

Producción de ácido hialurónico con residuos orgánicos como un producto de valor agregado para integrar una biorrefinería tipo HMZS que procesa residuos sólidos urbanos

Guadalupe Pérez-Morales * y Héctor Mario Poggi-Varaldo

Grupo de Biotecnología Ambiental y Energías Renovables, Depto. de Biotecnología y Bioingeniería, Laboratorio 33 y 34, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Ciudad de México, México.

* Autor de correspondencia: guadalupe.perez@cinvestav.mx; Tel.: 5557473800 ext. 4321.

Desarrollo Sustentable (Gestión y aprovechamiento de residuos sólidos). **Ponencia Presencial.**

Recibido: 31 de agosto de 2023

Aceptado: 5 de octubre de 2023

Publicado: 23 de noviembre de 2023

Resumen: Las biorrefinerías (BRF) que procesan residuos sólidos urbanos con una configuración “HMZS” tienen las etapas de producción: Biohidrógeno (H), Metano (M), enzimas de interés industrial (Z) y licores sacarificados (S), en esta última etapa se propone el aprovechamiento los licores sacarificados como sustrato para la producción de ácido hialurónico (AH). En este trabajo se elaboró una revisión crítica del perfil de producción microbiana de AH y la utilización de residuos orgánicos como sustrato para identificar el proceso de producción de AH que pueda adaptarse en la etapa S de la BRF-HMZS. En la producción microbiana de AH se utilizan cepas de *Streptococcus zooepidemicus* que naturalmente producen AH y alcanza concentraciones de 6.9 g/L, sin embargo, debido a la patogenicidad de dichas bacterias se han desarrollado bacterias y hongos recombinantes que son inocuos y mediante transformación genética alcanzan concentraciones de 28.7 g/L. Hasta ahora la información sobre residuos orgánicos como sustrato en la producción de AH es muy escasa y se ha reportado el uso de estos sustratos para *Streptococcus zooepidemicus* únicamente. Los tipos de residuos orgánicos que se han explorado son savia de palma, melazas de caña, licor de maíz fermentado y almidón como la fuente de carbono (C). Este último ha mostrado la concentración de AH de 6.7 g/L mientras que para proveer la fuente de nitrógeno (N) se ha explorado la proteína de soya, residuos de pescado y lana de oveja que han alcanzado concentraciones de 4.0 g/L. Finalmente, la evaluación económica ha mostrado menores costos de producción de AH cuando se utilizan los residuos orgánicos como fuentes de C y/o N en comparación con las fuentes de C y N convencionales. La producción microbiana de AH aprovechando los licores sacarificados proveería de un producto de alto valor agregado para dar sostenibilidad ambiental y económica a las BRF-HMZS.

Palabras clave: ácido hialurónico; residuos sólidos urbanos; biorrefinerías, sostenibilidad.

Production of hyaluronic acid as a value-added product from organic waste to integrate an HMZS-type biorefinery that processes municipal solid waste.

Abstract: Biorefineries (BRF) that process municipal solid waste with a “HMZS” configuration are composed of the production stages: Biohydrogen (H), Methane (M), enzymes of industrial interest (Z) and saccharified liquors (S). In this last stage, the use of saccharified liquors as a substrate to produce hyaluronic acid (HA) is proposed. In this work, a critical review of the microbial HA production profile and the use of organic waste as a substrate was carried out to identify the HA production process that can be adapted to the S stage in the BRF-HMZS. In the microbial production of HA, strains of *Streptococcus zooepidemicus* that naturally produce HA are used and its production reaches HA concentrations of 6.9 g/L. However, due to the pathogenicity of *Streptococcus* bacteria, innocuous bacteria and fungi recombinants have been developed and through genetic transformation, these recombinant bacteria have shown production of HA in concentrations of 28.7 g/L. Currently, the information on organic residues as substrate in the HA production is very scarce and the use of these substrates has only been reported for *Streptococcus zooepidemicus*. The types of organic waste that have been explored include palm sap, sugarcane molasses and corn steep liquor and starch as the carbon (C) source. This last substrate has shown an HA concentration of 6.7 g/L while to provide the source of nitrogen (N) soy protein, fish residues and sheep wool have been explored, which have reached concentrations of 4.0 g/L. Finally, the economic evaluation has shown lower HA production cost when organic residues are used as sources of C and/or N compared to conventional C and N sources. The microbial production of AH taking advantage of saccharified liquors would provide a product with high added value to achieve environmental and economic sustainability of the BRF-HMZS.

Keywords: hyaluronic acid; municipal solid waste; biorefinery, sustainability

Introducción

La generación de residuos son una consecuencia del crecimiento de la población, la urbanización y el crecimiento económico que hoy en día continúa siendo uno de los más grandes desafíos mundiales. Se estima que la generación

anual de residuos a nivel mundial es de 2,010 millones de toneladas compuesta principalmente por desechos de comida y podas representando el 44% del total, seguido reciclables secos como papel y cartón (17%), plásticos (12%), vidrio (5%) y metal (4%) (Kaza et al., 2018).

A pesar de los métodos de tratamiento de residuos sólidos que han surgido, como la digestión anaerobia, composteo, pirólisis, gasificación e incineración (Kumar et al., 2023; Kundariya et al., 2021; Naveenkumar et al., 2023) la gran mayoría de los países de ingresos medios y bajos realiza la disposición de residuos en tiraderos a cielo abierto y rellenos sanitarios, de acuerdo con los autores Kaza et al. (2018) los métodos de tratamiento y disposición utilizados en América Latina son rellenos sanitarios (52%), basureros a cielo abierto (27%) y en menor proporción en basureros controlados (15%) y reciclaje (4.5%).

Una alternativa que actualmente está llamando fuertemente la atención para el tratamiento de los residuos sólidos urbanos (RSU) es un enfoque de biorrefinerías (BRF) (Duan et al., 2022; Khoshnevisan et al., 2020; Ladakis et al., 2022; Shah et al., 2022). En las BRF se puede dar una valorización a todos los residuos y obtener biocombustibles, biomateriales, productos químicos y alimentos, adicionalmente a la obtención de energía, desde una perspectiva de sustentabilidad, una huella de carbono neutral y sin el conflicto alimentos vs energía (Fava et al., 2015; Poggi-Varaldo et al., 2014).

El Grupo de Biotecnología Ambiental y Energías Renovables (GBAER, por sus siglas en español) del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CIENVESTAV ha diseñado una BRF que procesa los RSU en donde se recuperan los materiales reciclables convencionales como aluminio, hierro y plásticos, y se separa la fracción orgánica la cual es procesada mediante métodos y procesos biotecnológicos obteniendo como productos finales bioenergías y bioproductos (Escamilla-Alvarado et al., 2014; Sotelo-Navarro et al., 2022).

Esta configuración de BRF fue nombrada “HMZS” por las etapas de producción de los productos que se obtienen: biohidrógeno (H), Metano (M), enzimas de interés industrial (Z) y licores sacarificados (S). De acuerdo con los resultados reportados por los autores Escamilla-Alvarado et al. (2017) y Sotelo-Navarro et al. (2022) esta configuración presenta sostenibilidad ambiental en el análisis de ciclo de vida, aunque la sostenibilidad económica es incierta debido a que la información sobre los beneficios económicos es escasa y es un tema en el que falta desarrollo e investigación.

