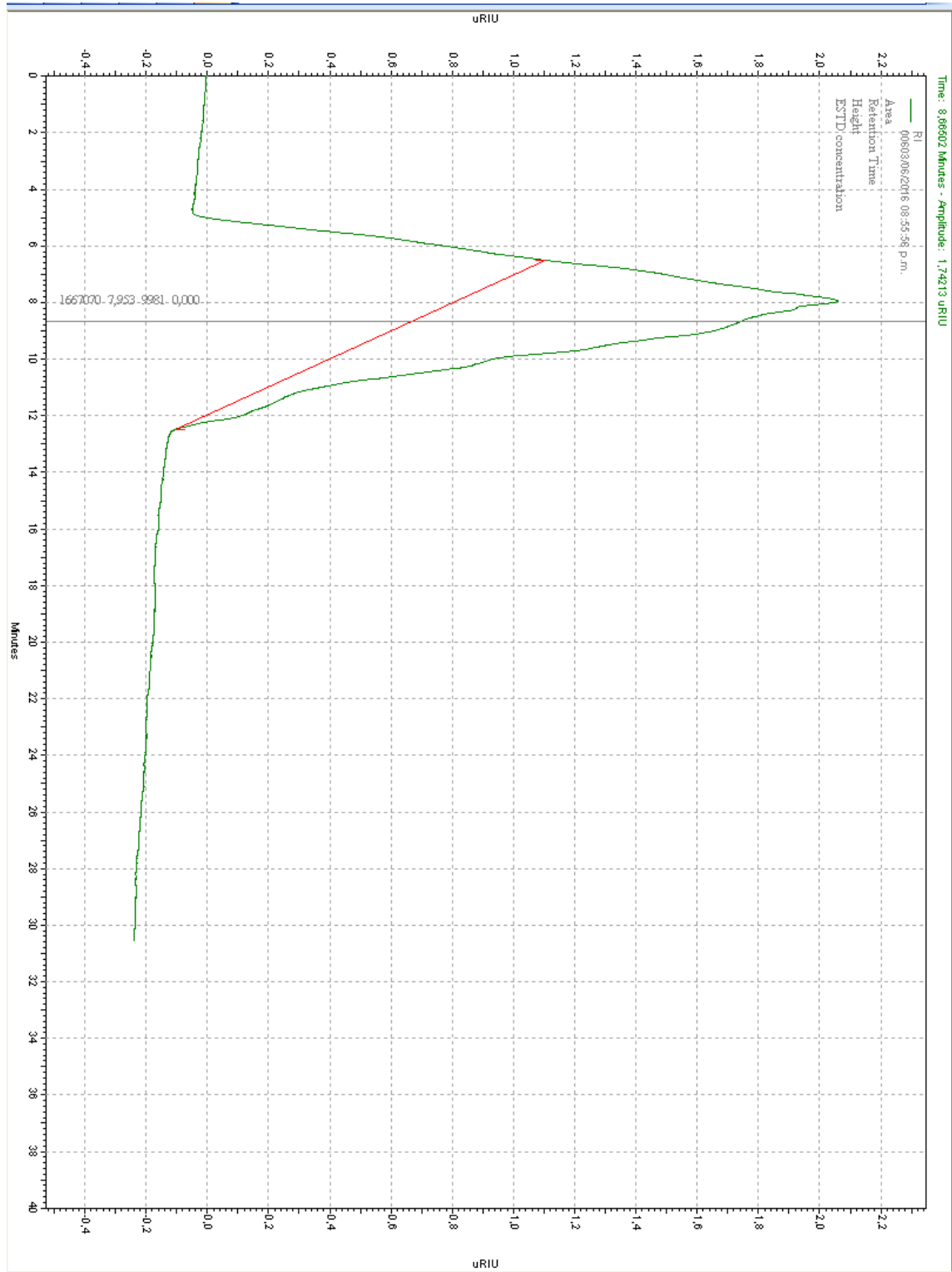
- Muestra suero de leche 2:



- Muestra patrón de ácido hialurónico diluido:



- Muestra patrón de ácido hialurónico:



Anexo M

Reportes obtenidos de Polymath V6.10.

