

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**Influência das Condições de Alimentação do  
Meio Suplementar na Produção de Ácido  
Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em  
Batelada Alimentada**

Juliana Conceição Teodoro

São Carlos - SP  
Março/ 2004

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**Influência das Condições de Alimentação do  
Meio Suplementar na Produção de Ácido  
Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em  
Batelada Alimentada**

Juliana Conceição Teodoro

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador:  
Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr.

São Carlos - SP  
Março/ 2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

T314ic

Teodoro, Juliana Conceição.

Influência das condições de alimentação do meio suplementar na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em batelada alimentada / Juliana Conceição Teodoro. -- São Carlos : UFSCar, 2004.  
89 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Fermentação. 2. Batelada alimentada. 3. Ácido clavulânico. 4. *Streptomyces clavuligerus*. I. Título.

CDD: 660.28449 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **JULIANA CONCEIÇÃO TEODORO** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 25 DE MARÇO DE 2004.

---

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr.  
PPG-EQ / UFSCar

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Maria Lúcia Gonsales da Costa Araújo  
IQ – Unesp - Araraquara

---

Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka  
PPG-EQ / UFSCar



# SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>I</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>NOMENCLATURA</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LETRAS GREGAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Metabólitos Secundários e Antibióticos.....	5
2.2 <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	8
2.3 Ácido Clavulânico .....	8
2.4 Formas de Cultivo na Produção de AC .....	12
2.4.1 Cultivo em Batelada .....	12
2.4.2 Cultivo em Batelada Alimentada .....	15
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
3.1 Microrganismo .....	19
3.2 Meios de Cultura .....	19
3.2.1 Meio de Cultura de Reativação (MR) .....	19
3.2.2 Meio de Cultura para Preparo de Inóculo (MI) .....	20
3.2.3 Meio de Cultura de Produção (MP) .....	20
3.2.4 Meio de Cultura Suplementar (MS) .....	20
3.3 Métodos Analíticos .....	21
3.3.1. Determinação da Concentração (Cx) .....	21
3.3.2. Determinação de Glicose (Cs) .....	21
3.3.3. Determinação de AC (Cp) .....	22
3.3.4. Caracterização Reológica do Caldo Fermentativo .....	23
3.4 Modelagem Matemática – Equacionamento dos Cultivos .....	23
3.4.1 Cultivos em Batelada .....	23

3.4.2 Cultivos em Batelada Alimentada .....	25
3.5. Simulações .....	25
3.6 Procedimento Experimental .....	26
3.6.1 Preservação do Mocrorganismo – Preparação de Criotubos .....	27
3.6.2 Reativação .....	28
3.6.3 Etapa de Preparação do Inóculo .....	28
3.6.4 Cultivo em Batelada .....	28
3.6.5 Cultivo em Batelada Alimentada .....	30
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
4.1 Cultivo em Batelada B1 .....	33
4.2 Cultivos em Batelada Alimentada BA1, BA2 e BA3 .....	35
4.2.1 Cultivos em Batelada Alimentada BA1 .....	37
4.2.2 Cultivos em Batelada Alimentada BA2 .....	39
4.2.3 Cultivos em Batelada Alimentada BA3 .....	40
4.3 Cultivos em Batelada Alimentada BA4 e BA5 .....	42
4.4 Cultivo em Batelada B2 .....	43
4.4.1 Perda da Capacidade Produtora – Preparação de Novo Lote de Criotubos.....	44
4.5 Cultivo em Batelada BA3 .....	45
4.6 Cultivo em Batelada Alimentada BA6 e BA7 .....	46
4.7 Cultivo em Batelada B4 com pulso .....	49
4.8 Cultivo em Batelada Alimentada BA8 .....	50
4.9 Cultivo em Batelada Alimentada BA9 .....	52
4.10 Cultivo em Batelada Alimentada BA10 .....	54
4.11 Comparação dos Resultados Obtidos .....	56
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>6. SUGESTÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>
<b>8. APÊNDICE A .....</b>	<b>74</b>

*À Deus meio esteio e fortaleza durante  
esta longa jornada*

*À minha mãe pelo apoio incondicional  
em todos os momentos*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu querido professor José Eduardo Olivo do Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá, meu “berço”, por me apresentar a bioquímica, me fazer pensar mais e ficar apaixonada por está área da engenharia.

Ao meu professor orientador Dr. Alberto Colli Badino Jr pela oportunidade do ingresso na pós-graduação, a orientação científica, a confiança em meu potencial, principalmente nos momentos de dificuldades e desânimo e também pela amizade, paciência e respeito demonstradas ao longo deste período.

Ao doutorando Álvaro Baptista Neto pela paciência em me ensinar, tolerância com meus erros , colaboração científica, ajuda nos experimentos e amizade sincera da qual compartilhamos. Meu muito obrigado.

Aos professores Carlos Osamu Hokka, Marlei Barboza e Maria Lúcia G. da C. Araújo por fazerem parte da banca examinadora e pelas “sacadas” que contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família por sempre acreditar que eu conseguiria chegar até o fim desta etapa e por compreenderem a minha ausência até nos momentos mais difíceis. Amo todos vocês.

Pela amizade daqueles que estão perto e pelo apoio e orações daqueles que estão distantes.

Às minhas duas amigas-irmãs Kamilla e Vanessa (“Lindinha e Docinho”) por me suportar todos estes anos, por fazer parte da minha vida até nos momentos difíceis e serem a minha segunda família. A Vivian que mesmo longe continua fazendo parte deste quarteto.

Em especial a todos os companheiros de laboratório pelo apoio na pesquisa e pelas boas risadas compartilhadas: Amauri, Amadeus, Luiz Cláudio, Marcel, Luciana, Patrícia, Rose e Antonio, pessoal da Catálise e os demais amigos que eu fiz aqui em São Carlos.

À Capes pelo auxílio concedida.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o sucesso desta importante etapa da minha vida, que embora não tenham seus nomes escrito aqui podem ter certeza que estão no meu coração.

## RESUMO

O ácido clavulânico (AC) é um importante inibidor das enzimas  $\beta$ -lactamases que clivam o anel  $\beta$ -lactâmico de antibióticos como penicilinas e cefalosporinas, tornando esses compostos inativos. O AC é tradicionalmente produzido por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos operados em batelada (B) e em batelada alimentada (BA). Pelo fato dos produtos do catabolismo de fontes de carbono facilmente assimiláveis acabarem por reprimir as enzimas responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários, entre os quais inclui-se o AC, a produção em BA é preferível, uma vez que torna possível controlar os níveis de nutrientes no caldo. No presente trabalho foram avaliados os efeitos da alimentação de meio de cultura suplementar (composição, concentração de glicerol e vazão) na produção de AC em batelada alimentada em biorreator de bancada de 4L em cultivos operados a 800 rpm, 0,5 vvm e pH = 6,8. Inicialmente, realizou-se um cultivo em batelada em meio de cultura contendo de glicerol ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ) e Samprosoy 90 NB ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ), uma proteína isolada de soja. Os resultados desse cultivo em termos de produção de AC serviram de padrão de comparação e a velocidade de consumo de glicerol como base para definir a velocidade de alimentação de glicerol nos cultivos em BA. Um modelo cinético para produto não associado ao crescimento considerando degradação do AC foi ajustado aos resultados experimentais e simulações foram realizadas para cultivos em BA, definindo as condições que deveria conduzir tais cultivos com o intuito de se obter os resultados esperados. Foram realizados cultivos em diferentes condições de vazão volumétrica de alimentação (F) e concentração de glicerol no meio suplementar ( $C_{s_e}$ ). Os resultados experimentais mostraram uma relação linear entre as velocidades de AC e de consumo de glicerol, condição não prevista pelo modelo, além de um efeito negativo na produção de AC num período após o início de alimentação, indicando uma possível inibição ou repressão pelo glicerol, o que foi descartado pelos resultados de um cultivo em batelada com pulso de glicerol em 24 horas, indicando que tal influência poderia ser devido a outro (s) constituinte (s) do meio ou a diluição. Os resultados de cultivos subsequentes, em diferentes condições de vazão e de concentração de glicerol e com meio de cultura suplementar completo e com apenas glicerol, indicaram que a produção de AC é melhorada operando o processo com alta  $C_{s_e}$  e baixas vazões (F), condições que asseguram suficiência em fonte de carbono e minimizam os efeitos de diluição.

Influence of Feeding Conditions on Clavulanic Acid Production by  
*Streptomyces clavuligerus* in Fed Batch Cultivations

**ABSTRACT**

The clavulanic acid (CA) is an important inhibitor of  $\beta$ -lactamases, enzymes that cleaves the  $\beta$ -lactam ring of penicillins and cephalosporins, inactivating these compounds. CA is traditionally produced by *Streptomyces clavuligerus* in batch (B) or fed batch (FB) cultivations. Considering that the products of easily assimilable catabolic carbon source catabolism repress the biosynthesis of secondary metabolite, including CA, production in FB is preferable because control of nutrient level can be performed. In the present work the effect of supplementing medium (composition, concentration of glycerol and feed flow rate) on the production of CA was evaluated in fed batch cultivations in 4L stirred-tank bioreactor. Aeration was set at 0.5 vvm, the agitation rate was controlled at 800 rpm and pH at 6.8. Initially, a batch cultivation was carried out with glycerol (15 g.L<sup>-1</sup>) and Samprosoy (20 g.L<sup>-1</sup>), a soy protein hydrolyzate, as carbon and nitrogen sources, respectively. The results obtained from this experimental, concerning CA production, were considered as standard for comparison with further experimental results. Also, the observed glycerol consumption rate was used to define the glycerol feed rate in further experiments. The kinetic model considering non-associated production with CA degradation was fitted to the experimental results and cultivation in FB were simulated under different conditions of volumetric flow rate (F) and glycerol concentration on supplementary medium (C<sub>s<sub>e</sub></sub>). The experimental results showed that the rate of production of CA and glycerol consumption, were directly related, condition not predicted by model, besides, its negative effect on the CA production after the feeding indicate a possible inhibition/repression effect of glycerol. The possible negative effect of glycerol not confirmed by the results of a batch cultivation with pulse of glycerol at 24 hours cultivation, indicating that this effects caused by others compounds in the culture medium or due to dilution of the medium. The subsequent results with different feeding conditions and glycerol concentration utilizing complete supplementary medium, with only glycerol, indicate that CA production is increased in process with high C<sub>s<sub>e</sub></sub> and low volumetric flow rate (F) that guarantee sufficient carbon source and minimize the dilution effects.

## Lista de Figuras

Figura 2.1: Estrutura molecular do ácido clavulânico

Figura 3.1: Metodologia experimental utilizada nos cultivos em batelada

Figura 3.2: Metodologia experimental utilizada nos cultivos em batelada alimentada

Figura 4.1: Resultados obtidos no cultivo em batelada B1

Figura 4.2: Ajuste do modelo cinético dado pelas Equações 3.1, 3.2 e 3.3 para o cultivo em batelada B1 (as linhas correspondem aos valores simulados)

Figura 4.3 Simulações e resultados experimentais da concentração de AC para os cultivos BA1 ( $F= 0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$ ), BA2 ( $F= 0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$ ) e BA3 ( $F= 0,042 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$ )

Figura 4.4: Cultivo em batelada alimentada, BA1 ( $F=0,08 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$ )

Figura 4.5: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada BA2 ( $F=0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$ )

Figura 4.6: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada BA3 ( $F=0,042 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$ )

Figura 4.7: Resultados dos cultivos em Batelada Alimentada: **(a)** BA4 ( $F=0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$ ) e **(b)** BA5 ( $F=0,042 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$ )

Figura 4.8: Resultados do cultivo em Batelada B3 realizado com o novo estoque de criotubos (junho/2003)

Figura 4.9: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada BA6 ( $F=0,042 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$ )

Figura 4.10: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada BA7 ( $F=0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$ )

Figura 4.11: Resultados do cultivo em batelada B4 com pulso, indicado pela seta

Figura 4.12: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada, BA8 ( $F=0,042 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$ ), com meio suplementar composto de solução de glicerol

Figura 4.13: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada BA9 ( $F=0,02 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=60,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) com meio suplementar composto de solução de glicerol

Figura 4.14: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada BA10 ( $F=0,02 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=60,0 \text{ g.L}^{-1}$ )

Figura 4.15: Perfis de concentração de AC dos cultivos B1, B2, B4, BA2, BA3, BA6, BA7, BA8, BA9 e BA10

Figura 4.16: Perfis de concentração relativa de AC ( $C_p/C_{p_{B_{max}}}$ ) para os cultivos realizados com os criotubos preparados em outubro/2002

Figura 4.17: Perfis de concentração relativa de AC ( $C_p/C_{p_{B_{max}}}$ ) para os cultivos realizados com os criotubos preparados em junho/2003

Figura 4.18 Perfis de massa acumulada de AC para os cultivos realizados com os criotubos de outubro/2002

Figura 4.19: Perfis de massa acumulada de AC para os cultivos realizados com os criotubos de junho/2003

Figura 4.20: Influência simultânea da vazão volumétrica de alimentação ( $F$ ), da concentração de glicerol do meio suplementar ( $C_{s_e}$ ) e da vazão mássica de alimentação (produto  $F.C_{s_e}$ ) na produção relativa de AC nos cultivos em batelada alimentada

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Estruturas generalizadas de algumas classes de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos

Tabela 3.1: Ensaio realizado para cultivos em Batelada e Batelada Alimentada (B: batelada, BA: batelada alimentada, B4\* :batelada com pulso)

Tabela 4.1: Resultados de produção de AC obtidos na literatura e no presente trabalho

Tabela 4.2: Resultados obtidos nos cultivos B1, B2, B4, BA2, BA3, BA6, BA7, BA8, BA9 e BA10

## Nomenclatura

AC – ácido clavulânico

B – batelada

BA – batelada alimentada

Cs – concentração de substrato [g.L<sup>-1</sup>]

Cx – concentração celular [g.L<sup>-1</sup>]

Cp – concentração de produto [g.L<sup>-1</sup>]

C<sub>Se</sub> – concentração de glicerol do meio suplementar [g.L<sup>-1</sup>]

C<sub>S0</sub> – concentração inicial de substrato [g.L<sup>-1</sup>]

C<sub>S1</sub> – concentração crítica de glicerol quando começa a produção [g.L<sup>-1</sup>]

C<sub>S2</sub> – concentração crítica de glicerol quando começa a morte celular [g.L<sup>-1</sup>]

C<sub>pBmax</sub> – concentração de produto no cultivo em batelada máximo [g.L<sup>-1</sup>]

C<sub>pMax</sub> – concentração de produto máxima [g.L<sup>-1</sup>]

D – vazão específica de alimentação de substrato [h<sup>-1</sup>]

F – vazão volumétrica [L.h<sup>-1</sup>]

f(C<sub>S1</sub>) – função degrau [-]

f(C<sub>S2</sub>) – função degrau [-]

K – índice de consistência [dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>]

K<sub>s</sub> – constante de saturação [g.L<sup>-1</sup>]

k<sub>d</sub> – constante de morte celular [h<sup>-1</sup>]

k<sub>dp</sub> – constante de degradação de produto [h<sup>-1</sup>]

M – massa [g]

MR – meio de cultura de reativação

MI – meio de cultura de inoculo

MP – meio de produção

MS – meio suplementar

n – índice de comportamento de escoamento [-]

P – produto

$P_{p_{max}}$  – produtividade de produto máxima [ $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ]

$r_p$  – velocidade de produção [ $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ]

$r_{sx}$  – velocidade de consumo de glicerol [ $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ]

S – substrato

t – tempo [h]

V – volume [L]

$V_0$  – volume inicial [L]

$V_F$  – volume final [L]

X – células

$Y_{X/S}$  – coeficiente de rendimento de substrato a células [ $\text{g}_{células}.\text{g}_{substrato}^{-1}$ ]

## Letras Gregas

$\beta$  - constante de formação de produto [ $\text{mg.g}^{-1}.\text{L}^{-1}$ ]

$\tau$  - tensão de cisalhamento [ $\text{dina.cm}^{-2}$ ]

$\gamma$  - gradiente de velocidade [ $\text{s}^{-1}$ ]

$\mu_{max}$  – velocidade específica máxima de crescimento celular [ $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ]

## 1. Introdução

Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de microrganismos, que inibem o processo de crescimento de outros microrganismos, inclusive quando utilizado em baixas concentrações. Possuem como propriedade comum a atividade bactericida, quando eliminam as bactérias, provocando a destruição da parede bacteriana, e bacteriostáticos, quando detêm o crescimento das bactérias, deixando ao sistema imunitário a tarefa de eliminar a infecção.

Durante milhares de anos a medicina popular utilizou carne, queijo e pão mofados para curar as feridas, contudo somente em 1928 Alexander Fleming observou a presença de um fungo, o *Penicillium notatum*, que impedia a proliferação da bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*. A contaminação acidental de suas placas de cultivo propiciou uma importante descoberta (Sanchez *et al.*, 2002 *apud* Demain *et al.*, 1988). Fleming cultivou o bolor e depois extraiu dele a substância química que atuava contra a bactéria, denominando-a penicilina.

A penicilina foi o primeiro antibiótico de interesse produzido industrialmente durante a Segunda Guerra Mundial. Na década de 50 foram isolados e utilizados clinicamente outros tipos de antibióticos como a estreptomicina, o cloranfenicol e a tetraciclina. Nas décadas seguintes, com o avanço tecnológico dos processos de fermentação, das novas técnicas de síntese química e enzimática de medicamentos, novos antibióticos foram desenvolvidos como as cefalosporinas e as penicilinas semi-sintéticas.

Dentre os antibióticos de maior destaque, podem ser citadas as penicilinas e cefalosporinas naturais produzidas industrialmente por via fermentativa a partir de

linhagens dos gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium*. Esses antibióticos apresentam na sua estrutura molecular um anel  $\beta$ -lactâmico e por isso são assim denominados.