Actualmente, el GBAER está proponiendo la configuración de una BFR del tipo HMZS que incorpore la producción de ácido hialurónico (AH) en la etapa S para aprovechar los licores sacarificados. La importancia de considerar la producción de AH en estas BFR es porque actualmente es un producto de alto valor agregado que de acuerdo con los pronósticos del mercado mundial su valor económico, ya de por sí muy alto, incrementará en el corto y largo plazo (Grand View Research, 2023).

El AH tiene diferentes aplicaciones biomédicas, cosméticas, alimenticias, en salud y medicina (de Oliveira et al., 2016; Qiu et al., 2021; Shikina et al., 2022), es producido por microorganismos que producen AH naturalmente como *Streptococcus* (Rigo et al., 2023; Shikina et al., 2022) y otros que aunque no producen AH naturalmente mediante transformaciones genéticas han mostrado una alta producción de AH (Chahuki et al., 2019; Cheng et al., 2019; Jin et al., 2016), estos microorganismos requieren fundamentalmente de una fuente de carbono (C) y una de nitrógeno (N) para producir de AH.

El objetivo de este trabajo fue elaborar una revisión crítica de la producción microbiana de AH y la utilización de residuos orgánicos como sustrato para identificar el proceso, los tipos de microorganismos que producen AH y su perfil de producción de AH para identificar el proceso que se pueda adaptar en la etapa S de una BRF-HMZS.

Materiales y Métodos

Se realizó una revisión crítica del proceso de producción microbiana de AH, los microorganismos productores de AH, los residuos orgánicos utilizados como sustratos en la producción de AH y el perfil de producción de AH mediante la consulta y análisis de los datos reportados en la bibliografía científica sobre el tema de los últimos 15 años. La bibliografía fue consultada en las principales bases de datos de artículos científicos, tales como, Scopus, ScienceDirect, WebofScience y mediante las palabras de búsqueda: ácido hialurónico, producción de ácido hialurónico,

caracterización de ácido hialurónico. Los datos sobre los métodos, procesos, condiciones de producción y producción de AH se registraron en una base de datos para analizar e identificar los procesos y condiciones de producción que sean compatibles para ser integrados en la etapa S de la BFR-HMZS.

Resultados y Discusión

Producción microbiana de ácido hialurónico con bacterias nativas y recombinantes

El AH es un polisacárido no ramificado, uniformemente repetitivo y lineal compuesto de 2000-25,000 disacáridos de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina unidos alternadamente por enlaces glucosídicos β -1-3 y β -1-4 (Abatangelo et al., 2020; Chong et al., 2005), tiene aplicaciones en oftalmología, reumatología, otorrinolaringología, urología, en cirugías, como sistema de administración de fármacos, su uso más frecuente es en dermatología como relleno dérmico para el tratamiento de las arrugas y para cubrir heridas e ingeniería de tejidos (Abatangelo et al., 2020; Chang et al., 2021; de Oliveira et al., 2016; Rigo et al., 2023). Estas aplicaciones se definen por el peso molecular (MW, por sus siglas en inglés) del AH (Duan et al., 2008; Qiu et al., 2021) que se puede clasificar de tres formas de acuerdo con los autores Abatangelo et al. (2020) y Qiu et al. (2021): (i) AH de alto MW, > 1MDa que tiene acciones antiinflamatorias y se utiliza en la inyección de cavidad articular para restaurar la viscoelasticidad del tejido articular y reparar la degeneración del cartílago, así como en las cirugías plásticas y cosméticas; (ii) AH de bajo MW cuyo valor se encuentra entre 0.01-1 MDa el cual el cuerpo humano lo absorbe mejor mostrando acciones proinflamatorias y promoviendo la remodelación de tejido en el proceso de cicatrización de heridas; (iii) son oligosacáridos, su MW es menor a 0.01 MDa y sus aplicaciones son en el campo alimenticio, cuidado de la salud y medicina.

Existen dos tipos de bacterias que producen AH naturalmente, estas con *Streptococcus* del grupo A y C, y *Pasteurella multocida* (Rigo et al., 2023; Shikina et al., 2022). Los *Streptococcus* son bacterias gram-positivas, no esporulantes, no móviles y son típicamente patógenos a animales, estas bacterias aparecen como células esféricas u ovoides que normalmente están dispuestas en pares o cadenas rodeadas de una extensiva cápsula extracelular que es donde se sintetiza el AH (Chong et al., 2005).

La especie *Streptococcus equi subsp. equi* y predominantemente *S. equi subsp. zooepidemicus* son con los que comúnmente se realiza la producción comercial de AH (Cavalcanti et al., 2020; de Oliveira et al., 2016; Long Liu et al., 2011). El AH es sintetizado por la sintasa AH (HAS por su sigla en inglés) y en *S. equi subsp. zooepidemicus* es sintetizado por el operon *has* compuesto por 5 genes: (i) *hasA*, que codifica la sintasa de hialuronato; (ii) *hasB* que codifica *UDP-glucose dehydrogenase*; (iii) *hasC* que codifica *UDP-glucose pyrophosphorylase*; (iv) *hasD* que codifica *N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase* (glmU); y (v) *hasE* que codifica *glucosa-6-phosphate isomerase* (pgi) (Blank et al., 2008; Crater et al., 1995; Crater y Van de Rijn, 1995; Dougherty y Van de Rijn, 1993). En la Tabla 1 se presenta las cepas de *Streptococcus zooepidemicus*, sus condiciones de cultivo y producción de AH.

En la Tabla 1 se observa que el tipo de reactor utilizado es intermitente con capacidades de 2 a 7 litros en condiciones de 37°C de temperatura, pH de 7, velocidad de agitación que varía de 200 a 600 rpm y aireación de 0.5 a 2 vvm. Se utiliza glucosa o sacarosa como fuente de C y extracto de levadura como fuente de N y se le agregan suplementos como MgSO₄ y K₂HPO₄. De esta manera, las producciones más altas de AH que se reportan son de 5 a 6.6 g/L de alto MW.

Para aumentar la producción de AH en las bacterias de *Streptococcus* se ha reportado estudios sobre la transformación genética en las cepas de *S. zooepidemicus* en las que se ha aplicado mutagénesis con UV que han logrado producciones ligeramente más altas de AH de hasta 6.94 g/L con alto MW. En La Tabla 2 presenta las intervenciones genéticas a *Streptococcus zooepidemicus*, las condiciones de cultivo y producción de AH.

De acuerdo con la Tabla 2, son pocos los estudios reportados con transformaciones genéticas a cepas de *Streptococcus* y en el estudio más reciente los autores Zhang et al. (2023) además de someter la bacteria a mutagénesis, construyeron y amplificaron un plásmido recombinante con lo que dicha cepa alcanzó la producción de AH de 29.38 g/L que es hasta ahora la mayor producción de AH reportada.

Tabla 1. Cepas productoras nativas de ácido hialurónico, condiciones de cultivo, producción y peso molecular.