- Modelo de crecimiento microbiano para BHI:

Model: $X = (X_0 * X_m * \exp(u_0 * t)) / (X_m - X_0 + (X_0 * \exp(u_0 * t)))$

Variable	Initial guess	Value	95% confidence
X ₀	7,771	8,108638	1,003553
X _m	12,591	13,41601	3,907093
u ₀	0,017	0,0786346	0,0872742

Nonlinear regression settings

Max # iterations = 64

Precision

R ²	0,9463584
R ² adj	0,9195377
Rmsd	0,1247798
Variance	0,1907326

General

Sample size	7
Model vars	3
Indep vars	1
Iterations	13

Source data points and calculated data points

t	X	X calc	Delta X
1 0	7,771	8,108638	-0,3376375
2 4	9,623	9,077804	0,5451961
3 8	9,887	9,945735	-0,0587347
4 12	10,748	10,69213	0,0558749
5 16	11,114	11,31194	-0,1979429
6 20	11,415	11,81188	-0,3968818
7 24	12,591	12,20574	0,3852585

- Modelo de crecimiento microbiano para suero de leche:

Model: $X = (X_0 * X_m * \exp(u_0 * t)) / (X_m - X_0 + (X_0 * \exp(u_0 * t)))$

Variable	Initial guess	Value	95% confidence
X ₀	8,342	8,426304	0,6053528
X _m	10,477	18,01432	74,56287
u ₀	0,6	0,0279069	0,1279567

Nonlinear regression settings

Max # iterations = 64

Precision

R ²	0,9779473
R ² adj	0,9558945
Rmsd	0,0474893
Variance	0,0281904

General

Sample size	5
Model vars	3
Indep vars	1
Iterations	36

Source data points and calculated data points

	t	X	X calc	Delta X
1	0	8,342	8,426304	-0,0843044
2	4	9,114	8,928222	0,1857776
3	8	9,362	9,430631	-0,0686313
4	12	9,845	9,930413	-0,085413
5	16	10,477	10,42451	0,0524853

- Consumo de sustrato para BHI:

Model: $S = S_0 + (844e-2/Y) - ((844e-2 * \exp(17e-3*t)) * ((1/Y) + (ms/17e-3))) + (844e-2 * ms/17e-3)$

Variable	Initial guess	Value	95% confidence
S ₀	5,06	4,63045	0,5630148
Y	1,2	1,579624	233,3834
ms	0,003	-0,0011937	1,590212

Nonlinear regression settings

Max # iterations = 64

Precision

R ²	0,9207393
R ² adj	0,8811089
Rmsd	0,0884844
Variance	0,0959112

General

Sample size	7
Model vars	3
Indep vars	1
Iterations	4

Source data points and calculated data points

t	S	S calc	Delta S
1 0	5,06	4,63045	0,4295497
2 4	4,21	4,296188	-0,0861881
3 8	3,62	3,938405	-0,3184054
4 12	3,33	3,555447	-0,2254472
5 16	3,1	3,145542	-0,0455421
6 20	2,77	2,706794	0,0632061
7 24	2,42	2,237173	0,182827

- Consumo de sustrato para BHI:

Model: $S = S_0 - \frac{(10879e^{-2t} \exp(786e^{-4t}))}{(Y^*(13416e^{-3} - 8109e^{-3} + (8109e^{-3} \exp(786e^{-4t}))))} + (8109e^{-3}/Y) - \frac{(13416e^{-3} ms / 786e^{-4}) * \ln((13416e^{-3} - 8109e^{-3} + (8109e^{-3} \exp(786e^{-4t}))))}{13416e^{-3}}$

Variable	Initial guess	Value	95% confidence
S ₀	5,06	4,949284	0,3440045
Y	0,7	1,344015	0,9544119
ms	0,008	-0,002465	0,0086339

Nonlinear regression settings
Max # iterations = 64

Precision

R ²	0,9834455
R ² adj	0,9751682
Rmsd	0,0404386
Variance	0,0200321

General

Sample size	7
Model vars	3
Indep vars	1
Iterations	6

Source data points and calculated data points

t	S	S calc	Delta S
1 0	5,06	4,949303	0,110697
2 4	4,21	4,313333	-0,1033329
3 8	3,62	3,761695	-0,1416951
4 12	3,33	3,30837	0,0216301
5 16	3,1	2,95587	0,1441296
6 20	2,77	2,698009	0,071991
7 24	2,42	2,52342	-0,1034198

- Consumo de sustrato para suero de leche:

Model: $S = S_0 - \frac{(15179e^{-2t} \exp(279e^{-4t}))}{(Y^*(18014e^{-3} - 8426e^{-3} + (8426e^{-3} \exp(279e^{-4t}))))} + (8426e^{-3}/Y) - \frac{(18014e^{-3} ms / 279e^{-4}) * \ln((18014e^{-3} - 8426e^{-3} + (8426e^{-3} \exp(279e^{-4t}))))}{18014e^{-3}}$

Variable	Initial guess	Value	95% confidence
S ₀	69,3	68,84711	3,669761
Y	0,15	0,0772524	0,4288997
ms	0,01	-0,0795298	0,9519335

Nonlinear regression settings
Max # iterations = 64

Precision

R ²	0,9864366
R ² adj	0,9728732
Rmsd	0,2574503
Variance	0,828508

General

Sample size	5
Model vars	3
Indep vars	1
Iterations	46

Source data points and calculated data points

t	S	S calc	Delta S
1 0	69,3	68,84421	0,4557864
2 4	64,1	65,10888	-1,008877
3 8	61,9	61,52696	0,373043
4 12	58,6	58,13844	0,461556
5 16	54,7	54,98151	-0,2815084

- Consumo de sustrato para suero de leche:

Model: $S = S_0 + (845e-2/Y) - ((845e-2 * \exp(133e-4 * t)) * ((1/Y) + (ms/133e-4))) + (845e-2 * ms/133e-4)$

Variable	Initial guess	Value	95% confidence
S ₀	69,3	68,46341	3,386759
Y	0,15	0,1557923	28,33824
ms	0,01	0,006591	15,53016

Nonlinear regression settings

Max # iterations = 64

Precision

R ²	0,9824803
R ² adj	0,9649605
Rmsd	0,2925987
Variance	1,070175

General

Sample size	5
Model vars	3
Indep vars	1
Iterations	4

Source data points and calculated data points

t	S	S calc	Delta S
1 0	69,3	68,46341	0,8365917
2 4	64,1	65,27096	-1,170959
3 8	61,9	61,90407	-0,0040727
4 12	58,6	58,35322	0,2467823
5 16	54,7	54,60834	0,0916579

Anexo N

Protocolo prueba Carbazol para cuantificación de ácido hialurónico

La prueba es basada en la reacción de ácido urónico con Carbazol que forman compuestos que generan color. ⁶⁸

Para cuantificar ácido hialurónico producido a partir de una fermentación microbiana es necesario realizar un pretratamiento para acondicionar la muestra y obtener resultados correctos y coherentes en las pruebas.

Pretratamiento:

Con el fin de lisar las células y evitar que continúen con la actividad metabólica se adiciona etanol y se calcula su cantidad utilizando la ecuación $V_1 = \frac{V_2 * C_2}{C_1}$.

Como el ácido hialurónico esta encapsulado en las bacterias es necesario adicionar un surfactante para poder desprenderlo, el surfactante puede ser Sulfato dodecil sódico o cloruro de sodio y determinando la cantidad basándose en la ecuación $V_1 = \frac{V_2 * C_2}{C_1}$.

Para evitar que las células puedan intervenir en los resultados de las pruebas se realiza una microfiltración (0,2 µm) para eliminar las células.

Es necesario eliminar los azúcares como la glucosa y otros que pueden reaccionar con Carbazol para dar se realiza un lavado a la muestra con un disolvente orgánico al 70% que puede ser acetona.

Una vez lista la muestra se realiza el siguiente protocolo. ⁶⁹

Colocar en un tubo de ensayo:

5 mL de la solución de Tetraborato de sodio 0.025M en ácido sulfúrico concentrado.

1 mL de la solución problema

Mezclar y calentar en baño de agua hirviente por 10 min.

Añadir 0.2 mL de Carbazol 0.125% en etanol absoluto, agitar y dejar en el baño durante 5 min más.

Dejar enfriar y leer en el espectrofotómetro a 530 nm.

⁶⁸ JUNG-MIN, Song ,JONG-HYUNK, Im y JAE-HOON, Kang. A simple method for hyaluronic acid quantification in culture broth.

⁶⁹ Universidad Nacional Autónoma de México. Laboratorio de Alimentos I. Procedimientos.

Ajustar previamente con un blanco.

La concentración se calcula a partir de una curva patrón realizada de la misma forma con ácido hialurónico patrón en concentraciones de 4 a 40 $\mu\text{g/mL}$.