Embora o uso de antibióticos tenha eficiência no tratamento de várias infecções causadas por bactérias, o seu uso indiscriminado e o aparecimento de novas doenças vem resultando numa maior resistência por parte dos microrganismos patogênicos. Esta resistência é uma inevitável consequência do processo seletivo pelo qual estes microrganismos estão passando.

Em palestra proferida na 49ª Reunião da SBPC, o professor Edmar Chartone de Souza da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) alertou que “os antibióticos estão perdendo a luta contra as bactérias, o que pode ser notado pelo ressurgimento de epidemias de pneumonia no mundo inteiro e do aumento de casos de tuberculose”. Segundo ele, “a razão disso é que os mecanismos de resistência fazem parte do próprio genoma das bactérias, o que faz com que haja mutação espontânea seguida de seleção natural das mais aptas” (Folha de São Paulo, 16/07/97).

A resistência microbiana a penicilinas e cefalosporinas deve-se à capacidade de algumas bactérias sintetizarem  $\beta$ -lactamases, enzimas responsáveis pela clivagem do anel  $\beta$ -lactâmico, resultando na perda da ação antibacteriana desses compostos.

Este problema da resistência aos antibióticos tem consequências mais evidentes quando se trata de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, já que estes constituem cerca de 50% dos antibióticos usados sistematicamente em virtude de sua eficácia e disponibilidade de muitos derivados (Essack *et al.*, 2001). Hoje os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, particularmente as penicilinas e as cefalosporinas, representam a maior porção do mercado biotecnológico sendo cerca de 65% do total do mercado de antibióticos (Elander, 2003).

Com a descoberta da ação das enzimas  $\beta$ -lactamases surgiu a necessidade do estudo sobre inibidores destas enzimas. Em 1977, Reading e Cole publicaram um trabalho sobre a descoberta de um potente inibidor de  $\beta$ -lactamases, o qual foi denominado ácido clavulânico (AC).

O ácido clavulânico é um metabólito secundário oriundo do cultivo de *Streptomyces clavuligerus*. Apresenta pouca eficácia contra bactérias patogênicas Gram-positivas como em Gram-negativas (Kim *et al.*, 2001), porém age inativando as enzimas  $\beta$ -lactamases intra e extra-celulares. Este mecanismo varia com a enzima, no entanto ocorre geralmente na forma de uma inibição competitiva e irreversível (Essack *et al.*, 2001).

A combinação do ácido clavulânico com penicilinas semi-sintéticas, como a amoxicilina, é o melhor exemplo do uso de um inibidor de  $\beta$ -lactamase combinado com um antibiótico sensível (Chen *et al.*, 2002). Comercialmente este medicamento é encontrado no Brasil com o nome de Clavulin<sup>®</sup> (SmithKline Beecham Farmacêutica) e como Augmentin<sup>®</sup> no exterior. Em 1995 a venda mundial de Augmentin<sup>®</sup> chegou a 1,3 bilhões de dólares e em 2003 este já era o segundo antibiótico mais vendido do mundo (Elander, 2003).

Sendo o ácido clavulânico um dos 21 metabólitos secundários sintetizados por *Streptomyces clavuligerus*, fica claro que sua produção requer condições especiais de cultivo como pH, temperatura, agitação, aeração, além de fontes de carbono, nitrogênio e fosfatos adequados. Os metabólitos secundários são geralmente produzidos em rotas biossintéticas que têm origem nos metabólitos primários, que são geralmente aminoácidos, lipídios, proteínas, etc. Cada parte específica que compõe um metabólito secundário se junta para formar o produto final, catalisado por uma enzima específica, todavia este mecanismo não é totalmente conhecido (Díez *et al.*, 1996).

Tradicionalmente, os cultivos de *Streptomyces clavuligerus* para a produção de AC são realizados em batelada e em batelada alimentada.

Pelo fato dos produtos do catabolismo de fontes de carbono facilmente assimiláveis em caldos fermentativos acabarem por reprimir as enzimas responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários (Sanchez *et al.*, 2002 *apud* Demain *et al.*, 1971), entre os quais inclui-se o ácido clavulânico, a produção destes em batelada alimentada, onde é possível controlar os níveis dessas fontes de carbono no caldo, mostra-se como alternativa promissora frente ao processo convencional operado em batelada.

Muitos pesquisadores apontaram como precursor da molécula de AC uma molécula de três carbonos, que seria o próprio glicerol ou uma outra molécula proveniente do metabolismo deste. Assim a utilização de glicerol no meio suplementar em batelada alimentada surge como um fator limitante do processo.

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da composição e da velocidade de alimentação do meio suplementar, composto basicamente de glicerol e Samprosoy 90NB (hidrolisado protéico de soja) na produção do ácido clavulânico em batelada alimentada por *Streptomyces clavuligerus* como forma de aumentar a produção e a produtividade frente ao processo tradicional em batelada.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Metabólitos Secundários e Antibióticos

De todos os produtos tradicionais obtidos por processos fermentativos, os mais importantes para saúde humana são os metabólitos secundários (Sanchez *et al.* 2002, *apud* Demain *et al.*, 1989). Estes estão relacionados com os produtos do metabolismo primário que são os essenciais ao crescimento celular.

Sabe-se que os metabólitos secundários não desempenham um papel direto no metabolismo energético nem no crescimento celular, embora contribuam seguramente para a sobrevivência do microrganismo, já que inibem a ação de competidores que possam ocupar o mesmo nicho ecológico.

Microrganismos que excretam metabólitos secundários apresentam inicialmente, um período de crescimento celular, a trofofase. Quando este crescimento cessa por esgotamento de um ou mais nutrientes essenciais, na fase conhecida por idiofase, a síntese dos metabólitos secundários é disparada (Phaff, 1981).

Os exemplos mais conhecidos de metabólitos secundários são os antibióticos. Estes são compostos químicos que, em baixas concentrações, têm a capacidade de destruir ou inibir o crescimento de outros microrganismos. Dentre as várias formas de atuação dos antibióticos está a síntese da parede celular, essencial à bactéria em meios hipotônicos. A presença do antibiótico acaba por danificar ou destruir esta camada causando a morte da bactéria. O conjunto particular de antibióticos que atuam por este mecanismo é conhecido como  $\beta$ -lactâmico (Neu *et al.*, 1999).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são assim chamados por possuírem um anel  $\beta$ -lactâmico em sua estrutura. A tabela a seguir apresenta exemplos destes antibióticos bem como suas estruturas.

Nota-se que, praticamente todos os medicamentos desenvolvidos desde a descoberta da penicilina, já possuem bactérias resistentes a seus efeitos, mostrando que estas têm a capacidade de desenvolver mecanismos ou mutações para resistir ao efeito dos antibióticos.

Tabela 2.1: Estruturas generalizadas de algumas classes de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Essack *et al.*, 2001)

Classe	Estruturas	Notas
“Monobactams”		Moléculas $\beta$ -lactâmicas monocíclicas isoladas da eubactéria <i>Chromobacterium violaceum</i>
“Penicillins/Penams”		Consistem de um anel tiazolidina ligado a um anel $\beta$ -lactâmico com diferentes lados na cadeia onde o acil é aderido.
“Cephamycins”		Composto por um grupo cefem com um grupo metoxi substituindo o átomo 7- $\alpha$ hidrogênio no núcleo das cefalosporinas

A resistência é uma inevitável consequência imposta pelo processo seletivo e pelo freqüente uso indiscriminado de antibióticos. Esta resistência a antibióticos prejudica os efeitos clínicos e financeiros das terapias empregadas em termos de altas taxas de morbidez e mortalidade, longas durações nas hospitalizações, aumento nos custos com seguros de saúde, administração de drogas alternativas caras e/ou tóxicas (Essack *et al.*, 2001).

A maior causa de resistência a estes antibióticos é a existência das enzimas  $\beta$ -lactamases sintetizadas por microrganismos resistentes que catalisam irreversivelmente a ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico, resultando na inativação do produto, isto é, gerando produtos sem ação bacteriana (Essack *et al.*, 2001). Existem várias maneiras de se evitar a ação destrutiva das enzimas  $\beta$ -lactamases: alterando a estrutura dos compostos  $\beta$ -lactâmicos, fazendo com que estes fiquem insensíveis a hidrólise pelas  $\beta$ -lactamases e mantendo seu potencial antibiótico (Hakimelahi, 2000 *apud* Hakimelahi *et al.* 2002) ou utilizando um reagente que incapacite a ação da enzima  $\beta$ -lactamase, em conjunto com um antibiótico  $\beta$ -lactâmico que poderia, em condições normais, ser rapidamente desativado pela enzima (Hakimelahi *et al.*, 2002).

Embora tenham sido desenvolvidos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos mais potentes com a aplicação das técnicas acima referidas, surgiu o interesse de se estudar os inibidores das enzimas  $\beta$ -lactamases que poderiam de alguma forma potencializar a ação destes antibióticos. Assim, após um grande projeto de pesquisa, pesquisadores da Beecham Pharmaceutical descobriram e isolaram o composto  $\beta$ -lactâmico ácido clavulânico (AC), caracterizado como um potente inibidor destas enzimas, composto obtido de cultura de bactéria do gênero *Streptomyces*.

## 2.2 *Streptomyces clavuligerus*

A grande maioria dos produtos terapêuticos utilizados no combate às doenças infecciosas causadas por bactérias é sintetizada pelo metabolismo secundário de microrganismos isolados do solo, como fungos e bactérias filamentosas, entre as quais incluem-se as do gênero *Streptomyces*.

Os actinomicetos, organismos intermediários nas propriedades entre bactérias e os fungos verdadeiros, é o grupo ao qual pertence o gênero *Streptomyces sp.* Estes são microrganismos Gram-positivos, aeróbios, primariamente habitantes do solo, que quando cultivados em culturas submersas têm a capacidade de produzir hifas vegetativas (micélios) que não se fragmentam com facilidade.

O *Streptomyces clavuligerus* é um dos mais importantes microrganismos do ponto de vista industrial (Neves *et al.*, 2001), sendo capaz de produzir cerca de 21 metabólitos secundários, incluindo vários antibióticos  $\beta$ -lactâmicos como cefamicina C, penicilina N, desacetoxicefalosporina C, além do ácido clavulânico (Romero *et al.*, 1984). De acordo com Puentes *et al.* (1989), esta bactéria não consome facilmente mono e dissacarídeos como glicose, frutose, sacarose e lactose, normalmente utilizados como principais fontes de carbono e energia em processos fermentativos. Por esta razão é utilizado glicerol como fonte de carbono.

Além do *Streptomyces clavuligerus*, outros como *S. jumonjinensis* e *S. katsurahamanus* também sintetizam ácido clavulânico (Butterworth *et al.*, 1984).

## 2.3 Ácido Clavulânico

Ácido  $\alpha$ -(2R,5R)-3-(beta-hidroxietilideno)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico é o nome do ácido clavulânico de acordo com a IUPAC. Este possui sua molécula estrutural formada por dois anéis, o  $\beta$ -lactâmico e o anel oxazolidino (Nabais *et al.*, 2000).

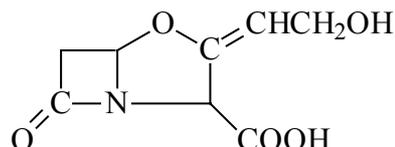


Figura 2.1: Estrutura molecular do ácido clavulânico

Esta estrutura não ocorre naturalmente num composto  $\beta$ -lactâmico, sendo o ácido clavulânico o único que contém uma molécula de oxigênio na posição 1.

Este ácido tem baixa atividade antibacteriana, porém é um potente inibidor de enzimas  $\beta$ -lactamases produzidos por bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (Kim *et al.*, 2001). Seu uso comercial associado a antibióticos como amoxicilina e ampicilina apresenta bons resultados no tratamento de infecções bacterianas, sendo restrito apenas em situações onde estas combinações causam efeitos colaterais (Gresser *et al.*, 2001).

O ácido clavulânico possui efeito sinérgico com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos apenas quando é utilizado no combate a microrganismos produtores de  $\beta$ -lactamases. No combate a microrganismos não produtores de  $\beta$ -lactamases, mas sensíveis aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, não é observado nenhuma melhora no desempenho dos antibióticos. Em estudo realizado com bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases, nota-se que a concentração de amoxicilina necessária para combater as infecções na presença do

ácido clavulânico foi até um centésimo daquela menor quando estes antibióticos foram utilizados isoladamente (Brown *et al.*, 1976).

A utilização do ácido clavulânico como inibidor de  $\beta$ -lactamases é realizada em conjunto com a amoxicilina, de maior ação antibacteriana mas sensível as  $\beta$ -lactamases, na forma comercial CLAVULIN<sup>®</sup>, comercializado no Brasil pela SmithKline Beecham Farmacêutica, ou Augmentin<sup>®</sup>, no exterior, ou juntamente com a ticarciclina que é comercializado com o nome de Timentin<sup>®</sup> (Baggaley *et al.*, 1997).

Diversos estudos já foram realizados em relação a biossíntese do ácido clavulânico e pela sua semelhança química estrutural às cefalosporinas e penicilinas, achava-se que os mecanismos biosintéticos seriam semelhantes. Porém, vários pesquisadores mostraram diferentes conclusões.

Guteman *et al.* (1985) propuseram que o ácido clavulânico tinha como precursores o ácido beta-hidroxiopropiônico, proveniente do metabolismo do glicerol com o ácido glutâmico ou a ortinina.

Romero *et al.* (1986) propuseram através de estudos com arginina, ácido glutâmico e ortinina, que o ácido clavulânico tem os carbonos do anel  $\beta$ -lactâmico originários do glicerol e os demais carbonos vêm da ortinina que pode ser sintetizada a partir do ácido glutâmico ou da arginina.

Ives e Bushell (1997) e Pitlik e Townsend (1997) propuseram o piruvato como precursor do anel  $\beta$ -lactâmico. Thirkettle *et al.* (1997) demonstraram que realmente o piruvato é responsável pela formação deste anel. Entretanto, McGowan *et al.* (1998) relataram a arginina e um composto de três carbonos (glicerol ou piruvato) como precursores do ácido clavulânico.

Redonto *et al.* (1999) *apud* Liras *et al.* (2000), através da identificação do gene *pyc*, demonstraram que o piruvato é precursor do ácido clavulânico, pois um

microrganismo que não possui este gene é incapaz de produzi-lo. Entretanto, este microrganismo sem o gene *pyc*, produz o ácido clavulânico a partir do glicerol, sugerindo a existência de uma rota metabólica alternativa para produzir o anel  $\beta$ -lactâmico sem a conversão do glicerol em piruvato.

Os principais nutrientes necessários para o crescimento, manutenção e biossíntese de produtos de interesse por microrganismos aeróbios são carbono, nitrogênio, potássio, fósforo, enxofre e oxigênio correspondendo entre 80 e 90% do material celular (Moo-Young *et al.*, 1995). Baptista-Neto *et al.* (2000) estudaram a composição do meio de cultura para a produção de AC e concluíram que um meio contendo glicerol e o hidrolisado protéico de soja, Samprosoy 90NB (Bunge Alimentos S.A.), como fontes de carbono e nitrogênio resultavam em cultivos com grande capacidade produtora.

Nos cultivos com *Streptomyces clavuligerus*, o crescimento eleva a demanda de O<sub>2</sub> e simultaneamente a viscosidade aparente do caldo, dificultando assim a transferência de O<sub>2</sub> e podendo até mesmo limitar o crescimento bacteriano e a própria biossíntese do produto de interesse. Para se evitar este tipo de dificuldade durante os cultivos foi estudada a transferência de oxigênio no caldo por Rosa (2002) que concluiu que altas produções de AC parecem estar relacionadas com altas frequências de agitação em conjunto a altas concentrações de O<sub>2</sub> dissolvido, obedecendo obviamente os limites de cisalhamento das células.

Quanto ao processo de separação e purificação do ácido clavulânico, observa-se que este não difere muito dos processos tradicionalmente utilizados na indústria farmacêutica. De acordo com Butterworth *et al.*, 1984, ao final da fermentação, o mosto é primeiramente clarificado por centrifugação ou filtração e o micélio é descartado. Uma extração primária do caldo clarificado pode ser efetuada por uma variedade de métodos de separação. Os dois métodos mais comuns em processos em larga escala são

a extração com solventes orgânicos imiscíveis em água (n-butanol, por exemplo) e a adsorção em colunas de resina de troca iônica seguida por eluição com solução salina. A purificação do extrato primário é alcançada por processos cromatográficos subsequentes. O produto final com alto teor de pureza pode ser obtido por secagem a frio (liofilização) ou cristalização a partir da solução aquosa.

Almeida (2003) realizou estudos sobre a degradação do ácido clavulânico e concluiu que no processo de recuperação, o AC é mais estável em pH 6,2 e em temperaturas amenas entre 10 e 20°C, além de constatar que o AC proveniente do meio de fermentação é mais instável, provavelmente devido a outros componentes presentes no meio.

## **2.4 Formas de Cultivo para Produção de Ácido Clavulânico**

Diferentes formas de cultivos microbianos podem ser adotadas para a produção de bioprodutos, principalmente metabólitos secundários os quais incluem os cultivos em batelada, batelada alimentada e contínuos. As formas de operação em batelada e em batelada alimentada são as mais comuns sendo a segunda uma melhoria da primeira, visando principalmente alcançar maiores produtividades para o processo estudado.

### **2.4.1 Cultivo em Batelada**

O cultivo em batelada pode ser definido como um processo a volume constante, isto é, o volume inicial dentro do reator é praticamente o mesmo ao final da fermentação.

Seu modo de operação pode ser descrito da maneira que segue. No instante inicial a solução nutriente esterilizada no fermentador é inoculada com microrganismos e incubada, de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio, através de aeração no caso de processos aeróbicos, antiespumante, e ácido ou base para controle de pH (Schmidell *et al.* 2001).

O cultivo em batelada é frequentemente utilizado como comparação a outros processos. Na literatura encontram-se alguns trabalhos relacionados com a produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* a partir de cultivos em batelada.