Cepas	Tipo y capacidad de biorreactor	Condiciones de cultivo	Fuente de C y N	Suplementos (g/L)	Producción (g/L)	Peso molecular (MDa)	Referencias
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batch 2-10 L	Temperatura: 37°C pH: 7 Agitación: 300-400 rpm Aereación: 1-2 vvm	Glucosa o sacarosa: 20-60 Extracto de levadura: 3.2 a 12.5	MgSO ₄ : 0.4 - 1.5 K ₂ HPO ₄ : 0.5 - 2.5 NaCl: 1-2	0.6-5	2.1-3.9	Huang et al. (2006); Rangaswamy y Jain (2008); Huang et al. (2008); Jagannath y Ramachandran (2010)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> WSH-24	Batch 7 L	Temperatura: 37°C pH: 7-8.5 Agitación: 200 rpm Aereación: 0.5 vvm	Sacarosa: 70 Extracto de levadura: 25	MgSO ₄ : 2 K ₂ HPO ₄ : 1.3 Na ₂ HPO ₄ : 6	6.6	-	Liu et al. (2008)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> HA-13-06	Batch 10L	Temperatura: 37°C pH: 7 Agitación: 600 rpm Aereación: 1 vvm	Glucosa: 70 Extracto de levadura: 10	MgSO ₄ : 0.4 K ₂ HPO ₄ : 1.8 Tryptona: 5	4.75	2.46	Liu et al. (2018)

Tabla 2. Cepas productoras nativas de ácido hialurónico con transformaciones genéticas, condiciones de cultivo, producción y peso molecular.

Cepas	Tipo y capacidad de biorreactor	Condiciones de cultivo	Fuente de C y N	Suplementos (g/L)	Producción (g/L)	Peso molecular (MDa)	Referencias
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920 *	Batch 5L	Temperatura: 37°C pH: 7 Agitación: 160-600 rpm Aereación: 0.6 vvm	Glucosa: 40 Extracto de levadura: 10 Polipeptona: 20	MgSO ₄ : 1 K ₂ HPO ₄ : 2.5 NaCl: 2	3.48-3.61	1.22-2.19	Duan et al. (2008)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ID9102 *	Batch 75 L	Temperatura: 36°C pH: 7 Agitación: 120 rpm Aereación: 0.5 vvm	Peptona de caseína: 20 Extracto de levadura: 6	MgSO ₄ K ₂ HPO ₄	6.94	5.9	Im et al. (2009)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920 **	Batch 3L Irradiación de 50-150 s	Temperatura: 37°C pH: 7-7.5 Agitación: 200-600 rpm Aereación: 2 vvm	Glucosa: 80 Extracto de levadura: 6 Peptona: 20	MgSO ₄ : 3 N-acetilglucosamina Fosfatidilcolina	29.38	-	Zhang et al. (2023)

*Mutagénesis por y N-metil.N'-nitro-N-nitroso-guanidine (NTG); **Mutagénesis UV, Construcción y amplificación de un plásmido recombinante utilizando *E.coli* JM109 para producir la hialurinasas SzHYal.

El tipo de biorreactor reportado en estas cepas de *S. zooepidemicus* con mutagénesis es Batch con capacidades del biorreactor de 3 a 5 L, pero sobresale el estudio reportado por Im et al. (2009) que utiliza un reactor de 75 L que es el

mayor tamaño reportado. Cabe señalar que las condiciones de cultivo son similares a las condiciones para las cepas originales presentadas en la Tabla 1.

Debido a la patogenicidad del género *Streptococci*, el capsular de AH es considerado un factor de virulencia por lo que se han estudiado otros microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos clasificados como GRAS (generalmente reconocidas como seguras) que aunque no son productores naturales de AH, consiguen producirlo mediante la transformación genética. Los microorganismos transformados genéticamente se pueden agrupar como bacterias Gram-positivas diferentes a *Streptococcus*, bacterias Gram-negativas y hongos (Shikina et al., 2022). Las intervenciones en estos microorganismos recombinantes han consistido en introducir o expresar uno o varios genes responsables de la producción de AH en *Streptococcus* y/o el bloqueo de rutas metabólicas que desvían la producción de AH a otros compuestos como lactato-acetato. Entre las bacterias Gram-positivas se encuentra *Lactobacillus acidophilus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Streptomyces albulus*, *Synechococcus*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*. En la Tabla 3 se presentan las respectivas transformaciones genéticas de las bacterias, las condiciones de cultivo y la producción AH.

Tabla 3. Bacterias recombinantes para la producción de ácido hialurónico, condiciones de cultivo, producción y peso molecular.

Cepas	Tipo y capacidad de biorreactor	Condiciones de cultivo	Fuente de C y N	Suplementos (g/L)	Producción (g/L)	Peso molecular (MDa)	Referencias
<i>Lactobacillus acidophilus</i> PTCC 1643 *	Batch	Temperatura: 38°C pH: 7 Agitación: 180 rpm Aereación: ND	Sacarosa: 15-30 Extracto de levadura: 3.2	Citrato trisódico: 4.1-5.1 Piruvato: 12	1.61	0.027	Chahuki et al. (2019)
<i>Corynebacterium Glutamicum</i> ATCC913032 **	Batch 300 mL y 5 L	Temperatura: 28°C pH: 7-8.5 Agitación: 200 rpm Aereación: 0.5 vvm	Glucosa: 40 Extracto de levadura o polvo de jarabe de maíz:	MgSO ₄ : 5 K ₂ HPO ₄ : 0.5 KH ₂ PO ₄ : 0.5-1	8.2-28.7	0.96-1.3	Cheng et al. (2016); Cheng et al. (2019); Zheng et al. (2020)
<i>Streptomyces albulus</i> ***	Batch 300 mL	Temperatura: 30°C pH: 6.8 Agitación: 150-500 rpm Aereación: 3.5 vvm	Glucosa: 50 Extracto de levadura: 5	MgSO ₄ : 0.5 KH ₂ PO ₄ : 1.4 NaHPO ₄ : 1.6	3.6	2.20	Yoshimura et al. (2015)
<i>Bacillus subtilis</i> 168, WB 600, 1A751 ****	Batch 3 y 5 L	Temperatura: 37°C pH: 7 Agitación: 200-800 rpm Aereación: 2 vvm	Glucosa o sacarosa: 15-50 Extracto de levadura: 10-20	MgSO ₄ : 1 K ₂ HPO ₄ : 2.5 NaCl: 2	0.146-3.65	0.39-6.97	Jia et al. (2013); Jin et al. (2016); Westbrook et al. (2018); Li et al. (2019)
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000 *****	Batch 2.4 L	Temperatura: 30°C pH: 7 Agitación: 200 rpm Aereación: -	Glucosa: 30 Extracto de levadura: 30	MgSO ₄ : 0.5 K ₂ HPO ₄ : 0.5 KH ₂ PO ₄ : 1.5	0.2-0.7	0.4-2.2	Schulte et al. (2019); Jeeva et al. (2019)

*Coexpresión de hasA y has C ensamblado en pJH181.3; **Síntesis artificial del gen ssehasA/Amplificación del gen glmM con bloqueo de ruta lactato/acetato;*** Refactorización y expresión del gen hasA de S; ****Coexpresión de los genes *tuaD*, *gtaB*, *glmU*, *glmM* y *glmS* / Introducción del gen *pmHAS* de *P. multocida* y amplificación de genes *tuaD*, *gtaD*, *pgi*/ Reducción de la expresión de *pfkA* y *zwf* y la adición de monómeros *GlcUA* y *GlcNac*; *****Expresión de los genes *HAS*/ Expresión de *hasA*, *hasB*, *hasE* y *pgi* de *Streptococcus*; ND: no disponible

En estas bacterias recombinantes, las reacciones de producción también se realizan en biorreactores intermitentes donde los mayores tamaños son de 5L y los menores son 300 mL. Las condiciones de cultivo varían entre las distintas bacterias en temperatura entre 28°C y 38°C mientras que en pH entre 6.8 y 8.5, la velocidad de agitación entre 150 y 800 rpm y la aireación entre 0.5 y 3.5 vvm. Las fuentes de C y N, así como los suplementos son similares que en las cepas de *Streptococcus* utilizando glucosa o sacarosa y nitrógeno, y como suplementos MgSO₄, K₂HPO₄.

En la Tabla 3 se muestra que las cepas de *C. glutamicum* mostraron las más altas producciones de 14.2 y 28.7 g/L que son incluso más altas que *streptococcus*. Con respecto al MW, estas bacterias recombinantes producen AH de los tres tipos de MW: de alto MW, de bajo MW y oligosacáridos.

La producción de AH con bacterias Gram-negativas han sido menos exploradas, entre éstas se encuentran *Escherichia coli* y *Agrobacterium sp.* aunque estas han mostrado muy bajas producciones de AH como se observa en la Tabla 4 en la que se presentan los tipos de cepas y producciones de estas bacterias Gram-negativas.

Tabla 4. Cepas de bacterias Gram-negativas recombinantes, condiciones de cultivo, producción y peso molecular de AH.

Cepas	Tipo y capacidad de biorreactor	Condiciones de cultivo	Fuente de C y N	Suplementos (g/L)	Producción (g/L)	Peso molecular (MDa)	Referencias
<i>Escherichia Coli</i> BL21, K12W3110, Top 10 *	Batch 250 y 500 mL	Temperatura: 37°C pH: 7-7.5 Agitación: 200 rpm Aereación: ND	Glucosa: 3-50 Extracto de levadura: 5	K ₂ HPO ₄ : 2-2.5 Isopropil β-D-1- thiogalactopyra noiside/ Chloramfenicol	0.08-0.532	0.001-34.6	Lai y Teo (2019); Woo et al. (2019) Yu y Stephanopoulos (2008)
<i>Agrobacterium</i> ATCC 31749 **	Batch 250 mL	Temperatura: 30°C pH: ND Agitación: 250 rpm Aereación: ND	Sacarosa: 125 mM N-acetylglu- cosamine: 50 mM	MgSO ₄ : 20 K ₂ HPO ₄ : 30 mM Ácido casamino: 5	0.30	1.56	Mao y Chen (2007)

* Clonación del gen hasA de *S. zoopidemicus*/ Introducción del gen hasA de *S. zoopidemicus* y bloqueo de los genes galR y gal S, zwf y pfkA/ Expresión de los genes ugd, galF y glmU de una sepa mutante de *S. pyogenes*; ** Expresión del gen pmHas de *Pasteurella multocida*; ND: no disponible.

En estas bacterias gram-negativas se han estudiado únicamente en pequeños biorreactores de capacidad (de 250 mL y 500 mL), la temperatura en los experimentos con *E. coli* es 37°C. En experimentos con *Agrobacterium sp.* la temperatura es de 30°C, el pH se mantiene en 7 pero no se registra la aplicación de aireación. Al igual que las demás bacterias descritas anteriormente, el cultivo consiste en la adición de glucosa y extracto de levadura como fuentes de C y N con los suplementos de MgSO₄, K₂HPO₄. Estas cepas presentan bajas productividades de AH (< 1 g/L de AH) y pueden producir AH de muy bajo o muy alto MW.

Finalmente, los hongos son otros microorganismos poco explorados para la producción de AH. Entre estos se encuentra *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris* cuya transformación genética también consiste en la introducción de los genes sintetizadores de AH de bacterias productoras naturales. En la Tabla 5 se presentan los tipos de hongos, las condiciones de cultivo y las producciones de AH. Como se puede observar, el biorreactor es tipo intermitente con capacidad de hasta de 2.5L, en ambos hongos la temperatura de proceso es 30°C. El pH y la velocidad de agitación son menores en *K. lactis* (pH de 6, 200 rpm) que en *P. pastoris* (pH 7, 500 rpm). En ambos microorganismos las fuentes principales de C y N son glucosa y extracto de levadura y con suplementos principales MgSO₄, K₂HPO₄ y NaCl, aunque en estos hongos se adicionan aminoácidos como glutamina y ácido glutámico.

La producción de AH en estos hongos es baja como con rendimiento de 1.89 g/L en *K. lactis* y 0.6-1.7 en *P. pastoris* y en ambos el AH es de alto MW con valor de 2.09 MDa en *K. lactis* y 1.2-2.5 MDa en *P. pastoris*.

Tabla 5. Tipos de hongos, condiciones de cultivo, producción y peso molecular de ácido hialurónico en cepas recombinantes

Cepas	Tipo y capacidad de biorreactor	Condiciones de cultivo	Fuente de C y N	Suplementos (g/L)	Producción (g/L)	Peso molecular (MDa)	Referencias
<i>Kluyveromyces lactis</i> GG799*	Batch 1.3 L	Temperatura: 30°C pH: 6 Agitación: 200 rpm Aereación: 2 vvm	Glucosa: 40 Extracto de levadura: 7.5	MgSO ₄ : 0.9 K ₂ HPO ₄ : 2.5 NaCl: 5 Glutamine: 0.6	1.89	2.09	Gomes et al. (2019)
<i>Pichia pastoris</i> **	Batch 2.5 L	Temperatura: 30°C pH: 7 Agitación: 500 rpm Aereación: 0.7 vvm	Glucosa: 40 Extracto de levadura: 7.5	MgSO ₄ : 0.5 K ₂ HPO ₄ : 2.5 NaCl: 5 Glutamine: 0.2	0.6-1.7	1.2-2.5	Jeong et al. (2014)

* Introducción del gen hasB de *Xenopus laevis* y el gen has A de *P. multocida*; ** Expresión de vectores de xhasA2 y xhasB de *X. laevis*

Residuos orgánicos como sustrato para la producción de ácido hialurónico

En la producción de AH, las dos condiciones vitales para el crecimiento de las bacterias u hongos son las fuentes de C y N que, en todos los casos revisados en la sección anterior, son la glucosa o sacarosa como fuente de C y extracto de levadura como fuente de N. Son pocos los estudios que han explorado la utilización de residuos orgánicos como la fuente alternativa de C y/o N. En la Tabla 6 se presenta los diferentes estudios donde se ha explorado el aprovechamiento de ciertos residuos orgánicos como fuente de C para la producción de AH, los tipos de cepas microbiana y sus producciones de AH.