Kranjc Sasa *et al.* (1997) sugerem um processo de produção de ácido clavulânico em batelada, utilizando o microrganismo *S. clavuligerus sp.*, no qual a concentração de fósforo assimilável no meio de cultura deve ser inferior a 0,15% w/v. As fontes assimiláveis de fósforo podem ser fosfato de sódio, fosfato de potássio e fosfato de potássio diácido. As fontes de carbono e nitrogênio utilizadas foram, respectivamente, glicerol e amônia. Após 96 horas de cultivo a produção de ácido clavulânico foi de 3580 mg.L<sup>-1</sup>.

Large *et al.* (1998) realizando estudos sobre a influência da agitação sobre o consumo de lipídeos e a produção de ácido clavulânico em cultivos com *Streptomyces clavuligerus* em fermentador de 5 litros obtiveram que, com aumentos sucessivos na frequência de agitação do caldo, 600, 750, 900 e 1200 rpm correspondendo a velocidades na ponta do impelidor de 1,88, 2,36, 2,83 e 3,77 m.s<sup>-1</sup>, mantendo-se fixas a vazão de aeração em 1vvm e a composição do gás de alimentação para assegurar a concentração de O<sub>2</sub> dissolvido acima de 50%, não influenciaram na utilização das fontes de lipídeo. Em relação à produção de ácido clavulânico, a maior concentração foi obtida para a condição de 750 rpm. O crescimento celular, avaliado através de uma correlação

com dados reológicos e por medidas de capacitância do caldo de fermentação, foi prejudicado quando se utilizou uma rotação de 1200 rpm, ou seja, uma velocidade na ponta do impelidor de  $3,77 \text{ m.s}^{-1}$ . A concentração específica máxima de AC alcançada foi de  $19,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{Pa}^{-1}.\text{s}^{-1}$  em 110 horas, isto para uma velocidade na ponta do impelidor de  $2,83 \text{ m.s}^{-1}$ .

Baptista-Neto *et al.* (2000) estudaram a cinética de formação de ácido clavulânico em um biorreator de bancada de 4 litros, utilizando como fonte de carbono o glicerol e como fontes de nitrogênio peptona e Samprosoy 90 NB (proteína da soja), a concentração de oxigênio foi mantida em torno de 40% de saturação. Após 35 horas de cultivo em batelada, a produção de AC do meio contendo peptona foi de  $450 \text{ mg.L}^{-1}$  e a do meio contendo Samprosoy 90 NB foi de  $800 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Roubos *et al.* (2001) estudaram a influência do cisalhamento sobre o crescimento de *Streptomyces clavuligerus* em reatores de 42 litros operados em batelada. A concentração de  $\text{O}_2$  dissolvido foi mantida em valores acima de 50% através da variação da vazão da corrente de alimentação de ar. A velocidade na ponta do impelidor foi variada entre  $0,91$  e  $4,10 \text{ m.s}^{-1}$  (200 a 900 rpm). O estudo concluiu que as células de *Streptomyces clavuligerus* são bastante sensíveis ao cisalhamento. A máxima velocidade específica de crescimento foi  $0,16 \text{ h}^{-1}$  com constante de morte  $k_d = 0,07 \text{ h}^{-1}$ , quando a potência gaseificada aplicada ao caldo atingiu valores acima de  $1,1$ ,  $1,7$  e  $2,0 \text{ kW/m}^3$  para os meios de cultura compostos principalmente por maltose e glutamato; glutamato e glicerol; glutamato e íons amônia, respectivamente. A produção máxima de AC ficou em torno de  $490 \text{ mg.L}^{-1}$  após 72 horas de cultivo.

O processo em batelada pode ser representado por um conjunto de equações que fazem parte dos balanços de massa para células (X), substrato limitante (S) e produto (P) no biorreator.

### 2.4.2 Cultivo em Batelada Alimentada

O termo “cultivo em batelada alimentada” foi introduzido por Yoshida (Yoshida e Yamane 1973 *apud* Hokka e Moraes 1978) para se referir a cultivos em batelada onde há alimentação contínua do meio nutriente sem retirada do caldo (Pirt 1974 *apud* Hokka e Moraes 1978).

O processo em batelada alimentada é aquele no qual inicialmente se introduz o inóculo, o qual deverá ocupar uma fração do volume útil da ordem de 10 a 20% do reator, iniciando-se então a alimentação com o meio de cultura, empregando uma vazão adequada, sem ocorrer a retirada de líquido fermentado. Essa operação prolonga-se até o preenchimento do volume útil do reator, quando então se inicia a retirada do caldo fermentado para a recuperação do produto (Schmidell *et al.*, 2001). Segundo Hokka e Moraes.(1978) este modo de operação é usado principalmente em processos onde ocorre inibição de crescimento ou repressão da formação de produto por excesso de substrato.

O cultivo em batelada alimentada possui várias vantagens em termos da maximização dos lucros por sua alta produtividade, visto o alto crescimento celular e manutenção de condições que evitam a repressão, podendo para tal manipular as variáveis de controle como temperatura, pH e a velocidade de alimentação de substrato (Kim *et al.*, 2001). Este tipo de operação é interessante por possibilitar a manutenção da velocidade de crescimento em altos valores já que a alimentação acaba renovando o meio no fermentador, garantindo um certo controle das fontes necessárias ao crescimento (Betlem *et al.*, 2002).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos relacionados com a produção de AC em batelada alimentada por *Streptomyces clavuligerus*.

Puentes *et al.* (1989) descrevem um processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 em batelada alimentada em escala piloto de 800 litros. Como componentes do meio de cultura inicial, os autores utilizaram farinhas de soja e de amendoim, como fonte de N e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , como fonte de A e de P. Soluções de glicerol com diferentes concentrações foram alimentadas ao biorreator com diferentes vazões em diferentes etapas do longo processo e, após 160 horas de cultivo uma concentração de ácido clavulânico de  $1,4 \text{ g.L}^{-1}$  foi obtida.

Mayer e Deckwer (1996) realizaram experimentos em batelada alimentada com o microrganismo *S. clavuligerus* DSM 738, em biorreator de 10 litros, utilizando glicerol como principal fonte de carbono nos meios de cultura principal e suplementar, farinha de soja ou extrato de farinha de soja como fonte de nitrogênio. Utilizando o extrato de farinha de soja, a produção de ácido clavulânico ocorreu simultaneamente com o crescimento celular, sendo que na fase estacionária do crescimento microbiano a concentração de ácido clavulânico se manteve constante e em alguns casos decresceu. Quando utilizada a farinha de soja, o crescimento celular foi aproximadamente três vezes mais rápido e a concentração de ácido clavulânico aumentou durante todo o processo. A produção máxima de ácido clavulânico foi de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  em 100 horas de cultivo.

Nabais e Fonseca (2000) sugerem um processo de produção de AC por *S. clavuligerus* ATCC 27064 em batelada alimentada com dois tipos de alimentação, contínua e semicontínua, de fontes de nitrogênio, preferencialmente farinha de soja. Utilizando um meio com glicerol e dextrina como fontes de carbono e/ou farinha de soja objetivando a concentração de proteína entre  $0,4$  e  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ . Foram obtidas concentrações entre  $1224$  e  $1607 \text{ mg.L}^{-1}$  de AC para diferentes estratégias de alimentação e concentração de substratos.

Kim *et al.* (2001) estudaram os efeitos da batelada alimentada com glicerol como fonte de carbono na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Utilizou-se um microrganismo melhorado geneticamente imobilizado em pellets de poliuretano, no cultivo em batelada e obteve-se por volta de 3,1 g.L<sup>-1</sup> de AC, representando um aumento de 200% quando comparado com o processo tradicional em batelada alimentada com células livres (1,5 g.L<sup>-1</sup>). No cultivo em batelada alimentada obtiveram 3,25 g.L<sup>-1</sup> tendo um aumento de 220% comparado com o mesmo processo com células livres.

Chen *et al.* (2002) estudaram o emprego de glicerol na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 em culturas em mesa incubadora rotativa (“shaker”). No cultivo em batelada, a degradação do ácido clavulânico teve início após 72 horas e a produção alcançou 115 mg.L<sup>-1</sup>. Nos cultivos em batelada alimentada, objetivou-se ajustar uma velocidade de alimentação de glicerol de modo a estender o período de concentração celular (Cx) constante. A utilização de uma alimentação de glicerol de 250 g.L<sup>-1</sup> em 12 horas fez que o Cx permanecesse num patamar de 10 g.L<sup>-1</sup>, a produção de AC alcançou 280 mg.L<sup>-1</sup> e a degradação teve início após 130 horas.

Chen *et al.* (2003) comparam cultivos em batelada alimentada em frascos agitados, adicionando glicerol, ornitina e arginina no meio suplementar. Concluíram que com exceção do glicerol, alimentações com ornitina e arginina não aumentaram a produção de AC por *S. clavuligerus* ATCC 27064. Com adição de 5mM de ornitina ao cultivo, a produção de AC foi de 200 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto que com glicerol a produção chegou a 220 mg.L<sup>-1</sup>. Alimentando glicerol e ornitina a produção de AC aumentou para 311mg.L<sup>-1</sup>, porém a alimentação com glicerol e arginina mostrou pouco efeito no aumento da produção.

Visto que a maior parte dos trabalhos sobre a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* seguem na mesma linha, utilizando glicerol como principal fonte de carbono e operando com altas concentrações deste no meio suplementar porém com baixas vazões de alimentação, a contribuição deste trabalho está no estudo das influências desta velocidade e também da composição do meio suplementar na produção de AC por *S. Clavuligerus* ATCC 27064. As condições de cultivo e também os meios de cultura utilizados são similares aos utilizados em pesquisas atuais, o que mostra que os resultados do presente trabalho podem ser aplicados em outros trabalhos ou em estudos futuros dentro desta mesma linha de pesquisa.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Microrganismo

Nos ensaios realizados foi utilizada a linhagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, adquirida da American Type Culture Collection. Com o intuito de se evitar problemas ligados a variabilidade genética do microrganismo durante os cultivos, foram preparados estoques de células preservadas em criotubos de 5mL, contendo 3,5mL de células vegetativas congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em solução crioprotetora de glicerol 20% v/v.

#### 3.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados no presente trabalho tiveram como base os trabalhos realizados até o momento na Área de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar referentes à produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.

##### 3.2.1 Meio de cultura de reativação (MR)

O meio de cultura de reativação teve a seguinte composição (em  $\text{g.L}^{-1}$ ): glicerol (15,0); extrato de levedura (1,0); peptona bacteriológica (10,0); MOPS (“3-[N-Morpholino]-propanesulfonic acid”) (21,0);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1,0);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2,5). A solução de sais teve a seguinte composição (em  $\text{g.L}^{-1}$ ):  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1,0),  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1,0),  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1,0).

O pH era ajustado em 6,8 com NaOH e o meio autoclavado por 15 minutos a 120°C.

### **3.2.2 Meio de cultura para preparo de Inóculo (MI)**

O meio de cultura de inóculo (MI) teve a seguinte composição (em g.L<sup>-1</sup>): glicerol (15,0); extrato de levedura (1,0) ; MOPS (“3-[N-Morpholino]-propanesulfonic acid”) (21,0); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,75); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,8); Samprosoy 90NB (20,0); óleo de soja (1,0).

A solução de sais teve a seguinte composição (em g.L<sup>-1</sup>): MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,0), FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1,0), ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1,0). O pH era ajustado em 6,8 com NaOH e o meio autoclavado por 15 minutos a 120°C.

### **3.2.3 Meio de cultura de Produção (MP)**

O meio de cultura de produção (MP) teve a mesma composição do meio de cultura de inóculo (MI) excetuando-se o tampão MOPS e adicionando-se 0,1 g.L<sup>-1</sup> de antiespumante (“Dow Corning Medical Antifoam C Emulsion – 30% Simethicone Emulsion USP”).

### **3.2.4 Meio de cultura Suplementar (MS)**

Foram realizados cultivos em batelada alimentada em diferentes condições. O meio de cultura suplementar ou teve a mesma composição do meio de cultura de

produção variando a concentração de glicerol, denominado completo, ou era composto apenas de glicerol e água destilada.

### **3.3 Métodos Analíticos**

#### **3.3.1 Determinação da Concentração Celular ( $C_x$ )**

Devido à presença de sólidos insolúveis no caldo fermentativo provenientes dos meios de cultura utilizados, a utilização do método tradicional da “massa seca” para determinação da concentração celular ( $C_x$ ) ficou prejudicada, sendo este parâmetro apenas um indicador do crescimento celular. Avaliou-se a concentração celular durante os cultivos em biorreator de bancada indiretamente pelo coeficiente de rendimento de substrato a células ( $Y_{x/s}$ ). Até 24 horas de cultivo utilizando-se  $Y_{x/s}$  igual a 0,574 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> (Baptista–Neto *et al.*, 2000). Após esse tempo de cultivo, a medida foi realizada pelo método tradicional de massa seca.

#### **3.3.2 Determinação da concentração de Glicerol ( $C_s$ )**

O glicerol foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna Shodex KS-802 (Lompak-Warters) e como eluente (fase móvel) água mili-Q. O equipamento foi operado a 34°C, 1,0 mL/min e tempo de retenção de 12 minutos.

As amostras foram diluídas em balões volumétricos e filtradas com a finalidade de primeiro garantir que estivessem dentro da faixa da curva de calibração e segundo

para garantir que estivessem livres de sólidos em suspensão. A curva de calibração foi construída com a injeção de amostras nas seguintes concentrações: 0,1, 0,3 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>.

### 3.3.3 Determinação da Concentração de Ácido Clavulânico (Cp)

A concentração de ácido clavulânico foi avaliada também por CLAE, utilizando coluna C-18  $\mu$ -Bondapak e como eluente uma solução de 100 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 94% (m/v) e metanol a 6% (m/v) e pH 3,2. Foram utilizadas as seguintes condições de operação: temperatura de 28°C, vazão de 1,0 mL/min, comprimento de onda de 311 nm e tempo de retenção de 7 minutos. A concentração de ácido clavulânico foi determinada a partir de uma curva de calibração obtida de soluções de 0-0,5 mM de clavulanato de potássio proveniente do medicamento CLAVULIN<sup>®</sup> da SmithKline Beecham Farmacêutica, disponível comercialmente.

As amostras provenientes dos ensaios foram centrifugadas a 5°C e 10000 rpm por 10 minutos no instante de sua retirada e depois o sobrenadante foi congelado em ultrafreezer a -70°C. No momento da análise as amostras foram descongeladas, diluídas em tampão acetato (pH=4,5, 1:2) e novamente centrifugadas por 5 minutos visando a retirada dos sólidos em suspensão. De cada amostra foi retirada uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante que foi adicionado a uma 0,5 mL de uma solução de imidazol (8,25g em 20mL, pH=6,8 e o volume completado para 50mL), filtrou-se esta nova solução e colocou-se num banho a 30°C por 15 minutos para que ocorresse a reação de derivatização.

### 3.3.4 Caracterização Reológica do Caldo Fermentativo

As medidas reológicas foram realizadas num reômetro digital da Brookfield Engineering Laboratories, Inc., modelo LV-DVIII+, munido de adaptador para pequenas amostras, interface e software RHEOLCALC para execução em ambiente WINDOWS.

Como o caldo de fermentação pode ser considerado um fluido pseudoplástico, o modelo da “Lei de Potência” foi utilizado para descrever a dependência da tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) com o gradiente de velocidade ( $\dot{\gamma}$ ) e estimar os parâmetros reológicos do índice de consistência (K) e índice de comportamento de escoamento (n).

Uma das importâncias de se acompanhar a reologia do caldo é porque os parâmetros reológicos variam ao longo do cultivo e estão relacionados com o crescimento celular. O índice de consistência (K) é um parâmetro estrutural das células, com isso nos permite verificar quantitativamente o crescimento celular em cultivos em batelada e qualitativamente em cultivos em batelada alimentada.

## 3.4 Modelagem Matemática – Equacionamento dos Cultivos

### 3.4.1 Cultivos em Batelada

Para a produção de um metabólito secundário como o AC, supondo ser um produto não associado ao crescimento, Baptista-Neto *et al.* (2000) propuseram através de equações de balanço material a modelagem matemática que segue para expressar a produção em batelada, em reator perfeitamente agitado.

**Balço material para células (X) no instante t:**

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{\max} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \cdot C_x - k_d \cdot C_x \cdot f(C_{s1}) \quad (3.1)$$

Onde  $\mu_{\max}$  é a velocidade específica máxima de crescimento celular,  $K_s$  a constante de saturação,  $k_d$  a constante de morte celular e o termo  $f(C_{s1})$  representa uma função degrau que depende da concentração de glicerol ( $C_{s1}$ ) abaixo da qual se inicia a morte celular.

**Balço material para o substrato (S) no instante t:**

$$\frac{dC_s}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \mu_{\max} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \cdot C_x \quad (3.2)$$

**Balço material para o produto (P) no instante t:**

$$\frac{dC_p}{dt} = \beta \cdot C_x \cdot f(C_{s2}) - k_{dp} \cdot C_p \quad (3.3)$$

Onde  $\beta$  é a constante relacionada com a produção não associada ao crescimento celular,  $k_{dp}$  é a constante de degradação do produto e o termo  $f(C_{s2})$  representa uma função degrau que depende de uma concentração crítica de glicerol ( $C_{s2}$ ) abaixo da qual inicia-se a biossíntese de AC. Tem-se que  $f(C_{s2})$  é inicialmente igual a zero durante o período de repressão catabólica. Quando  $C_s \leq C_{s2}$ ,  $f(C_{s2})$  assume valor igual a 1.

### 3.4.2 Cultivos em Batelada Alimentada

A modelagem do cultivo em batelada alimentada à vazão constante (F) considerando um produto não associado ao crescimento é apresentada a seguir:

**Equação de balanço de massa para as células (X):**

$$\frac{dC_x}{dt} = Y_{X/S} \cdot C_{Se} \cdot D - D \cdot C_x - k_d \cdot C_x \cdot f(C_{S1}) \quad (3.4)$$

Onde D é a vazão específica de alimentação de substrato, ou seja,  $D=F/V$ .

**Equação de balanço de massa para o substrato (S):**

$$\frac{dC_s}{dt} = D \cdot C_{Se} - \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu_{\max} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \cdot C_x \quad (3.5)$$

**Equação de balanço de massa para produto (P), supondo  $\mu_p = \beta$ :**

$$\frac{dC_p}{dt} = \beta \cdot C_x - C_p \cdot (D + k_{dp}) \quad (3.6)$$

### 3.5 Simulações

Utilizando-se a modelagem matemática descrita anteriormente e os parâmetros cinéticos de cultivos em batelada encontrados na literatura, foram realizadas simulações

do processo de produção em batelada alimentada com o objetivo de avaliar o comportamento deste processo em relação à concentração do substrato no meio de cultura, o crescimento da biomassa e a produção de ácido clavulânico.

O modelo foi inicialmente ajustado aos valores experimentais obtidos no cultivo em batelada (B1) utilizando-se o software AnaBio 1.0 (Silva *et al.*, 2003). Este software permite o ajuste visual de modelos a dados experimentais e as simulações utilizando uma cinética de crescimento específica. No presente trabalho foi proposto um modelo supondo cinética de crescimento de Monod com morte celular ( $k_d$ ), produção não associada ao crescimento celular e degradação de produto ( $k_{dp}$ ). Com os dados experimentais do cultivo em batelada foi ajustado visualmente ao modelo proposto, a partir deste ajuste foram simulados cultivos em batelada alimentada com a finalidade de se traçar uma estratégia para os cultivos visando aumento de produção de AC e, posteriormente, foram realizados cultivos para comprovar experimentalmente os resultados simulados.

### **3.6 Procedimento Experimental**

Primeiramente foi realizado um cultivo em batelada denominado “padrão”. Os resultados desse cultivo foram utilizados para o ajuste de um modelo cinético e a produção de AC foi considerada para efeitos comparativos. Em seguida, fazendo-se uso dos parâmetros cinéticos obtidos do ajuste dos resultados do cultivo em batelada, foram simulados cultivos em batelada alimentada a diferentes condições de concentração de glicerol e vazão de alimentação de meio de cultura suplementar.

Posteriormente foram realizados cultivos nas condições simuladas com o intuito de se verificar experimentalmente os resultados previstos.

### 3.6.1 Preservação do Microrganismo-Preparação de Criotubos

A preservação da bactéria *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 na forma de um estoque de criotubos, a partir de sua forma liofilizada se deu da seguinte maneira:

-Preparou-se 5 tubos de ensaio com 5mL de meio de cultura líquido para recuperação contendo: triptona, 5g; extrato de levedura, 3g; água destilada, q.s.p. (1L), pH 7,0-7,2.

-Transferiu-se de 0,5 a 1ml desse meio com pipeta de Pasteur para o frasco de liofilizado para rehidratar o micélio. Retornou-se este volume para o tubo de ensaio original.

-Partindo-se deste tubo inoculou-se os tubos restantes com cerca de 1mL de suspensão sendo os tubos mantidos por um período de 7 a 10 dias a 30°C.

-Passado este período, transferiu-se os conteúdos de cada 2 tubos para o *Erlenmeyers* de 250mL contendo 40mL de meio líquido para propagação de micélio (inóculo de 20% v/v): glicerol, 20,0g; extrato de levedura, 1,0g; peptona bacteriológica, 10,0g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,75g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5g, solução de sais (MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1,0g.L<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0g.L<sup>-1</sup>; ZnS<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0g.L<sup>-1</sup>), 1mL; água destilada, q.s.p. 1L, pH 6,8 ajustado com NaOH.

-Incubou-se em mesa incubadora rotativa a 30°C por 24 horas, após este período diluiu-se as suspensões com glicerol de modo a conter 10% v/v e foram transferidos 3,5 mL desta suspensão para criotubos de 4 mL e estes congelados a -70°C, em ultrafreezer constituindo-se o estoque de trabalho.

### 3.6.2 Reativação

Na etapa de reativação eram inoculados 2 *Erlenmeyers* de 500 mL, contendo 50 mL de meio de reativação (MR), cada um deles com um criotubo. Os *Erlenmeyers* eram mantidos em incubador rotativo por 24 horas, a 28°C e 250 rpm. Ao final, os conteúdos dos dois frascos eram reunidos para utilização na etapa de preparação de inóculo.

### 3.6.3 Etapa de Preparação do Inóculo

Na etapa de preparação do inóculo, 8 *Erlenmeyers* de 500 mL contendo 50mL de meio de inoculação (MI) eram inoculados com 5 mL da suspensão de células obtida na etapa de reativação. Os *Erlenmeyers* eram mantidos em incubador rotativo por 24 horas, a 28°C e 250 rpm. Ao final, os conteúdos dos frascos eram reunidos para a inoculação do bioreator, sendo 400mL para os ensaios em batelada e 250 mL para ensaios em batelada alimentada.

### 3.6.4 Cultivos em Batelada

Foram realizados cultivos descontínuos em biorreator convencional de bancada tipo tanque agitado e aerado, modelo BIOFLO III da New Brunswick Scientific Co. Inc. (USA) de 5 L de capacidade, disponível no laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar. Este modelo de fermentador é munido de controle de pH, temperatura e da concentração de oxigênio dissolvido pela variação automática da frequência de rotação. As condições utilizadas durante os cultivos foram: 800 rpm, 28°C, 0,5 vvm e pH 6,8.

Os ensaios em batelada foram realizados com um volume de 4 L, sendo 3,6 L do meio de produção (MP) descrito no item 3.2.3 e 0,4 L de inóculo, preparado em incubador rotativo (shaker), conforme descrito no item 3.2.2. A Figura 3.1 ilustra a seqüência experimental empregada nos cultivos em batelada.

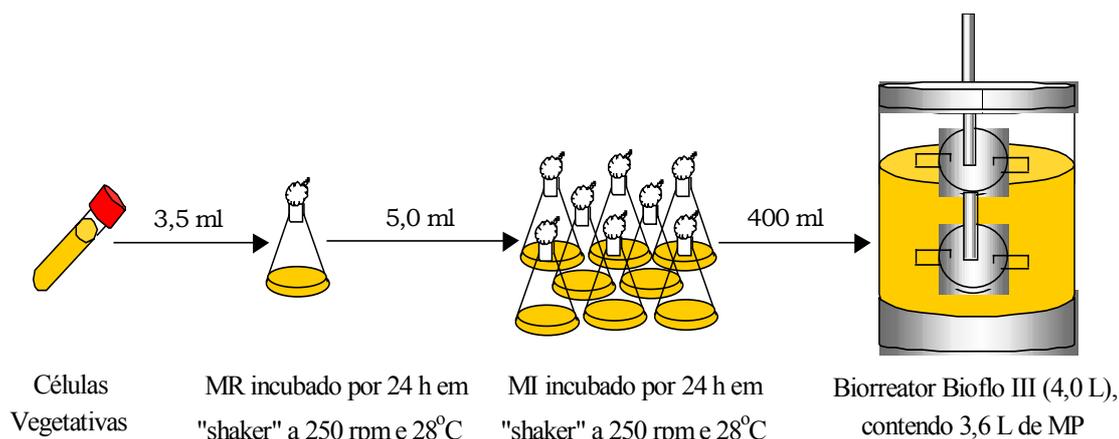


Figura 3.1: Metodologia experimental utilizada nos cultivos em batelada

Foram realizados 4 cultivos em batelada, sendo que dois serviram como um cultivo padrão para os cultivos em batelada alimentada subseqüentes. Os cultivos padrões foram denominados B1 e B3, realizados nas mesmas condições porém com criotubos preparados em épocas diferentes. O cultivo B2 serviu apenas para verificar os problemas com a cultura que estava sendo utilizada. O ensaio B4 foi realizado a fim de se verificar as influencias inibitórias/repressoras do glicerol na produção de AC por *Streptomyces clavuligerus*. Nesse ensaio, foi adicionada uma solução de glicerol de aproximadamente  $19\text{g.L}^{-1}$  na forma de um pulso de 77g de glicerol puro em 24 horas de cultivo.

### 3.6.5 Cultivos em Batelada Alimentada

Nos cultivos em batelada alimentada foram estudadas as influências das composições do meio suplementar (completo ou apenas glicerol) em diferentes concentrações e a vazão volumétrica de alimentação.

Foram realizados cultivos semicontínuos a vazões constantes em biorreatores convencionais de bancada tipo tanque agitado e aerado, BIOFLO III da NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Co. Inc. (USA), disponíveis nos laboratórios de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar, nas mesmas condições de operação empregadas nos cultivos em batelada: 800 rpm, 28°C, 0,5 vvm e pH 6,8.

Os ensaios em batelada alimentada foram realizados com um volume inicial de 2,4 L, sendo 2,16 L de meio de cultura de produção (item 3.2.3) e 0,24 L de inóculo, preparado conforme o item 3.2.2. A Figura 3.2 ilustra a seqüência experimental empregada nos cultivos em batelada alimentada.

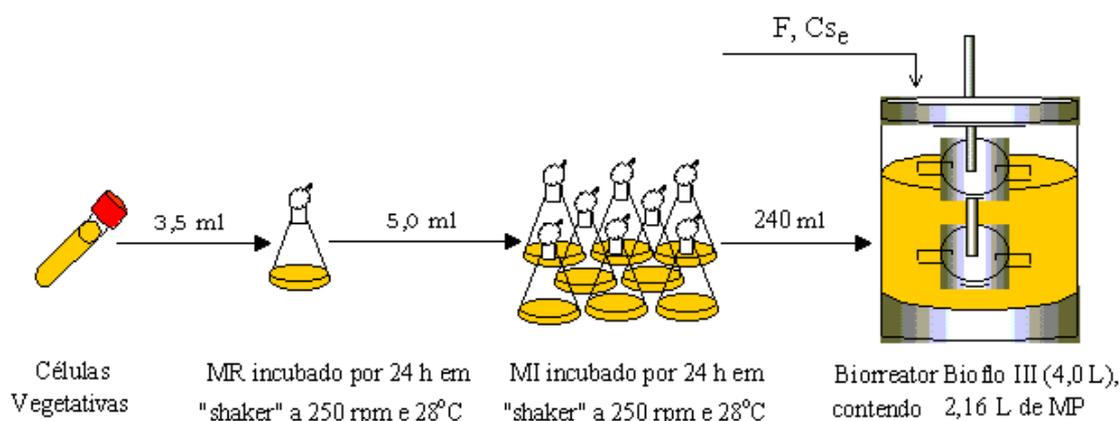


Figura 3.2: Metodologia experimental utilizada nos cultivos em batelada alimentada

Foram realizados 10 cultivos em batelada alimentada, com variações na velocidade de alimentação, na concentração de glicerol e a na composição do meio

suplementar. Os cinco primeiros cultivos foram realizados com criotubos preparados em outubro/2002 e os cultivos seguintes foram realizados com os criotubos mais recentes preparados em junho/2003 devido a problemas descritos posteriormente relacionados com a perda de produtividade do microrganismo.

O ensaio BA1 foi realizado com uma vazão de alimentação de  $0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e uma concentração de glicerol no meio suplementar completo de  $30,0 \text{ g.L}^{-1}$ . O ensaio BA2 apresentou vazão de alimentação de  $0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e uma concentração de glicerol do meio suplementar completo de  $15,0 \text{ g.L}^{-1}$ . O ensaio BA3 foi realizado com a mesma concentração de glicerol do meio suplementar completo, porém com metade da vazão de alimentação, qual seja  $0,042 \text{ L.h}^{-1}$ .

Os ensaios BA4 e BA5, realizados com a mesma concentração de glicerol do meio suplementar completo  $15 \text{ g.L}^{-1}$  porém com vazão de alimentação distintas,  $0,084$  e  $0,042 \text{ L.h}^{-1}$ , respectivamente. Estes dois cultivos alcançaram baixas concentrações de AC devido à perda de produtividade dos criotubos, como será apresentado posteriormente.

Os ensaios BA6 e BA7 foram repetições dos cultivos BA5 e BA4 visando, após preparação de novo estoque de criotubos, avaliar qual a real produção máxima alcançada nestas condições de cultivo já que nos dois primeiros cultivos esta informação foi deturpada pelos problemas já descritos.

Os ensaios BA8 e BA9 foram cultivos na qual a alimentação foi composta somente por glicerol e água. Tentou-se neste tipo de cultivo verificar a influência da composição do meio de cultura na produção de AC, já que o cultivo BA10 foi realizado as mesmas condições do BA9, porém com meio de alimentação completo. A Tabela 3.1 apresenta as condições experimentais empregadas nos cultivos.

Os ensaios em batelada alimentada foram realizados de forma a se ter bateladas alimentadas repetidas, isto é, quando o volume do reator atingia os 4L estipulados como o volume máximo do reator era então realizada a retirada de 1,6L de caldo de fermentação, utilizando-se uma bomba de alta vazão, desta forma o cultivo podia continuar até tempos maiores.

Tabela 3.1: Ensaios realizados para cultivos em Batelada e Batelada Alimentada (B: batelada, BA: batelada alimentada, B4\* :batelada com pulso)

<b>Cultivo</b>	<b>Criotubos</b>	<b>F (L.h<sup>-1</sup>)</b>	<b>C<sub>s<sub>e</sub></sub> (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Meio suplementar</b>
B1	outubro/2002	-	-	-
BA1	outubro/2002	0,084	30	completo
BA2	outubro/2002	0,084	15	completo
BA3	outubro/2002	0,042	30	completo
BA4	outubro/2002	0,084	15	completo
BA5	outubro/2002	0,042	15	completo
B2	outubro/2002	-	-	-
B3	junho/2003	-	-	-
BA6	junho/2003	0,042	15	completo
B4*	junho/2003	-	-	-
BA7	junho/2003	0,084	15	completo
BA8	junho/2003	0,042	30	glicerol
BA9	junho/2003	0,020	60	glicerol
BA10	junho/2003	0,020	60	completo

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Cultivo em Batelada B1 (outubro/2002)

Inicialmente, foi realizado um cultivo tradicional em batelada (B1) com o intuito dos seus resultados servirem de comparação com aqueles dos demais cultivos em batelada alimentada (BA). Os resultados desse cultivo estão ilustrados na Figura 4.1.

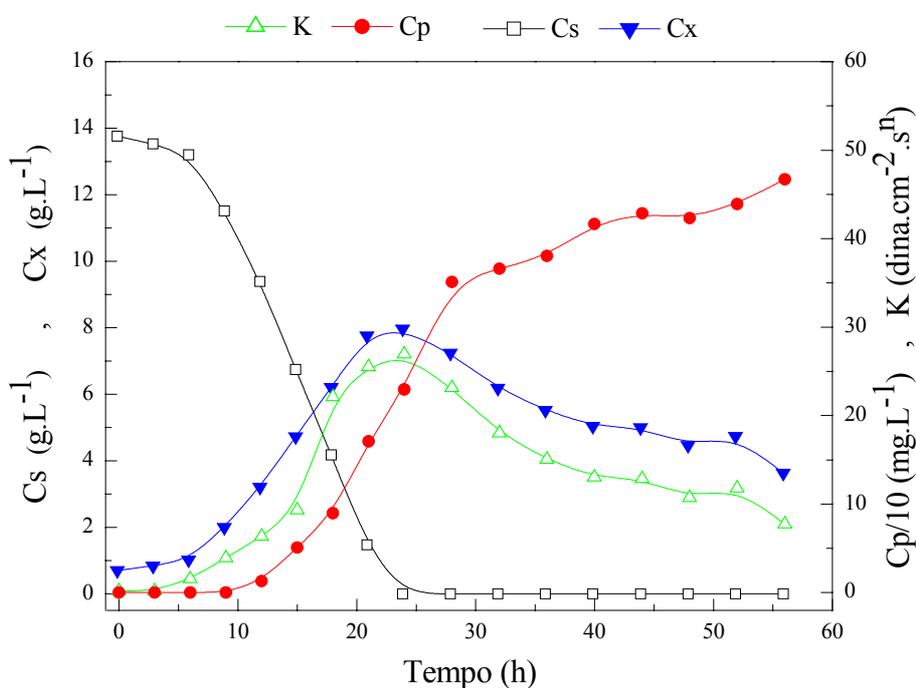


Figura 4.1: Resultados obtidos no cultivo em batelada B1

A produção de AC teve início quando a concentração de glicerol (Cs) se encontrava abaixo de 10 g.L<sup>-1</sup>, em consonância com os resultados obtidos por Baptista-Neto *et al.* (2000). Observa-se que após o término do glicerol ocorreu uma diminuição brusca da “velocidade líquida” de produção de AC (produção menos degradação) representada pela variação da concentração de produto com o tempo (dCp/dt) em paralelo com um decréscimo da concentração celular (Cx) em virtude do início do

período de morte celular. Observou-se que em 21 horas de cultivo a concentração de glicerol (Cs) já se encontrava em níveis inferiores a  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ .

O índice de consistência (K) está diretamente relacionado com a saúde estrutural ou com a viabilidade do micélio, sendo assim os resultados deste e dos demais cultivos concordam com os obtidos por Sebastine *et al.* (1999).

O papel especial que o glicerol apresenta na produção de AC, uma vez que o mesmo atua como precursor, mas, dependendo dos níveis de concentração, pode inibir e até reprimir a biossíntese de AC, orientou as condições dos cultivos em batelada alimentada subseqüentes.