Tabla 6. Cepas microbianas y residuos orgánicos como fuentes de carbono utilizados en la producción de ácido hialurónico

Cepas	Tipo y capacidad de biorreactor	Condiciones de cultivo	Fuente de C alternativa	Fuente de N (g/L)	Suplementos (g/L)	Producción (g/L)	Peso molecular (MDa)	Referencias
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> NJUST01	Batch 500 mL	Temperatura: 37°C pH: 7 Agitación: 220 rpm Aireación: ND	Almidón: 5% Glucosa: 0.3%	Extracto de levadura: 5% Peptona: 0.15%	MgSO ₄ : 0.15% K ₂ HPO ₄ : 0.25%	6.7	-	Zhang et al. (2006)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batch 250 mL	Temperatura: 37°C pH: 7 Agitación: 150 rpm Aireación: 1 vvm	Jugo de manzana cajú: 950 L/L (45 g/L de glucosa)	Extracto de levadura: 54 (5.8 g/L de N)	MgSO ₄ : 1 K ₂ SO ₄ : 1.3	0.89	0.018	Pires et al. (2010)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920	FedBatch 4.5 L	Temperatura: 37°C pH: 8 Agitación: 100 rpm Aireación: 0.5 vvm	Melazas de caña: 85.35 g/L de azúcares totales	Extracto de levadura: 50	MgSO ₄ : 1.5 KH ₂ PO ₄ : 2.5 NaCl: 2.0	2.83	0.001	Pan et al. (2017)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> MTCC 3523	Batch 3.5 L	Temperatura: 37°C pH: 7 Agitación: 200 rpm Aireación: 1 vvm	Sacarosa de palma: 5 g/L	Extracto de levadura: 2.5	MgSO ₄ : 0.25 Ácido ascórbico: 0.5	0.50	0.93-0.96	Rohit et al. (2018)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 39920	Batch 5 L	Temperatura: 37°C pH: 8 Agitación: 100-300 rpm Aireación: 0.5 vvm	Melazas de caña: 30 g/L de azúcares totales	Extracto de levadura: 30	MgSO ₄ : 1.5 K ₂ HPO ₄ : 2.5 NaCl: 2 Glutamina: 8	2.55	-	Duffeck et al. (2020)

ND: no disponible

En estos estudios que utilizan residuos orgánicos como la fuente de C reportados en la Tabla 6, las bacterias utilizadas son *Streptococcus zoopedemicus* que producen AH naturalmente en donde el tipo de biorreactor es intermitente y la capacidad más alta es de 5L. Las condiciones del cultivo son similares a las reportadas en la Tabla 1, temperatura de 37°C, pH entre 7 y 8, baja agitación entre 100 y 300, aireación de 0.5 a 1 vvm. Los residuos orgánicos utilizados como la fuente alternativa de C que hasta ahora se ha reportado son almidón, jugo de manzana cajú, savia de palma y melazas de caña. En varios de estos casos se complementa con la adición de glucosa industrial. Para la fuente de N se sigue utilizando extracto de levadura, así como la adición de $MgSO_4$, KH_2PO_4 como suplementos. En general se reportan bajas producciones de AH y con bajo MW, únicamente en el caso donde se utiliza almidón como fuente de C y se complementa con glucosa y en la fuente de N se utiliza extracto de levadura complementado con peptona se alcanza la producción de AH más alta de 6.7 g/L, que es de la magnitud similar que en las cepas de *Streptococcus* con las fuentes de C y N convencionales.

Los estudios que han explorado el uso de residuos orgánicos como fuente de N son también muy escasos, estos se muestran en la Tabla 7. Las cepas utilizadas en los estudios reportados en la Tabla 7 son *Streptococcus zooepidemicus* en biorreactor intermitente y hasta 5 L de capacidad. Las condiciones de temperatura se mantienen en 37°C pero el pH es ligeramente más bajo (6.7) y la agitación en más alta (500 rpm) en comparación a los estudios donde se utiliza una fuente alternativa de C. Las fuentes alternativas de nitrógeno estudiadas han sido peptona obtenida de las vísceras de pescado, de suero de queso y de licor de maíz fermentado en donde también se adicionan pequeñas cantidades de las fuentes de N convencionales (extracto de levadura) y se mantiene la fuente convencional de C (glucosa o sacarosa), así como los suplementos de $MgSO_4$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 . Es estos casos producción de AH llega a 4 g/L y el AH es de alto MW.

Tabla 7. Cepas microbianas y residuos orgánicos como fuentes de nitrógeno utilizados en la producción de ácido hialurónico

Cepas	Tipo y capacidad de biorreactor	Condiciones de cultivo	Fuente de C (g/L)	Fuente alternativa de N	Suplementos (g/L)	Producción (g/L)	Peso molecular (MDa)	Referencias
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 35246	Batch 2 L	Temperatura: 37°C pH: 6.7 Agitación: 500 rpm Aireación: -	Glucosa: 20	Peptona de vísceras de pez: 5-23 g/L	$MgSO_4$: 0.5 K_2HPO_4 : 2.0 KH_2PO_4 : 2.0 $(NH_4)_2SO_4$: 0.5	2.26-2.32	1.8	Vázquez et al. (2015)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 35246	Batch 5 L	Temperatura: 37°C pH: 6.7 Agitación: 500 rpm Aireación: 1 vvm	Glucosa: 50 Lactosa: 50	Suero de queso: 2.1 Extracto de levadura: 5 g/L	$MgSO_4$: 0.5 K_2HPO_4 : 0.5 KH_2PO_4 : 2.0 $(NH_4)_2SO_4$: 0.5	4.0	>3.00	Amado et al. (2016)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 35246	FedBatch 0.75 L	Temperatura: 37°C pH: 6.7 Agitación: 500 rpm Aireación: 1 vvm	Glucosa: 50	Licor de maíz fermentado: 10% v/v Extracto de levadura: 5 g/L	$MgSO_4$: 0.5 K_2HPO_4 : 0.5 KH_2PO_4 : 2.0 $(NH_4)_2SO_4$: 0.5	3.48	3.8	Amado et al. (2017)

Finalmente, los estudios que han evaluado al mismo tiempo el uso de una fuente alternativa de C y de N se presentan en la Tabla 8 con lo que se observa que en todos los casos donde se evalúan fuentes alternativas de C y/o N se utilizan cepas productoras naturales de AH de *Streptococcus zooepidemicus* sin transformaciones genéticas y en condiciones de cultivo similares entre todos los estudios reportados con *Streptococcus zooepidemicus*.

Como se observa en la Tabla 8, las producciones de AH en estos casos cuando se utiliza una fuente alternativa de C y N al mismo tiempo muestran producciones de AH entre 33 a 50% de la máxima encontrada para *Streptococcus* con fuentes de C y N convencionales. Arslan y Aydogan (2021) reportaron la producción más alta de este tipo de producciones de AH alcanzando 3.54 g/L de AH (Tabla 8) y Vazquez et al. (2010) reportaron que el AH fue de alto MW. Las producciones de AH mostradas por cualquiera de las tres formas de utilizar residuos orgánicos como fuentes de C y N son en general similares, con excepción a cuando se utiliza almidón con glucosa. Se observa diferencias en el MW

del AH dado que en los estudios donde únicamente se utiliza la fuente alternativa de C el AH es de bajo MW (típicamente de 0.001 a 0.98 MDa) mientras que el AH es de alto MW (1.8 a 3.8 MDa) cuando se utiliza únicamente la fuente alternativa de N o ambas fuentes alternativas de C y N.