Os resultados experimentais de Cx, Cs e Cp ao longo do tempo obtidos neste cultivo foram utilizados para o ajuste do modelo cinético representado pelas Equações 3.1, 3.2 e 3.3, empregando o software AnaBio 1.0 (Silva *et al.*, 2003), que fornece um ajuste visual. Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos no “ajuste” que tiveram como base os obtidos por Baptista-Neto *et al.* (2000), foram os seguintes:  $\mu_{\max}=0,207 \text{ h}^{-1}$ ,  $K_s=6,0 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $k_d=0,03 \text{ h}^{-1}$ ,  $Y_{x/s}=0,574 \text{ g}_x \cdot \text{g}_s^{-1}$ ,  $\beta=0,003 \text{ g}_p \cdot \text{g}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $k_{dp}=0,02 \text{ h}^{-1}$ ,  $C_{s1}=0,5 \text{ g.L}^{-1}$  e  $C_{s2}=9,4 \text{ g.L}^{-1}$ . O bom ajuste do modelo aos valores experimentais obtidos no cultivo em batelada B1 pode ser observado na Figura 4.2.

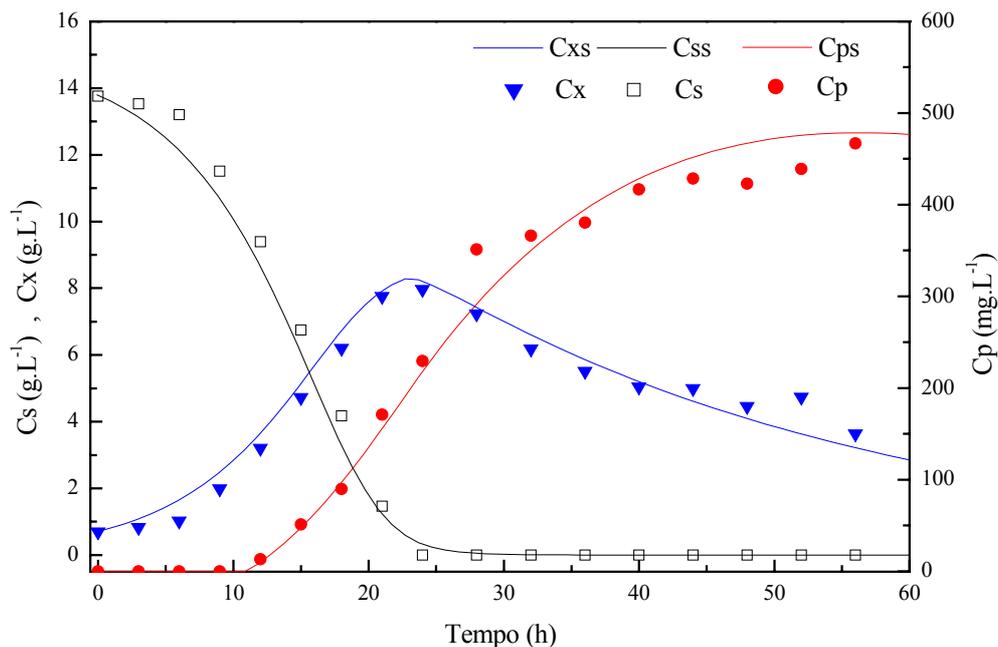


Figura 4.2: Ajuste do modelo cinético dado pelas Equações 3.1, 3.2 e 3.3 para o cultivo em batelada B1 (as linhas correspondem aos valores simulados)

#### 4.2 Cultivos em Batelada Alimentada BA1, BA2 e BA3 (outubro/2002)

Como estratégia inicial do presente trabalho, os resultados experimentais e os ajustes obtidos no cultivo em batelada B1 serviram de base para a definição das condições experimentais dos cultivos seguintes realizados em batelada alimentada. Como na presença de glicerol, a “velocidade líquida” de produção de AC teve o maior valor, utilizou-se o valor correspondente de velocidade de consumo de glicerol ( $r_{sx}$ ) nessa etapa qual seja  $r_{sx}=dCs/dt=0,783 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , e a condição de “pseudo-estado estacionário” (que considera que todo o glicerol alimentado é totalmente consumido para o crescimento celular ( $F.Cs_e=r_{sx}.V$ )), para definir os valores da vazão volumétrica (F) e da concentração de glicerol dos meios de cultura suplementares ( $Cs_e$ ).

Inicialmente, fixou-se a concentração de glicerol do meio suplementar ( $C_{s_e}$ ) como sendo a mesma do início da etapa em batelada ( $C_{s_e}=C_{s_0}=15 \text{ g.L}^{-1}$ ). Definido o volume inicial da etapa em batelada alimentada  $V_0=2,4 \text{ L}$  e o final  $V_F=4 \text{ L}$ , uma vazão volumétrica média pôde ser calculada como sendo  $F=0,16 \text{ L.h}^{-1}$ . Como o produto  $F.C_{s_e}=2,50 \text{ g.h}^{-1}$  apresentou um valor considerado alto com base em trabalhos recentes (Chen *et al.*, 2002; Battaglia, 2003), definiu-se como ponto de partida a condição  $F.C_{s_e}=1,25 \text{ g.h}^{-1}$ , metade da inicialmente proposta sendo esta considerada para definir as demais condições de operação. Logo, para  $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $F=0,084 \text{ L.h}^{-1}$ . Considerou-se ainda a condição de cultivo com  $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$  com  $F=0,042 \text{ L.h}^{-1}$  para manter o produto  $F.C_{s_e}$  constante e as condições “cruzadas” de  $F$  e  $C_{s_e}$ . As condições de cultivo definidas estão apresentadas na Tabela 3.1. Com esses valores, foram realizadas simulações utilizando agora o modelo para o cultivo em batelada alimentada (Equações 3.4, 3.5 e 3.6) de modo a prever a produção esperada de AC. A Figura 4.3 ilustra as simulações para os cultivos em batelada alimentada BA1, BA2 e BA3, juntamente com os resultados experimentais de concentração de AC.

Observa-se que apenas em um dos cultivos a curva simulada teve comportamento próximo dos resultados experimentais. Entre os três ensaios em batelada alimentada, o melhor ajuste foi obtido para o cultivo que não foi provavelmente afetado pelos fenômenos de inibição e/ou repressão pelo glicerol ou outra substância. O cultivo BA2 aliou condições para que isso acontecesse, alta vazão de alimentação ( $F$ ) que favoreceu a diluição do caldo com baixa concentração de substrato ( $C_{s_e}$ ) que evitam a ocorrência de inibição e/ou repressão na produção de AC.

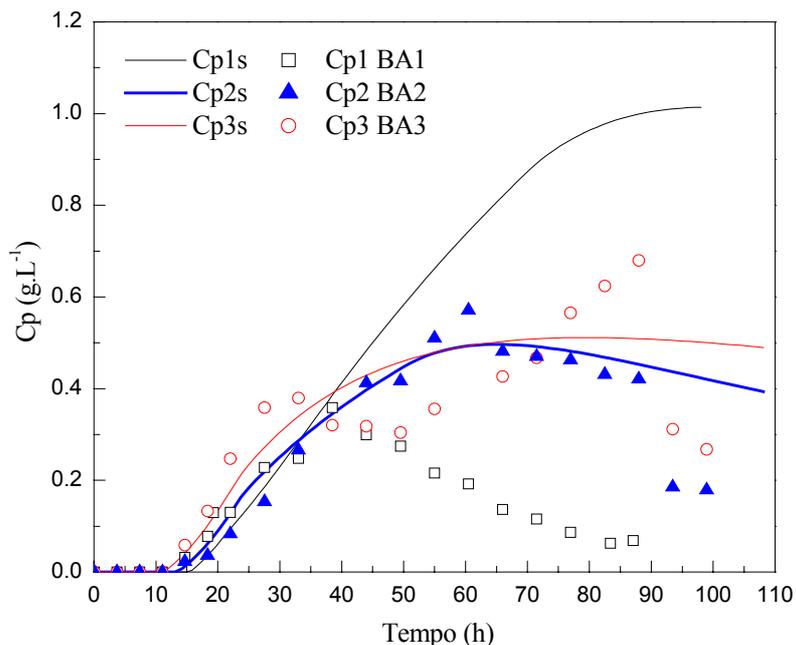


Figura 4.3 Simulações e resultados experimentais da concentração de AC para os cultivos BA1 ( $F=0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$ ), BA2 ( $F=0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$ ) e BA3 ( $F=0,042 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$ )

Os efeitos de repressão e/ou inibição não puderam ser previstos pelo modelo clássico proposto (item 3.4), o que explica porque os ajustes aos pontos experimentais na etapa de batelada alimentada ficaram tão distantes.

Sugere-se que a utilização de glicerol em altas concentrações em cultivos em batelada ou no caso de batelada alimentada, quando a velocidade de alimentação é superior à velocidade de consumo pelo microrganismo, há acúmulo no caldo gerando inibição ou mesmo repressão da biossíntese de AC.

#### 4.2.1 Cultivo em Batelada Alimentada BA1 (outubro/2002)

No cultivo BA1 a alimentação foi iniciada após 21 horas da inoculação nas seguintes condições,  $F=0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$ , de modo a garantir a estabilidade do

processo e assegurar o crescimento celular da etapa inicial em batelada. A Figura 4.4 ilustra os resultados do cultivo BA1.

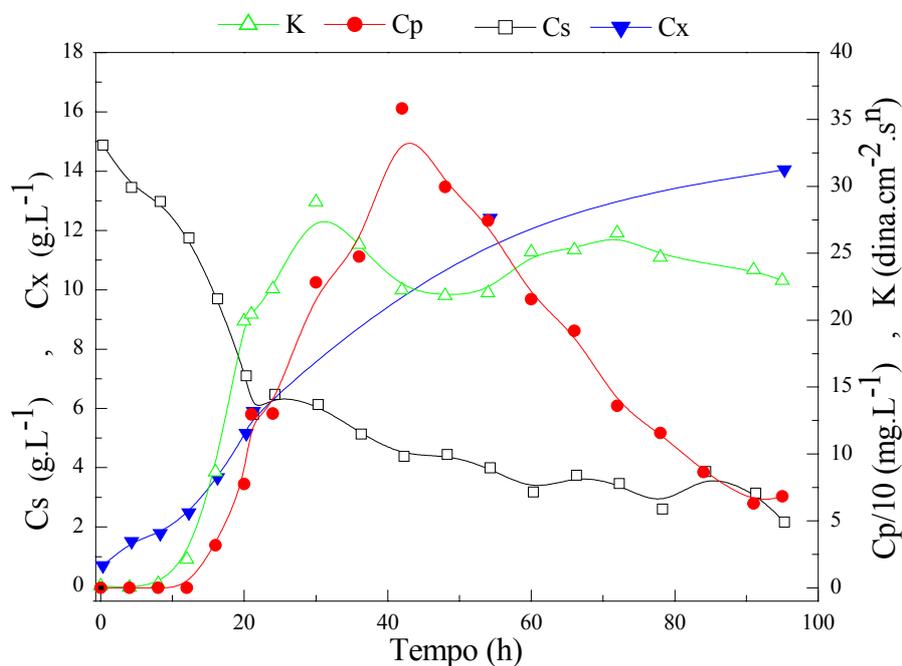


Figura 4.4: Cultivo em batelada alimentada, BA1 ( $F=0,08 L.h^{-1}$  e  $C_{s_e}=30 g.L^{-1}$ )

Em relação à produção de AC, pode-se observar que esta apresentou uma alta velocidade atingindo um valor máximo de concentração de AC ( $C_p$ ) de  $358,0 mg.L^{-1}$  em 42 horas de cultivo. Logo após este pico,  $C_p$  começou a decrescer rapidamente, o que pode ter sido causado pelo efeito de repressão por parte da alta concentração e, por consequência, da alta velocidade de consumo de glicerol. A existência da repressão pode ser caracterizada pelo ajuste do modelo de degradação de 1ª ordem aos dados experimentais de  $C_p$  na região de queda, desconsiderando que nessa etapa haja síntese de AC. O ajuste desse modelo levou à estimativa da constante de degradação ( $k_{dp}$ ) de  $0,016 h^{-1}$ , valor próximo àqueles obtidos por Mayer e Deckwer *et al.*, (1996) e Roubos *et al.* (2001) em cultivos a pH 7,0; o que favorece a hipótese da ocorrência de repressão catabólica ou de uma forte inibição da síntese de AC.

#### 4.2.2 Cultivo em Batelada Alimentada BA2 (outubro/2002)

O cultivo BA2 ( $F=0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$ ) operou com o mesmo valor de  $F$  do cultivo BA1 e com  $C_{s_e}$  igual à metade, de modo que o produto  $F \cdot C_{s_e}$  (em  $\text{g.s.h}^{-1}$ ) fosse a metade do cultivo BA1. A Figura 4.5 apresenta os perfis de valores de  $K$ ,  $C_p$ ,  $C_s$  e  $C_x$  ao longo do cultivo BA2.

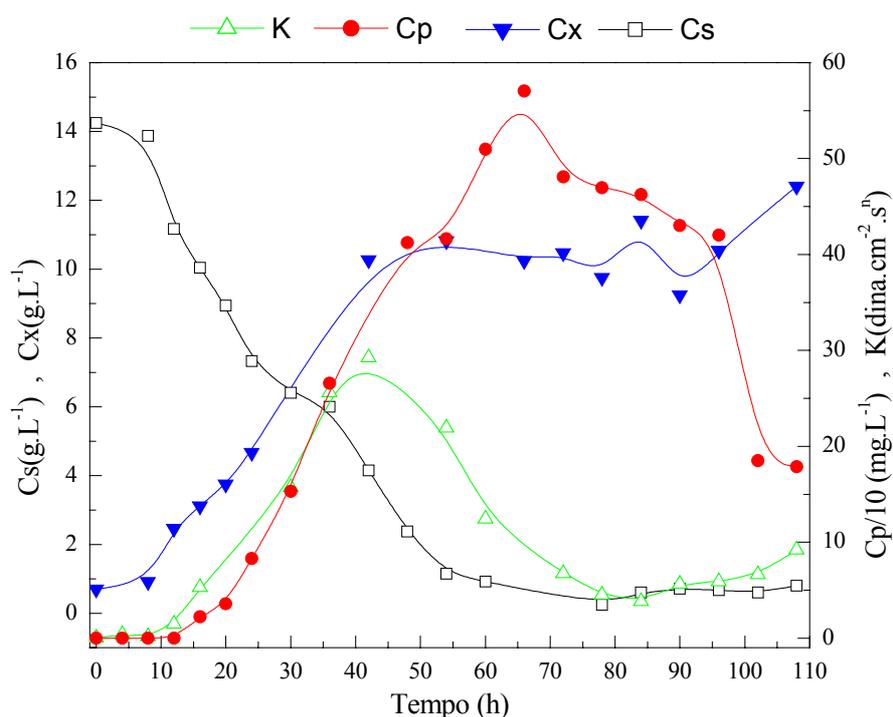


Figura 4.5: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada BA2 ( $F=0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$ )

A concentração celular ( $C_x$ ) alcançou um patamar em torno  $11 \text{ g.L}^{-1}$ , mantendo-se nesse valor praticamente durante todo o cultivo. Diferentemente do ocorrido no cultivo BA1, observa-se no cultivo BA2 um contínuo decréscimo em  $C_s$  após o início da alimentação de meio suplementar até valores próximos de zero, o que possivelmente resultou no crescente aumento de  $C_p$ . Ainda, a diminuição de  $C_p$  neste cultivo foi bem

mais lenta, mas a partir de um determinado momento apresentou o mesmo perfil, o que talvez seja devido ao acúmulo de metabólitos no caldo.

Este ensaio apresentou uma boa produção de AC durante todo o cultivo com um alto  $dC_p/dt$  até 66 horas, alcançando uma concentração máxima de produto em torno de  $580 \text{ mg.L}^{-1}$ , depois deste período a concentração de produto decaiu.

#### **4.2.3 Cultivo em Batelada Alimentada BA3**

O cultivo BA3 ( $F=0,042 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{se}=30 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi operado com a mesma concentração de substrato no meio suplementar ( $C_{se}$ ) que o cultivo BA1, porém com uma velocidade de alimentação ( $F$ ) equivalente à metade, sendo que a alimentação teve início em 24 horas de cultivo. A Figura 4.6 ilustra os resultados obtidos no cultivo BA3. Como era esperado, a concentração celular ( $C_x$ ) aumentou durante todo o cultivo devido ao fato da concentração no meio suplementar ( $C_{se}$ ) ser o dobro da inicial ( $C_{s0}$ ), apresentando um decréscimo apenas no início da alimentação. O índice de consistência ( $K$ ) sofreu novamente variações oscilatórias ao longo do cultivo, marcado por um crescimento inicial e um rápido declínio após o início da alimentação, concomitantemente com o decréscimo de  $C_p$ . As variações em  $C_x$  e  $K$  podem ser explicadas pela influência da diluição, depois que se inicia a alimentação, aliada à influência da viabilidade celular.