Tabla 8. Cepas microbianas y residuos orgánicos como fuentes de carbono y nitrógeno utilizados en la producción de ácido hialurónico

Cepas	Tipo y capacidad de biorreactor	Condiciones de cultivo	Fuente alternativa de C (g/L)	Fuente alternativa de N (g/L)	Suplementos (g/L)	Producción (g/L)	Peso molecular (MDa)	Referencias
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 35246	Batch 2 L	Temperatura: 37°C pH: 6.7 Agitación: 500 rpm Aireación: -	Aguas residuales del procesamiento de mejillones: 50	Peptona de residuos de atún: 8 Extracto de levadura: 5	MgSO ₄ : 0.5 K ₂ HPO ₄ : 2.0 KH ₂ PO ₄ : 2.0 (NH ₄) ₂ SO ₄ : 0.5	2.46	2.5	Vazquez et al. (2010)
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 35246	Batch 250 mL	Temperatura: 37°C pH: 8 Agitación: 200 rpm Aireación: -	Melazas de caña: 5	Peptona de lana de oveja: 12	MgSO ₄ K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	3.54	-	Arslan y Aydogan (2021)

Es importante resaltar que en los estudios reportados es este trabajo, la producción de AH se realiza en tamaños de biorreactores de máximo de 10 L de capacidad, con excepción al estudio reportado por Im et al. (2009) que es el único que analiza la producción de AH a mayor escala un biorreactor de 75L, por lo que se identifica que en estos estudios hace falta analizar dicha producción microbiana de AH a escala industrial para verificar que las condiciones del cultivo y relaciones de fuente de N y C, así como suplementos presentan las producciones reportadas a pequeña escala.

Aspectos económicos de la producción del ácido hialurónico

El mercado mundial del AH tiene una valoración económica muy alta. De acuerdo con el reporte publicado por Grand View Research (2023) en año 2022 el valor del mercado estaba valuado en USD 9,400 millones y con una tendencia al alza manteniendo una tasa media de crecimiento anual de 7.58% y el pronóstico al año 2030 prevé que su valor llegará a USD 16,800 millones. El precio del AH depende de la aplicación y la pureza requeridos, se ha señalado que el precio de venta varía entre USD 1,000 a 5,000 por kg (de Oliveira et al., 2016) y entre € 1,500 a 4,000 por kg (Ferreira et al., 2021); ambas estimaciones presentan precios de venta atractivos, sin embargo, es importante conocer el costo de producción del AH para determinar el valor agregado de este bioproducto.

Son escasos los estudios reportados donde se evalúa el costo de producción de AH. Amado et al. (2016) y Amado et al. (2017) sugieren que el uso de suero de queso o de licor fermentado de maíz como fuente alternativa de N tiene un menor costo que las peptonas comerciales como la triptona con lo cual los residuos orgánicos son una alternativa de bajo costo para la producción de AH además de que puede ser una estrategia de revalorizar dichos residuos. En el estudio de los autores Amado et al. (2016) se estimó el costo de producción del AH con base en los costos comerciales de las peptonas y azúcares, reportaron que el costo de producción de AH es hasta 72% más bajo cuando se utilizan suero de queso que con peptonas comerciales, el costo reportado del AH producido con suero de queso como fuente de N costo fue de 0.27 €/g mientras que el AH producido con peptonas comerciales tuvo un costo de 0.91 €/g de AH.

Los autores Rohit et al. (2018) evaluaron la viabilidad técnico-económica de la producción microbiana de AH mediante la estimación del rendimiento económico en donde encontraron que el uso de azúcar de palma de palmira mostró un mejor rendimiento económico que el uso de glucosa, y que la combinación de soya de peptona y azúcar de palma de palmira presentó el más alto rendimiento económico obteniendo USD 3.02 de AH por cada USD de nutrientes invertido. Resultados similares en el uso de residuos orgánicos como sustratos en la producción AH se reportaron en el estudio de los autores Vazquez et al. (2010) quienes compararon el costo de producción de AH usando residuos marinos, como fuente de C y N, con los correspondientes costos usando glucosa-extracto de levadura. En efecto, en el segundo caso

el costo fue 2.4 €/g de AH, mientras en el primer caso (aguas residuales del procesamiento de mejillones como fuente C y peptonas de atún como fuente de N) el costo fue de tan solo 1.4 €/g de AH.

Ferreira et al. (2021) simularon el proceso de producción de AH con cepas de *Streptococcus zooepidemicus* para realizar la evaluación económica del proceso considerando una producción de AH de 5 g/L y una producción anual de 20 MT en biorreactores fedbatch en la cual consideran costos de inversión y operación que incluyen el costo de instalación, costo de las materia primas como la glucosa y el extracto de levadura, costo de materiales y equipo, así como el costo del salario de los trabajadores. De esta manera estimaron un costo unitario de producción entre USD 1,691 y 1,449 por kg de AH, una Tasa Interna de Retorno de 42.5% a 53.1% y un Periodo de Recuperación de la Inversión de 2.35 a 1.88 años. Estos resultados son muy alentadores y confirman la viabilidad económica de la producción de AH. En dicho estudio, los mayores costos son en el mantenimiento de la planta y depreciación seguido por los costos de los salarios de los trabajadores, de los costos de los consumibles y en cuarto lugar el costo de la glucosa y el extracto de levadura. De esta manera se puede visualizar que el uso de residuos orgánicos como fuentes alternativas de C y N podría minimizar el costo de las fuentes de C y N convencionales, y consecuentemente se podría minimizar el costo unitario de producción obteniendo mayores beneficios económicos de la producción del AH.

Conclusión y perspectiva

La revisión crítica sobre la producción microbiana de AH permitió identificar las cepas productoras, sus condiciones de cultivo y su perfil de producción de AH. *Streptococcus zooepidemicus* que es patógena es la bacteria productora natural de AH que se ha reportado mayormente con una producción de AH de hasta 6.6 g/L y 6.9 g/L cuando se somete a transformación genética mientras que las bacterias gram-gram positivos, gram-negativos y hongos que no son productores naturales de AH, pero son inocuas, cuando se someten a transformación genética mediante la introducción o expresión de los genes sintetizadores de AH de bacterias productoras naturales pueden producir altas cantidades de AH como es el caso de *Corynebacterium glutamicum* que reportó una producción de 28.7 g/L.

Se identificó también que se han explorado algunos residuos orgánicos que pueden ser utilizado como fuentes de C y N, aunque en estos estudios únicamente se han realizado con cepas de *Streptococcus zooepidemicus* en donde alcanza una alta producción de AH de 6.7 g/L cuando se utiliza almidón como fuente alternativa de C y extracto de levadura como fuente de N mientras que cuando se utiliza una fuente alternativa de N como suero de queso o lico fermentado y cuando se utilizan al mismo tiempo una fuente alternativa de C y N las producciones únicamente llegan a 4 g/L y 3.54 g/L respectivamente. Sin embargo, en la evaluación económica el uso de los residuos orgánicos como fuentes de C y/o N se tienen reducciones de hasta 72% en el costo de producción con respecto a la producción de AH con fuentes de C y N convencionales.

Hasta lo mejor de nuestro conocimiento, no se encontró estudios del uso de licores sacarificados de biorrefinería para producción microbiana de AH. Dado el contenido de azúcares de estos licores, parece ser prometedor aprovechar los licores sacarificados producidos en la etapa S de la BRF-HMZS para la producción de AH. Estudios futuros son requeridos para caracterizar los licores sacarificados de la etapa S y determinar la adecuación requerida de los licores sacarificados para la producción de AH con microorganismos productores selectos. De igual manera, se requiere la evaluación de la sostenibilidad ambiental y económica del sistema completo de la BRF-HSMN-AH para considerar estas soluciones como sostenibles.