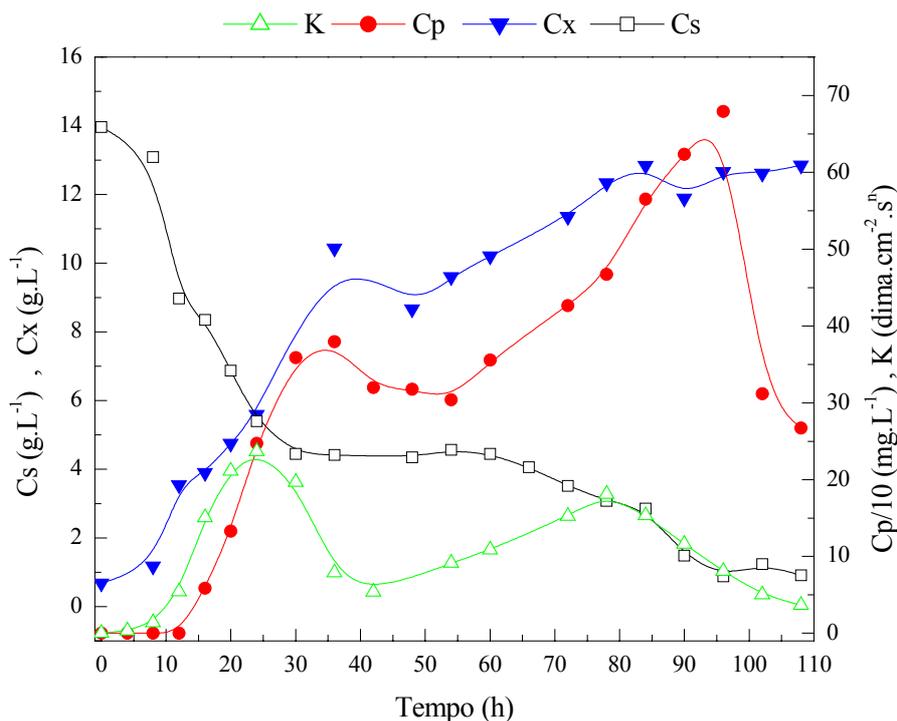


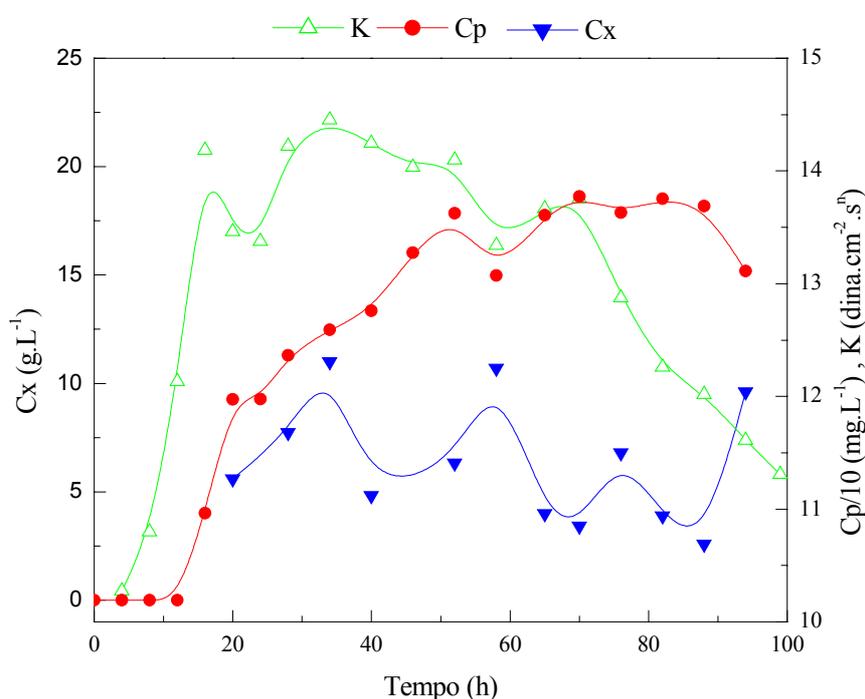
Figura 4.6: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada BA3 ( $F=0,042 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$ )

A concentração de AC ( $C_p$ ) máxima foi de  $680 \text{ mg.L}^{-1}$  em 96 horas de cultivo. A velocidade de produção, alta na etapa em batelada, decai após o início alimentação. Esta diminuição na velocidade de produção provavelmente tenha ocorrido por efeitos de inibição e/ou repressão causados pela alta concentração e, por consequência, pela alta velocidade de consumo de glicerol. Observa-se que a retomada do aumento de  $dC_p/dt$  com o tempo ocorre simultaneamente com um período de decréscimo de  $C_s$  com o tempo. Depois do pico de produção de AC,  $C_p$  entra em declínio assim como os valores de  $K$ , fato que pode estar relacionado ao acúmulo do próprio AC e de outros metabólitos no caldo.

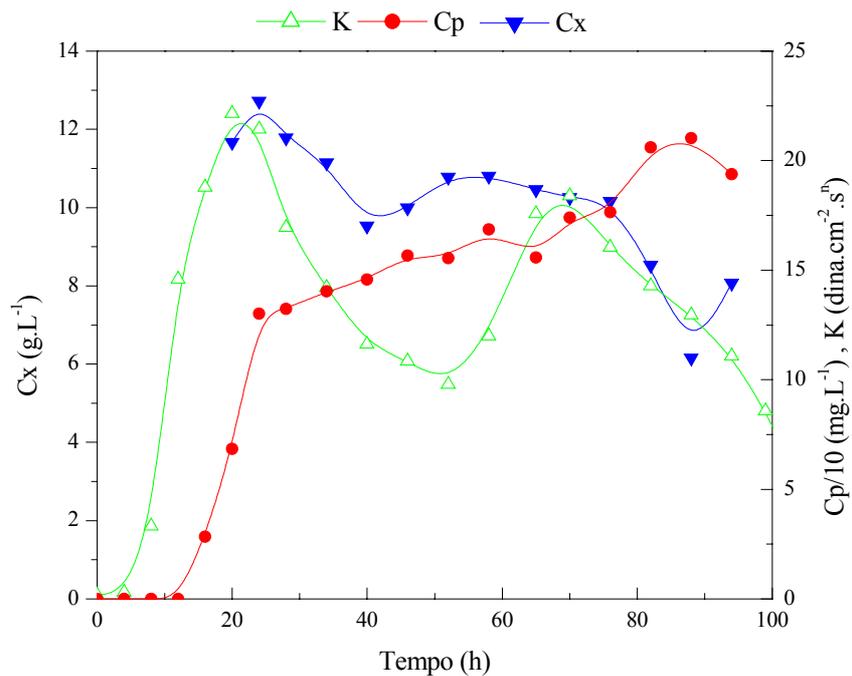
### 4.3 Cultivos em Batelada Alimentada, BA4 e BA5 (outubro/2002)

O ensaio BA4 ( $F=0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi uma repetição do ensaio BA2 já que este cultivo apresentou problemas operacionais que poderiam ter afetado os valores reais alcançados. O ensaio BA5 ( $F=0,042 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi realizado com o intuito de se minimizar os efeitos de repressão e/ou inibição que provavelmente ocorreram nos ensaios anteriores, já que para este ensaio foi utilizada uma velocidade de alimentação menor com uma mesma concentração de glicerol.

Porém, como pode ser observado nas Figuras 4.7 (a) e (b), a concentração de produto para estes dois ensaios alcançou valores menores que o esperado. Para o ensaio BA4 o valor máximo de concentração de AC ( $C_{p_{\max}}$ ) foi de  $186 \text{ mg.L}^{-1}$ , muito inferior ao  $C_{p_{\max}}$  do ensaio BA2 ( $570 \text{ mg.L}^{-1}$ ), cerca de 3 vezes menor.



(a)



(b)

Figura 4.7: Resultados dos cultivos em Batelada Alimentada: (a) BA4 ( $F=0,084 L.h^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 g.L^{-1}$ ) e (b) BA5 ( $F=0,042 L.h^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 g.L^{-1}$ )

Visto que estes novos ensaios, BA4 e BA5, não apresentaram nenhum tipo de problema em sua execução, devido aos resultados insatisfatórios decidiu-se fazer um teste para a verificação da capacidade produtora da linhagem em relação ao AC, já que em termos de concentração celular e consumo de substrato não foram notadas grandes mudanças.

#### 4.4 Cultivo em Batelada B2 (maio/2003)

O ensaio B2 (maio/2003) foi realizado com o intuito de se verificar a perda de produtividade do microrganismo. Este ensaio foi realizado nas mesmas condições do

ensaio B1, alcançando uma concentração máxima de AC de 239,0 mg.L<sup>-1</sup> em 40 horas de cultivo, valor cerca da metade do obtido no cultivo B1, qual seja 467,0 mg.L<sup>-1</sup> em 56 horas.

#### **4.4.1 Perda da Capacidade Produtora – Preparação de Novo Estoque de Criotubos**

Os primeiros criotubos utilizados foram preparados em outubro de 2002 e serviram para a realização do primeiro ensaio em batelada (B1) e para os cultivos em batelada alimentada seguintes (BA1, BA2, BA3, BA4 e BA5), porém nos cultivos BA4 e BA5 foi observada a perda da capacidade de produção de AC informando assim a ocorrência de problemas no estoque de criotubos que estavam sendo utilizados nos cultivos. A partir da comprovação da perda da capacidade produtora da linhagem *Streptomyces clavuligerus* utilizada como estoque de trabalho, viu-se a necessidade de se preparar um novo estoque de criotubos a partir do procedimento descrito no item 3.6.1. Esse novo lote de criotubos levou à necessidade da realização de um novo ensaio em batelada, denominado cultivo B3, que serviu de padrão aos cultivos seguintes (BA6, BA7, BA8, BA9, BA10 e B4).

Fez-se então necessário a preparação de uma nova leva de criotubos para que os resultados dos ensaios seguintes pudessem ser comparativos com os já realizados. O novo estoque de trabalho foi preparado em junho de 2003 e após a preparação dos criotubos um novo ensaio em batelada foi realizado para servir de padrão aos ensaios seguintes. Este cultivo, denominado B3 embora tenha tido uma concentração de AC menor que o cultivo B1, obteve uma produtividade maior.

Os ensaios seguintes, BA6, BA7, BA8, BA9, BA10 e B4, foram realizados com esta nova leva de criotubos e apresentaram resultados em relação ao produto AC muito semelhantes aos dos cultivos anteriores.

#### 4.5 Cultivo em Batelada B3 (junho/2003)

Os resultados do cultivo B3 estão ilustrados na Figura 4.8. O ensaio em batelada B3 apresentou um consumo de substrato ( $C_s$ ) muito semelhante ao do ensaio B1. A concentração máxima de produto obtida no ensaio B1 foi  $467 \text{ mg.L}^{-1}$ , enquanto no ensaio B3 obteve-se  $355 \text{ mg.L}^{-1}$ . Embora o cultivo B3 tenha apresentado  $C_{p_{\max}}$  relativamente menor que o obtido no cultivo B1, o valor encontrado garantiu a capacidade produtora do microrganismo o que levou à continuidade do trabalho.

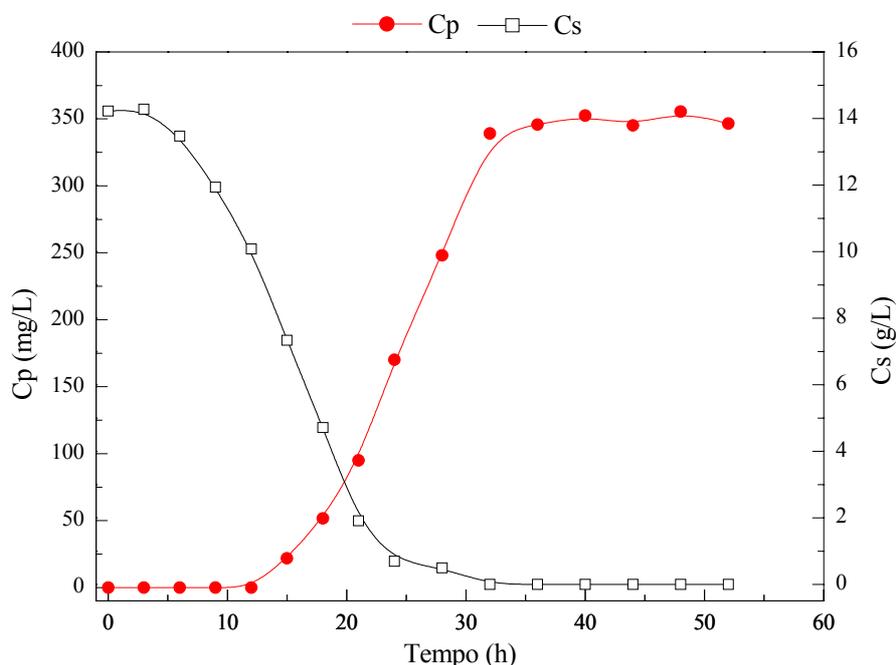


Figura 4.8: Resultados do cultivo em Batelada B3 realizado com o novo estoque de criotubos (junho/2003)

#### 4.6 Cultivos em Batelada Alimentada BA6 e BA7 (junho/2003)

Os ensaios BA6 ( $F=0,042 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$ ) e BA7 ( $F=0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$ ) foram réplicas dos ensaios BA5 e BA2, respectivamente, visto que estes dois ensaios tiveram problemas quanto a perda da capacidade produtora dos criotubos utilizados até então.

No cultivo BA6, cujos resultados estão apresentados na Figura 4.9, a alimentação foi iniciada após 24 horas do início da etapa em batelada. A concentração celular ( $C_x$ ) aumentou durante o cultivo todo, apresentando um decréscimo apenas na etapa final do cultivo, após 60 horas. O índice de consistência ( $K$ ) apresentou um perfil marcado por um crescimento inicial e um rápido declínio após o início da alimentação. O índice de comportamento de escoamento ( $n$ ) apresentou um perfil decrescente no início do cultivo e depois do início da alimentação aumentou, permanecendo a um valor próximo de 0,34.

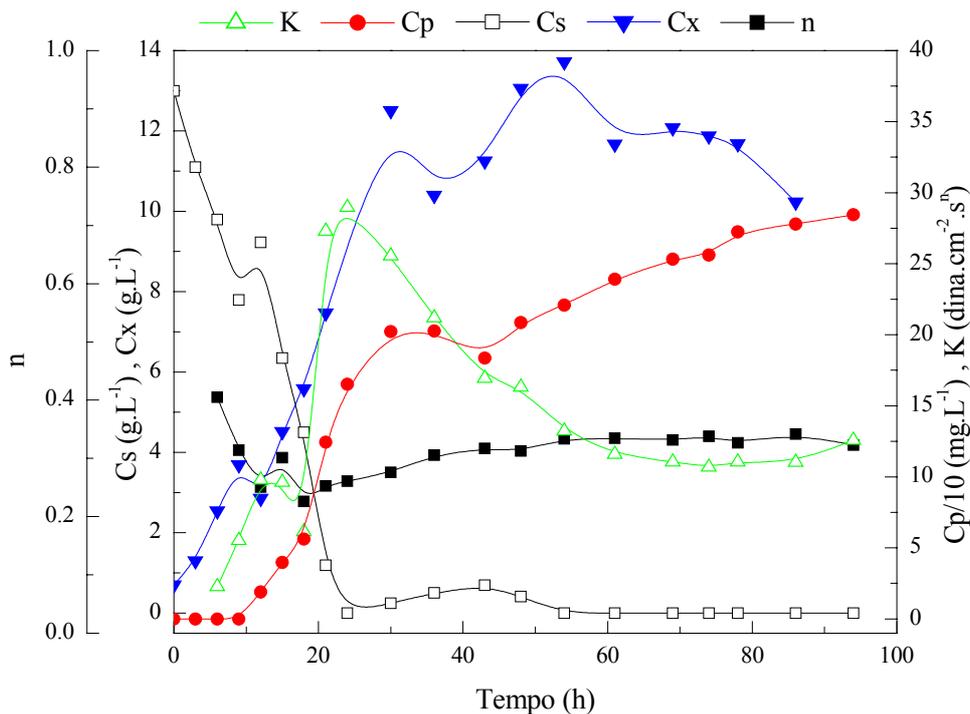


Figura 4.9: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada BA6 ( $F=0,042 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )

Em relação à concentração de AC ( $C_p$ ), o valor máximo obtido de  $284 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  em 96 horas, esta abaixo do valor esperado, porém comparando-se com os resultados do cultivo B3 (novo padrão), este valor está coerente com os encontrados anteriormente. Um dos problemas que podem ter gerado esta menor produção pode ter sido a concentração de glicerol ( $C_s$ ) que permaneceu em torno de zero durante grande parte do cultivo.

O cultivo BA7 apresentou um perfil do índice de consistência ( $K$ ) variante ao longo do cultivo mostrando a influência da vazão de alimentação. Pode-se observar também que o índice de comportamento de escoamento ( $n$ ) não foi tão sensível à mudança na vazão de alimentação já que apresentou um perfil parecido com o do cultivo BA6.

A concentração celular ( $C_x$ ) alcançou um patamar em torno de  $12 \text{ g.L}^{-1}$  aumentando durante todo o cultivo. A concentração de glicerol ( $C_s$ ) mostrou o perfil esperado apresentando um declínio com o aumento de  $C_x$ , porém pôde-se observar que  $C_s$  permaneceu em valores em torno de  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  até o final do cultivo o que ocasionou uma maior concentração de AC, com um  $C_{p\text{Max}}$  em torno de  $450 \text{ mg.L}^{-1}$  em 90 horas de cultivo.

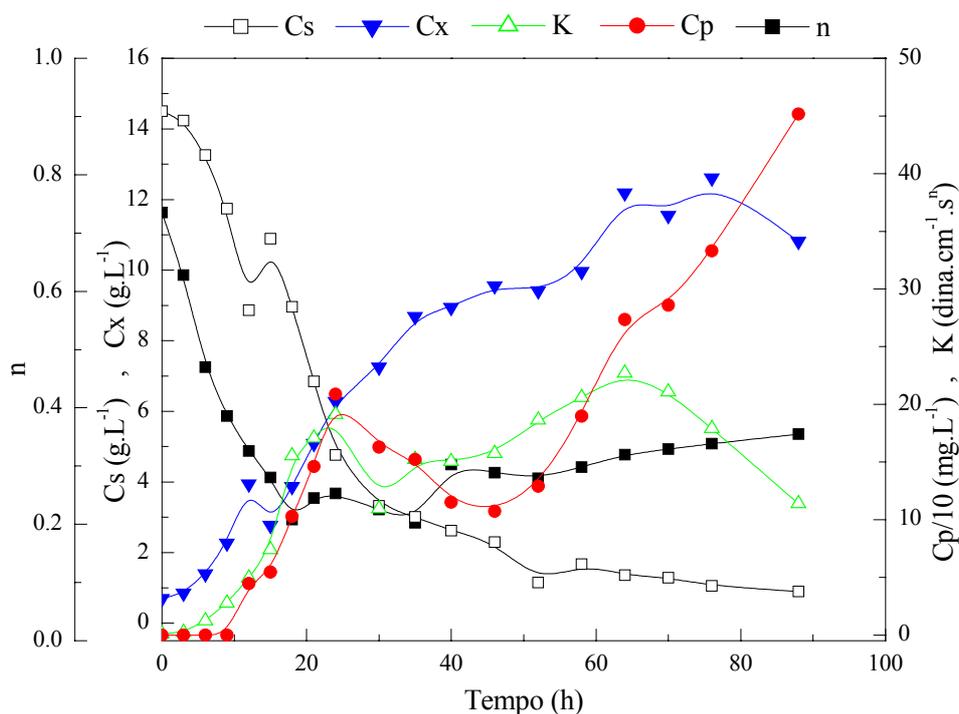


Figura 4.10: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada BA7 ( $F=0,084 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$ )

Nota-se que nos dois ensaios, BA6 e BA7, que os efeitos de inibição e/ou repressão não apareceram como nos ensaios anteriores o que nos levou a outra hipótese para a possível interferência na produção de AC, a de que outros componentes do meio de cultura estivessem causando tais efeitos. Para comprovar esta hipótese foi realizado um ensaio em batelada em que foi injetado um pulso de solução de glicerol de modo a avaliar sua influência como inibidor e/ou repressor da produção de AC.