Agradecimientos y financiamiento: Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN por el apoyo al primer autor de este trabajo, GPM.

Bibliografía

- Amado, I. R., Vázquez, J. A., Pastrana, L., & Teixeira, J. A. (2016). Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry*, 198, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.062>
- Amado, I. R., Vázquez, J. A., Pastrana, L., & Teixeira, J. A. (2017). Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products: Molasses and corn steep liquor. In *Biochemical Engineering Journal* (Vol. 117, pp. 181–187). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.017>
- Arslan, N. P., & Aydogan, M. N. (2021). Evaluation of Sheep Wool Protein Hydrolysate and Molasses as Low-Cost Fermentation Substrates for Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246. *Waste and Biomass Valorization*, 12(2), 925–935. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01062-w>

- Blank, L. M., Hugenholtz, P., & Nielsen, L. K. (2008). Evolution of the hyaluronic acid synthesis (has) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic streptococci. *Journal of Molecular Evolution*, 67(1), 13–22. <https://doi.org/10.1007/s00239-008-9117-1>
- Chahuki, F. F., Aminzadeh, S., Jafarian, V., Tabandeh, F., & Khodabandeh, M. (2019). Hyaluronic acid production enhancement via genetically modification and culture medium optimization in *Lactobacillus acidophilus*. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 121, pp. 870–881). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.112>
- Cheng, F., Gong, Q., Yu, H., & Stephanopoulos, G. (2016). High-titer biosynthesis of hyaluronic acid by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology Journal*, 11(4), 574–584. <https://doi.org/10.1002/biot.201500404>
- Cheng, F., Yu, H., & Stephanopoulos, G. (2019). Engineering *Corynebacterium glutamicum* for high-titer biosynthesis of hyaluronic acid. In *Metabolic Engineering* (Vol. 55, pp. 276–289). <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.07.003>
- Crater, D. L., Dougherty, B. A., & Van de Rijn, I. (1995). Molecular characterization of hasC from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose pyrophosphorylase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 270(48), 28676–28680. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28676>
- Crater, D. L., & Van de Rijn, I. (1995). Hyaluronic acid synthesis operon (has) expression in group A streptococci. *Journal of Biological Chemistry*, 270(31), 18452–18458. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.31.18452>
- de Oliveira, J. D., Carvalho, L. S., Gomes, A. M. V., Queiroz, L. R., Magalhães, B. S., & Parachin, N. S. (2016). Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0517-4>
- Dougherty, B. A., & van de Rijn, I. (1993). Molecular characterization of hasB from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. Demonstration of UDP-glucose dehydrogenase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7118–7124. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53153-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53153-7)
- Duan, X. J., Yang, L., Zhang, X., & Tan, W. S. (2008). Effect of oxygen and shear stress on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(4), 718–724.
- Duan, Y., Tarafdar, A., Kumar, V., Ganeshan, P., Rajendran, K., Shekhar Giri, B., Gómez-García, R., Li, H., Zhang, Z., Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., Taherzadeh, M. J., Sarsaiya, S., Jain, A., & Kumar Awasthi, M. (2022). Sustainable biorefinery approaches towards circular economy for conversion of biowaste to value added materials and future perspectives. *Fuel*, 325. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124846>
- Duffeck, H. C. B. P., Pan, N. C., Saikawa, G. I. A., Rocha, S. P. D. da, Baldo, C., & Celligoi, M. A. P. C. (2020). Biomedical Potential of Hyaluronic Acid from *Streptococcus zooepidemicus* Produced in Sugarcane Molasses. *Brazilian Journal of Development*, 6(7), 49963–49980. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-592>
- Escamilla-Alvarado, C., Poggi-Varaldo, H. M., & Ponce-Noyola, M. T. (2017). Bioenergy and bioproducts from municipal organic waste as alternative to landfilling: a comparative life cycle assessment with prospective application to Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(33), 25602–25617. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6939-z>
- Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, M. T., Poggi-Varaldo, H. M., Ríos-Leal, E., García-Mena, J., & Rinderknecht-Seijas, N. (2014). Energy analysis of in-series biohydrogen and methane production from organic wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(29), 16587–16594. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.077>
- Fava, F., Totaro, G., Diels, L., Reis, M., Duarte, J., Carioca, O. B., Poggi-Varaldo, H. M., & Ferreira, B. S. (2015). Biowaste biorefinery in Europe: opportunities and research & development needs. *New Biotechnology*, 32(1), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.11.003>
- Ferreira, R. G., Azzoni, A. R., Santana, M. H. A., & Petrides, D. (2021). Techno-economic analysis of a hyaluronic acid production process utilizing streptococcal fermentation. *Processes*, 9(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/pr9020241>
- Gomes, A. M. V., Netto, J. H. C. M., Carvalho, L. S., & Parachin, N. S. (2019). Heterologous hyaluronic acid production in *Kluyveromyces fragilis*. *Microorganisms*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090294>
- Grand View Research. (2023). *Hyaluronic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Dermal Fillers, Osteoarthritis, Ophthalmic, Vesicoureteral Reflux), By Region (MEA, EU, North America, APAC), And Segment Forecasts, 2023 - 2030*. fuente: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/hyaluronic-acid-market%0A>
- Huang, W. C., Chen, S. J., & Chen, T. L. (2006). The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 32(3), 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.10.011>
- Huang, W. C., Chen, S. J., & Chen, T. L. (2008). Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 460–464. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.01.021>
- Im, J. H., Song, J. M., Kang, J. H., & Kang, D. J. (2009). Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(11), 1337–1344. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0618-8>
- Jagannath, S., & Ramachandran, K. B. (2010). Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochemical Engineering Journal*, 48(2), 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.09.003>
- Jeeva, P., Shanmuga Doss, S., Sundaram, V., & Jayaraman, G. (2019). Production of controlled molecular weight hyaluronic acid by glucostat strategy using recombinant *Lactococcus lactis* cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(11), 4363–4375. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09769-0>
- Jeong, E., Shim, W. Y., & Kim, J. H. (2014). Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. *Journal of Biotechnology*, 185, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.018>
- Jia, Y., Zhu, J., Chen, X., Tang, D., Su, D., Yao, W., & Gao, X. (2013). Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights. In *Bioresource Technology* (Vol. 132, pp. 427–431). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.150>
- Jin, P., Kang, Z., Yuan, P., Du, G., & Chen, J. (2016). Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168. *Metabolic Engineering*, 35, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.01.008>
- Kaza, S., Yao, L. C., Bhada-Tata, P., & Van Woerden, F. (2018). *What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050*. Washington, DC: World Bank. <https://doi.org/10.1596/978-1-4648-1329-0>