#### 4.7 Cultivo em Batelada B4 com Pulso (junho/2003)

Este novo ensaio em batelada foi realizado com o intuito de se verificar o real papel do glicerol no meio de cultura e como precursor-inibidor-repressor na formação de AC. Os resultados do cultivo B4 estão apresentados na Figura 4.11.

Foi adicionado um pulso de glicerol puro em 24 horas de cultivo, aumentando a concentração no meio de 5 para aproximadamente 25 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. Nessa concentração não se notou no cultivo nenhuma resposta instantânea nos valores de Cp, como era esperado. A concentração celular manteve-se num valor próximo a 10 g.L<sup>-1</sup> o que é um bom valor para ensaios em batelada. A concentração de glicerol apresentou o perfil esperado com o pulso. A concentração máxima de produto de 326 mg.L<sup>-1</sup> em 40 horas, foi compatível com os resultados de outros cultivos em batelada, tendo um perfil decrescente com o tempo de forma mais acentuada ao final do cultivo alcançando uma concentração de AC por volta dos 250 mg.L<sup>-1</sup>.

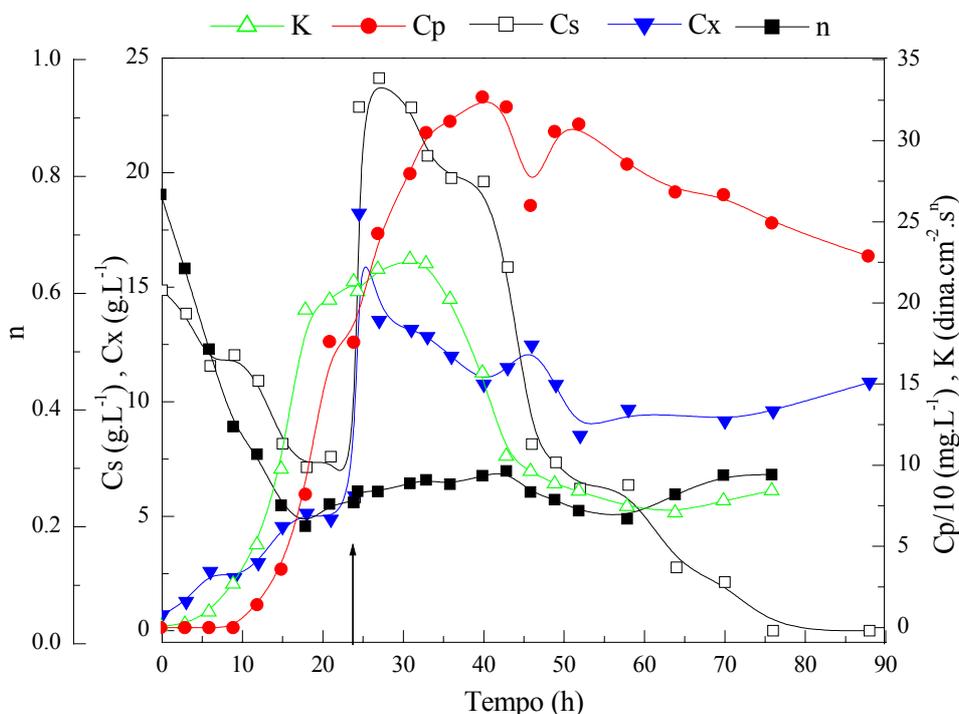


Figura 4.11: Resultados do cultivo em batelada B4 com pulso, indicado pela seta

Com os resultados obtidos neste cultivo, pode-se comprovar que o glicerol, ao menos nessa faixa de concentração, não inibiu e/ou reprimiu a produção de AC o que descartou as hipóteses levantadas até o momento. Uma nova hipótese de que outros componentes presentes no meio de cultura suplementar poderiam estar causando tais efeitos foi levantada e as principais suspeitas recaíram sobre as outras fontes essenciais ao microrganismo como a fonte de nitrogênio, no caso Samprosoy 90 NB, fonte de fósforo e potássio ( $K_2HPO_4$ ) ou até mesmo na concentração de sais presentes no meio. Para avaliar a influência pura do glicerol na produção de AC, decidiu-se pela realização de um cultivo nessas condições do cultivo BA3 ( $F=0.042 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$ ) que forneceu até o momento a maior produção de AC, no entanto, utilizando uma solução de glicerol em substituição ao meio suplementar completo.

#### **4.8 Cultivo em Batelada Alimentada BA8 (junho/2003)**

O cultivo BA8 em batelada alimentada apresentou como meio suplementar, uma solução de glicerol em água destilada, numa concentração de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  alimentada a  $0.042 \text{ L.h}^{-1}$ . O objetivo de se realizar este ensaio foi o de verificar se os componentes do meio suplementar estavam causando os efeitos negativos observados nos ensaios. A idéia de se usar apenas glicerol na alimentação surgiu após a execução do ensaio B4 e também de referências recentes da literatura em trabalhos na mesma linha de pesquisa (Chen *et al.*, 2002; 2003) que utilizaram apenas glicerol no meio de cultura suplementar. Os resultados obtidos no cultivo BA8 estão ilustrados na Figura 4.12.

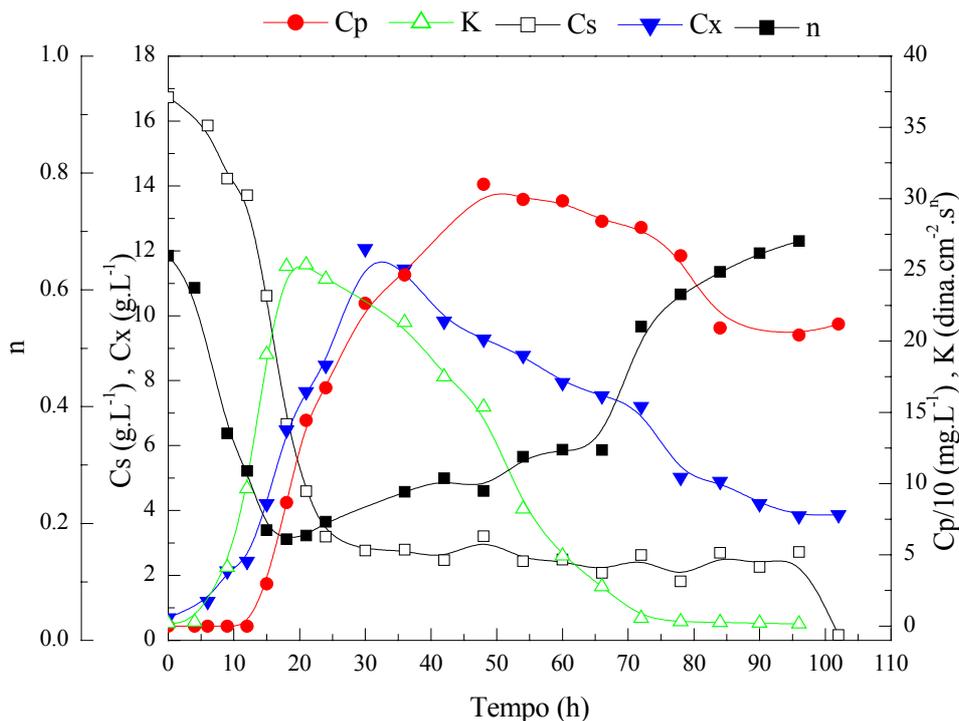


Figura 4.12: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada, BA8 ( $F=0,042 \text{ L.h}^{-1}$  e  $Cs_e=30 \text{ g.L}^{-1}$ ), com meio suplementar composto de solução de glicerol

Observa-se dos resultados que a forma de condução do cultivo levou não ao aparecimento dos efeitos antes observados de diminuição de  $C_p$  após o início da alimentação de meio suplementar. A possível exaustão de nutrientes somada à diluição do caldo, levou a uma diminuição considerável na concentração celular, de cerca de  $12 \text{ g.L}^{-1}$  nos cultivos anteriores para cerca de  $4 \text{ g.L}^{-1}$  após o início da alimentação. A concentração de glicerol ( $C_s$ ) manteve-se em aproximadamente  $3 \text{ g.L}^{-1}$  durante quase todo o cultivo o que deveria ser satisfatório para o crescimento celular caso não houvesse carência de outros nutrientes, provavelmente fonte de nitrogênio. A concentração de AC ( $C_p$ ) máxima foi de  $310 \text{ mg.L}^{-1}$  um valor abaixo do esperado em virtude da alta concentração de glicerol.

Os principais indícios de que ocorreu realmente a exaustão de nutrientes associada à diluição do meio, foram os perfis obtidos dos índices de consistência ( $K$ ) e

de comportamento de escoamento ( $n$ ). Pode-se observar que diferentemente do que aconteceu nos demais cultivos, os valores de  $K$  decresceram rapidamente com o início da alimentação de meio suplementar, chegando a valores muito pequenos. Já o índice de comportamento de escoamento ( $n$ ) após o decréscimo na etapa em batelada, apresentou um perfil crescente com o tempo, chegando ao valor de 0,7. Sabe-se que valores de  $n$  próximos de 1,0 indicam um fluido com características reológicas Newtonianas próximas à da água, o que não deveria ter ocorrido com o caldo de fermentação por ter este características mais de um fluido pseudoplástico. Isso comprova que a exaustão de nutrientes associada à diluição do caldo levou à morte celular.

Partindo dos resultados e das conclusões obtidas do cultivo BA8, planejou-se uma forma de minimizar os efeitos negativos observados, o que resultou na execução dos dois cultivos finais, modificando as condições de alimentação.

Foram realizados ensaios em paralelo, BA9 e BA10, com  $F=0,02 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{se}= 60 \text{ g.L}^{-1}$ , sendo o primeiro alimentado com uma solução de glicerol e o segundo com meio de cultura completo. A razão da realização desses ensaios foi verificar os efeitos de uma alimentação com alta concentração de glicerol ( $C_{se}$ ) e baixa vazão volumétrica de alimentação ( $F$ ) em relação aos cultivos anteriores, bem como observar a influência da composição do meio de cultura suplementar.

#### **4.9 Cultivo em Batelada Alimentada BA9 (junho/2003)**

O cultivo BA9 em batelada alimentada, cujo meio suplementar foi uma solução de glicerol em água destilada, numa concentração de  $60 \text{ g.L}^{-1}$  e a vazão de alimentação de  $0,02 \text{ L.h}^{-1}$ . Este cultivo foi realizado em paralelo com um cultivo, BA10, as mesmas

condições porém tendo o meio de cultura suplementar completo. Os resultados obtidos no cultivo BA9 estão ilustrados na Figura 4.13.

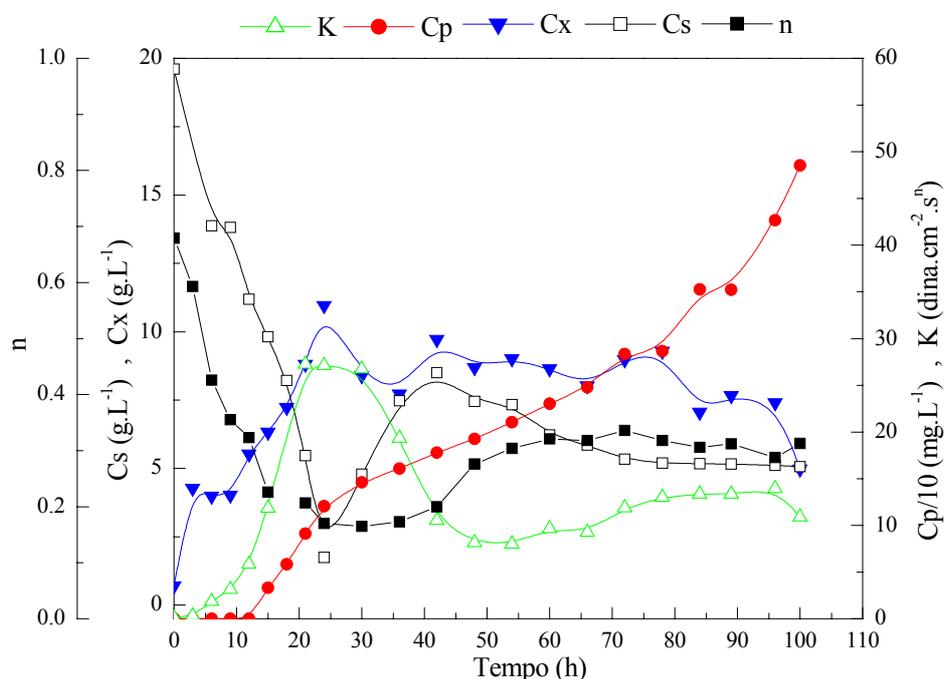


Figura 4.13: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada BA9 ( $F=0,02 \text{ L.h}^{-1}$  e  $C_{s_e}=60,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) com meio suplementar composto de solução de glicerol

Observou-se pelos resultados que  $C_x$  manteve valores próximos a  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , como nos cultivos anteriores o que mostra que mesmo com um meio não completo o crescimento do microrganismo foi bom.

Pelo gráfico podemos observar que a concentração de glicerol permaneceu com valores mais altos que os observados em outros cultivos, podendo este fato representar que nessa vazão de alimentação, o consumo de glicerol foi bem lento, gerando acúmulo de substrato no caldo. A concentração de AC máxima de  $485,4 \text{ mg.L}^{-1}$  foi considerada boa comparada com o cultivo em batelada padrão B3. A principal característica deste ensaio foi manter o produto  $F.C_{s_e}$  igual ao de cultivos anteriores, usando para tal uma alta concentração de substrato e uma baixa vazão de alimentação. Pode observar que

este tipo de estratégia, dentro desta faixa de concentração, apresentou um dos melhores resultados quanto à produção de ácido clavulânico. A manutenção do produto  $F.Cs_e$  em  $1.2 \text{ g.L}^{-1}$ , com alta concentração de glicerol e baixa vazão minimizando os efeitos de diluição, favoreceu a produção de AC.

#### 4.10 Cultivo em Batelada Alimentada BA10 (junho/2003)

O cultivo em batelada alimentada BA10 foi similar ao cultivo BA9 porém apresentou meio de cultura suplementar completo, incluindo outros constituintes além do glicerol. A Figura 4.14 ilustra os resultados do cultivo BA10.

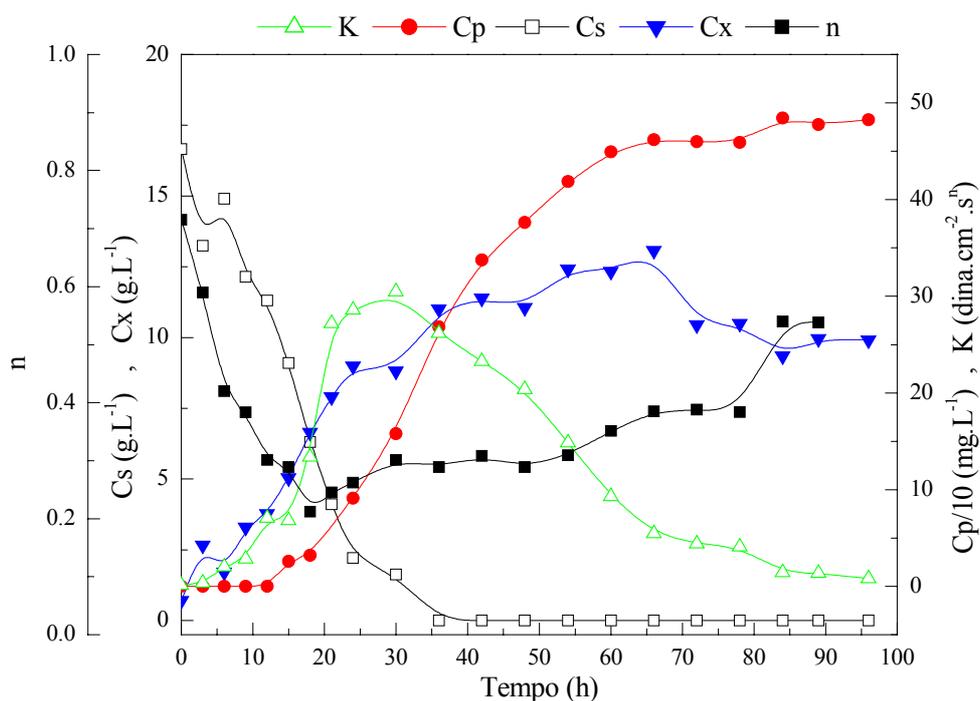


Figura 4.14: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada BA10 ( $F=0,02 \text{ L.h}^{-1}$  e  $Cs_e=60,0 \text{ g.L}^{-1}$ )

Neste cultivo a concentração de produto alcançou valores próximos ao do cultivo BA9, o que mostra que pelo menos nessa concentração e vazão de alimentação não houve exaustão dos nutrientes no caldo fermentativo já que os valores máximos de concentração de AC foram próximos, 485.4 g.L<sup>-1</sup> para o cultivo BA9 e 484.2 g.L<sup>-1</sup> para o cultivo BA10. Observou-se que a concentração de glicerol alcançou valores próximos de zero, o que, no entanto, não prejudicou a produção de AC nem o crescimento celular. No caso de Cx, observou-se um crescimento maior do que os dos outros cultivos, chegando em valores próximos a 13 g.L<sup>-1</sup>. Este crescimento foi observado pelo índice de consistência (K) que alcançou altos valores (> 30 dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>) caindo rapidamente após 60 horas de cultivo.