- Khoshnevisan, B., Tabatabaei, M., Tsapekos, P., Rafiee, S., Aghbashlo, M., Lindeneg, S., & Angelidaki, I. (2020). Environmental life cycle assessment of different biorefinery platforms valorizing municipal solid waste to bioenergy, microbial protein, lactic and succinic acid. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109493>
- Kumar, A., Singh, E., Mishra, R., Lo, S. L., & Kumar, S. (2023). Global trends in municipal solid waste treatment technologies through the lens of sustainable energy development opportunity. *Energy*, 127471. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2023.127471>
- Kundariya, N., Mohanty, S. S., Varjani, S., Hao Ngo, H., W. C. Wong, J., Taherzadeh, M. J., Chang, J.-S., Yong Ng, H., Kim, S.-H., & Bui, X.-T. (2021). A review on integrated approaches for municipal solid waste for environmental and economical relevance: Monitoring tools, technologies, and strategic innovations. *Bioresource Technology*, 342, 125982. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125982>
- Ladakis, D., Stylianou, E., Ioannidou, S.-M., Koutinas, A., & Pateraki, C. (2022). Biorefinery development, techno-economic evaluation and environmental impact analysis for the conversion of the organic fraction of municipal solid waste into succinic acid and value-added fractions. *Bioresource Technology*, 354, 127172. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127172>
- Lai, Z. W., & Teo, C. H. (2019). Cloning and expression of hyaluronan synthase (hasA) in recombinant Escherichia coli BL21 and its hyaluronic acid production in shake flask culture. *Malaysian Journal of Microbiology*, 15(7), 575–582. <https://doi.org/10.21161/mjm.190444>
- Li, Y., Li, G., Zhao, X., Shao, Y., Wu, M., & Ma, T. (2019). Regulation of hyaluronic acid molecular weight and titer by temperature in engineered *Bacillus subtilis*. *3 Biotech*, 9(6), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1749-x>
- Liu, J., Wang, Y., Li, Z., Ren, Y., Zhao, Y., & Zhao, G. (2018). Efficient production of high-molecular-weight hyaluronic acid with a two-stage fermentation. *RSC Advances*, 8(63), 36167–36171. <https://doi.org/10.1039/c8ra07349j>
- Liu, L., Wang, M., Du, G., & Chen, J. (2008). Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Letters in Applied Microbiology*, 46(3), 383–388. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02325.x>
- Mao, Z., & Chen, R. R. (2007). Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. *Biotechnology Progress*, 23(5), 1038–1042. <https://doi.org/10.1021/bp070113n>
- Naveenkumar, R., Iyyappan, J., Pravin, R., Kadry, S., Han, J., Sindhu, R., Awasthi, M. K., Rokhum, S. L., & Baskar, G. (2023). A strategic review on sustainable approaches in municipal solid waste management and energy recovery: Role of artificial intelligence, economic stability and life cycle assessment. *Bioresource Technology*, 379, 129044. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129044>
- Pan, N. C., Pereira, H. C. B., da Silva, M. L. C., Vasconcelos, A. F. D., & Celligoi, M. A. P. C. (2017). Improvement Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* in Sugarcane Molasses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(1), 276–293. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2326-y>
- Pires, A. M. B., Macedo, A. C., Eguchi, S. Y., & Santana, M. H. A. (2010). Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource Technology*, 101(16), 6506–6509. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.074>
- Poggi-Varaldo, H. M., Muñoz-Paez, K. M., Escamilla-Alvarado, C., Robledo-Narváez, P. N., Ponce-Noyola, M. T., Calva-Calva, G., Ríos-Leal, E., Galíndez-Mayer, J., Estrada-Vázquez, C., Ortega-Clemente, A., Ortega-Clemente, A., & Rinderknecht-Seijas, N. F. (2014). Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: A review. *Waste Management and Research*, 32(5), 353–365. <https://doi.org/10.1177/0734242X14529178>
- Qiu, Y., Ma, Y., Huang, Y., Li, S., Xu, H., & Su, E. (2021). Current advances in the biosynthesis of hyaluronic acid with variable molecular weights. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 269). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118320>
- Rangaswamy, V., & Jain, D. (2008). An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Biotechnology Letters*, 30(3), 493–496. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9562-8>
- Rigo, D., da Silva, L. M., Fischer, B., Colet, R., Dallago, R. M., & Zeni, J. (2023). Hyaluronic Acid – from Production to Application: A Review. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13(3). <https://doi.org/10.33263/BRIAC133.211>
- Rohit, S. G., Jyoti, P. K., Subbi, R. R. T., Naresh, M., & Senthilkumar, S. (2018). Kinetic modeling of hyaluronic acid production in palmyra palm (*Borassus flabellifer*) based medium by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523. *Biochemical Engineering Journal*, 137, 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.06.011>
- Schulte, S., Doss, S. S., Jeeva, P., Ananth, M., Blank, L. M., & Jayaraman, G. (2019). Exploiting the diversity of streptococcal hyaluronan synthases for the production of molecular weight-tailored hyaluronan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7567–7581. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10023-w>
- Shah, A. V., Singh, A., Sabyasachi Mohanty, S., Kumar Srivastava, V., & Varjani, S. (2022). Organic solid waste: Biorefinery approach as a sustainable strategy in circular bioeconomy. In *Bioresource Technology* (Vol. 349). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126835>
- Shikina, E. V., Kovalevsky, R. A., Shirkovskaya, A. I., & Toukach, P. V. (2022). Prospective bacterial and fungal sources of hyaluronic acid: A review. In *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 20, pp. 6214–6236). <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.11.013>
- Sotelo-Navarro, P. X., Poggi-Varaldo, H. M., Chargo-Amador, J. P., Sojo-Benitez, A., Pérez-Angón, M. A., & Sánchez-Pérez, R. (2022). Impactos Ambientales de una Biorrefinería tipo HMEZS-NN. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38(Especial), 48–57. <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/54332>
- Vazquez, J. A., Montemayor, M. I., Fraguas, J., & Murado, M. A. (2010). Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 46. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-46>
- Vázquez, J. A., Pastrana, L., Piñeiro, C., Teixeira, J. A., Pérez-Martín, R. I., & Amado, I. R. (2015). Production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* on protein substrates obtained from *Scyliorhinus canicula* discards. *Marine Drugs*, 13(10), 6537–6549. <https://doi.org/10.3390/md13106537>
- Westbrook, A. W., Ren, X., Oh, J., Moo-Young, M., & Chou, C. P. (2018). Metabolic engineering to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis*. In *Metabolic Engineering* (Vol. 47, pp. 401–413). <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.016>
- Woo, J. E., Seong, H. J., Lee, S. Y., & Jang, Y. S. (2019). Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the Production of Hyaluronic Acid From Glucose and Galactose. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00351>
- Yoshimura, T., Shibata, N., Hamano, Y., & Yamanaka, K. (2015). Heterologous production of hyaluronic acid in an ϵ -Poly-L-Lysine producer, *Streptomyces albulus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(11), 3631–3640. <https://doi.org/10.1128/AEM.00269-15>
- Yu, H., & Stephanopoulos, G. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic Engineering*, 10(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2007.09.001>

-
- Zhang, J., Ding, X., Yang, L., & Kong, Z. (2006). A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(1), 168–172. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0253-x>
- Zhang, Y., Dong, J., Xu, G., Han, R., Zhou, J., & Ni, Y. (2023). Efficient production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using two-stage semi-continuous fermentation. In *Bioresource Technology* (p. 128896). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128896>
- Zheng, Y., Cheng, F., Zheng, B., & Yu, H. (2020). Enhancing single-cell hyaluronic acid biosynthesis by microbial morphology engineering. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5(4), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.09.002>