#### 4.11 Comparação dos Resultados Obtidos

A Figura 4.15 ilustra os perfis de concentração de AC obtidos nos cultivos B1, B2, B4, BA1, BA2, BA3, BA6, BA7, BA8, BA9 e BA10.

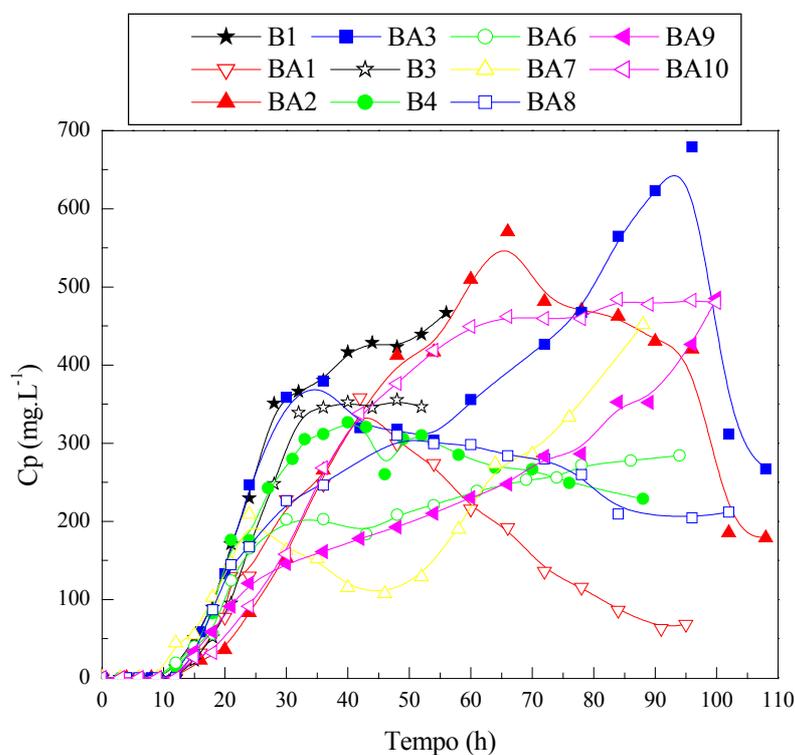


Figura 4.15: Perfis de concentração de AC dos cultivos B1, B2, B4, BA2, BA3, BA6, BA7, BA8, BA9 e BA10

Pode-se observar que excluindo os resultados do cultivo BA2 e BA10, durante a etapa em batelada e até o início da alimentação do meio suplementar, entre 21 e 24 horas de cultivo, os perfis de Cp com tempo foram coincidentes indicando não haver diferenças relevantes entre as variações de Cp com o tempo ( $dCp/dt$ ). Isto indica que a linhagem, ao menos nesta fase do cultivo, não perdeu a capacidade produtora de AC, independentemente do lote de criotubos.

A maior produção de AC, ocorrida no cultivo BA3,  $680 \text{ mg.L}^{-1}$  em 96 horas, é muito superior aos valores encontrados na literatura, em trabalhos com linhagens de *Streptomyces clavuligerus* não melhoradas geneticamente, utilizando meios de cultivo similares com glicerol e fontes complexas de nitrogênio. A tabela 4.1 que segue, apresenta resultados de produção de AC obtidos na literatura comparados com os dados do presente trabalho.

Tabela 4.1 Resultados de produção de AC obtidos na literatura e no presente trabalho

<b>Referência</b>	<b>Cp<sub>max</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo de cultivo (h)</b>	<b>Pp<sub>max</sub> (mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>
Mayer e Deckwer (1996)	500	95	5,3
Chen <i>et al.</i> (2002)	280	100	2,8
Chen <i>et al.</i> (2003)	320	160	2,0
Presente Trabalho (Criotubos – Out/2002)	680	96	7,1
Presente Trabalho (Criotubos – Jun/2003)	485	84	5,8

Para uma melhor comparação entre os resultados obtidos nos diferentes cultivos foram graficados valores relativos de concentração de AC tomando como base a concentração máxima de AC obtida no cultivo em batelada padrão.

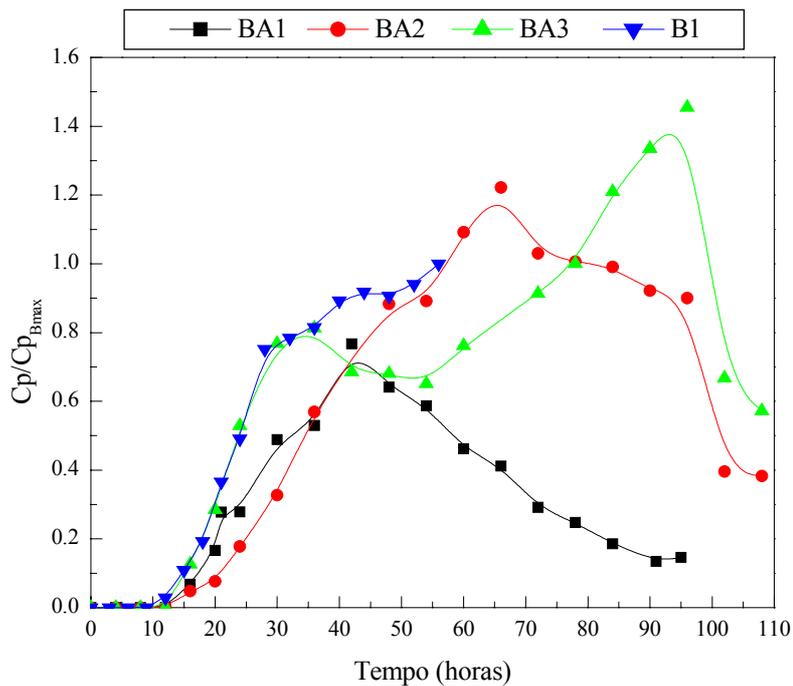


Figura 4.16: Perfis de concentração relativa de AC ( $C_p/C_{p_{B_{max}}}$ ) para os cultivos realizados com os criotubos preparados em outubro/2002

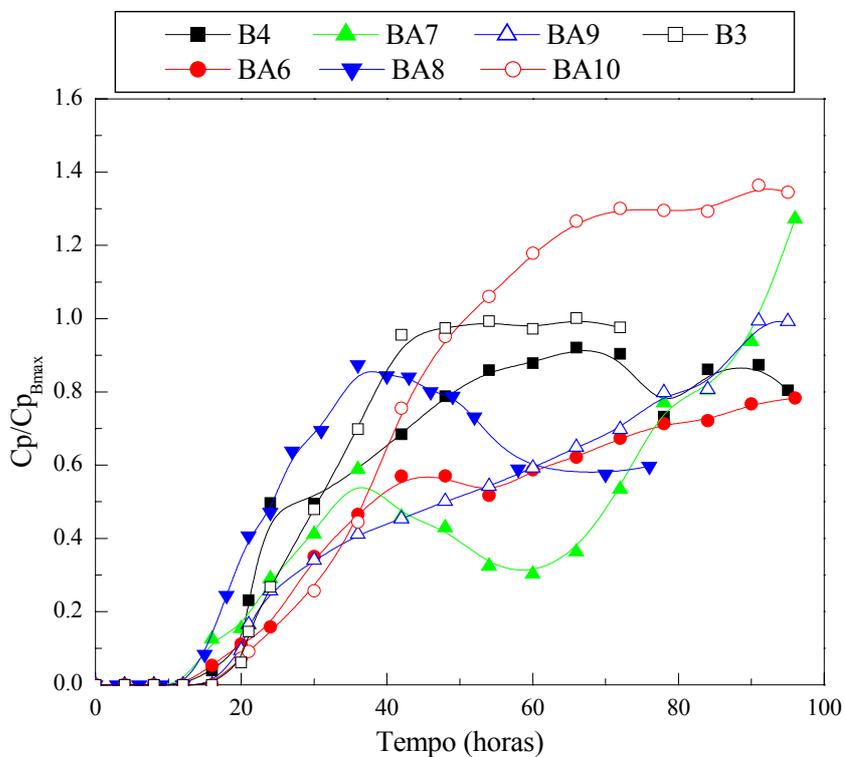


Figura 4.17: Perfis de concentração relativa de AC ( $C_p/C_{p_{B_{max}}}$ ) para os cultivos realizados com os criotubos preparados em junho/2003

As Figuras 4.16 e 4.17 ilustram os perfis de concentração relativas de AC ( $C_p/C_{p_{B_{max}}}$ ) para os dois conjuntos de ensaios realizados com criotubos preparados em outubro/2002 e junho/2003, respectivamente, uma vez que os resultados em termos de  $C_{p_{max}}$  para os cultivos padrões (B1 e B3) foram significativamente diferentes em cerca de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de AC.

É possível mostrar que, embora em tempos diferentes os cultivos BA2 e BA7, realizados sobre mesmas condições, apresentaram valores máximos de  $C_p/C_{p_{B_{max}}}$  entre 1,2 e 1,3. Da mesma forma, os cultivos BA3 e BA8 em 50 horas de cultivo apresentaram mesmo valor de concentração relativa. Tal comparação é válida até esse tempo de cultivo, uma vez que no cultivo BA8 sendo a alimentação apenas com glicerol, houve exaustão de outros nutrientes que afetou negativamente o cultivo.

O cultivo BA9 apresentou um perfil muito parecido com o do cultivo BA6, porém o primeiro alcançou uma concentração relativa de AC maior depois de 70 horas. Embora o cultivo BA10 seja operado nas mesmas condições do BA9, sua concentração relativa de produto foi superior a 1,3, sendo a maior entre os cultivos realizados com este segundo lote de criotubos e, considerando o tempo de cultivo de 72 horas, o resultado encontrado foi superior a todos os demais cultivos.

Salienta-se que os melhores resultados em termos de produção de AC foram obtidos quando os cultivos foram operados com produto  $F.Cs_e$  igual a  $1,25 \text{ g.h}^{-1}$ , com alta concentração de glicerol ( $Cs_e$ ) e baixa vazão volumétrica de alimentação, condições que aliaram suficiência em fonte de carbono com minimização dos efeitos de diluição.

Por fim, as Figuras 4.18 e 4.19 apresentam perfis de massa acumulada de AC ao longo dos cultivos realizados com diferentes criotubos, de modo a se ter mais parâmetros de comparação. Pode-se observar que os maiores valores de massa acumulada não foram tão distantes como os valores máximos de concentração de AC

para criotubos preparados em outubro/2002 e junho/2003, respectivamente 3,2 e 2,8 g de AC.

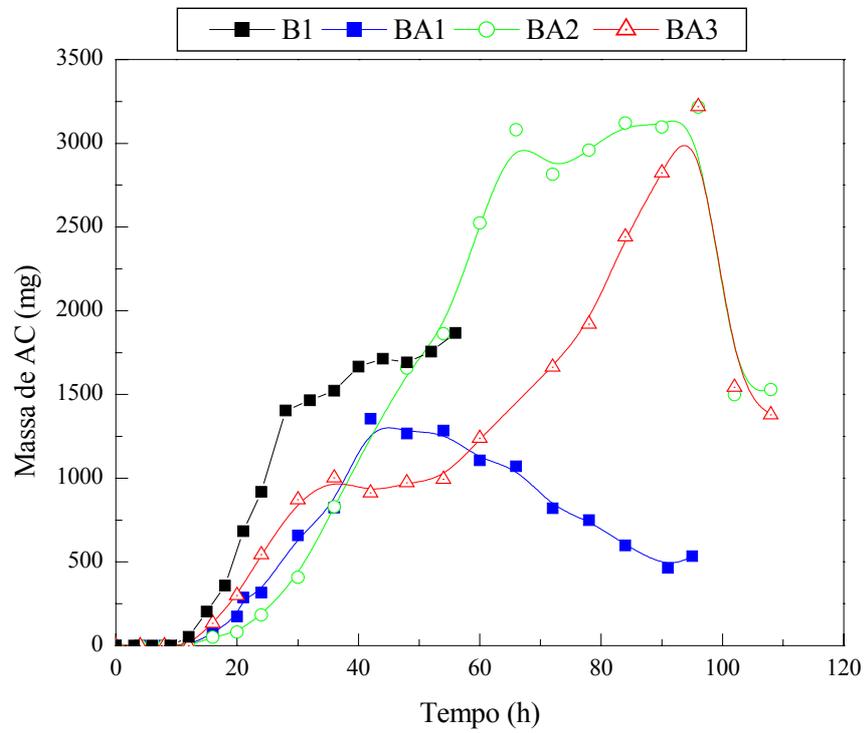


Figura 4.18 Perfis de massa acumulada de AC para os cultivos realizados com os criotubos de outubro/2002

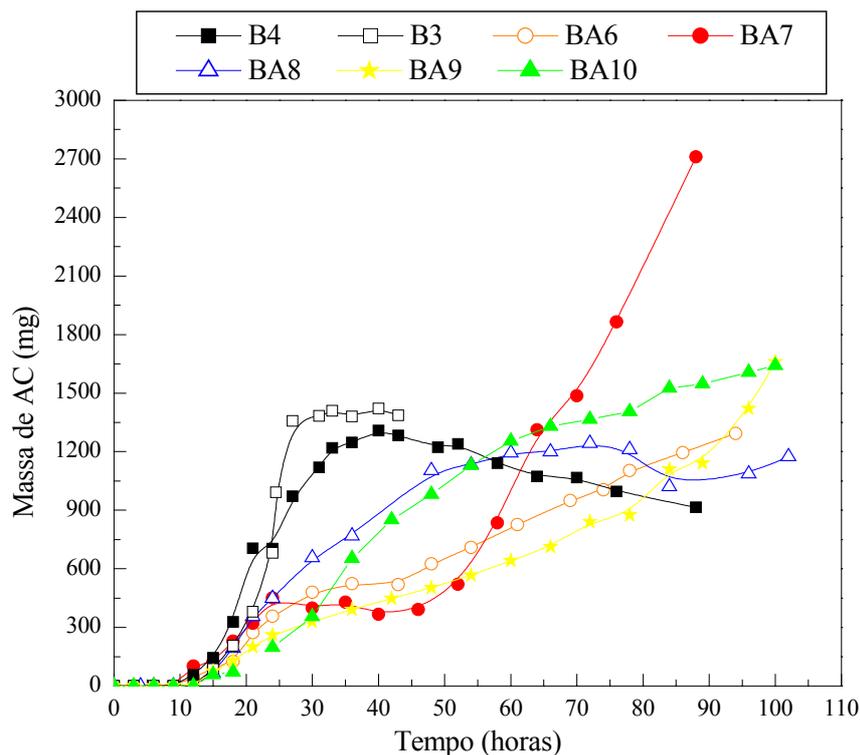


Figura 4.19 Perfis de massa acumulada de AC para os cultivos realizados com os criotubos de junho/2003

Finalizando, a Tabela 4.2 apresenta os principais resultados obtidos nos cultivos onde é possível uma comparação mais detalhada entre os desempenhos obtidos.

Destaca-se aqui o cultivo BA3, do primeiro lote de criotubos, que alcançou os melhores resultados quanto à concentração de produto e massa de AC. Quanto à produtividade em AC, o cultivo B3, do segundo lote de criotubos, obteve o melhor valor, embora a produção máxima tenha sido inferior ao do cultivo B1. Para o segundo lote de criotubos, o cultivo BA9 foi o que resultou em maior concentração de AC, embora a produtividade e a massa acumulada tenham alcançado valores maiores no cultivo BA10.

De uma maneira geral pode-se observar que a concentração de AC e a produtividade não tiveram relação direta com a massa acumulada de AC.

Tabela 4.2: Resultados obtidos nos cultivos B1, B2, B4, BA2, BA3, BA6, BA7, BA8, BA9 e BA10

<b>Cultivo</b>	<b>Lote de Criotubos</b>	<b>C<sub>p</sub>max (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>t<sub>Cp</sub>max (h)</b>	<b>Pp<sub>Max</sub> (mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	<b>M<sub>ACTCp</sub>max (g)</b>	<b>M<sub>max</sub> (g)</b>	<b>t<sub>M</sub>max (h)</b>
B1	Out/2002	467	56	8,34	1868	1868	56
BA1	Out/2002	358	42	8,52	1354	1354	32
BA2	Out/2002	580	66	8,79	3080	3216	96
BA3	Out/2002	680	96	7,08	3219	3219	96
BA4	Out/2002	186	84	2,21	-	-	-
BA5	Out/2002	210	84	2,50	-	-	-
B2	Out/2002	239	40	5,97	-	-	-
B3	Jun/2003	355	40	8,87	1409	1421	48
BA6	Jun/2003	284	96	2,95	1294	1294	96
B4*	Jun/2003	326	40	8,15	1307	1307	40
BA7	Jun/2003	450	90	5,00	366	2709	88
BA8	Jun/2003	310	48	6,46	1103	1242	72
BA9	Jun/2003	485	90	5,38	1141	1660	100
BA10	Jun/2003	484	78	6,20	1404	1640	100

C<sub>p</sub>max (mg.L<sup>-1</sup>) – concentração de produto máxima.

t<sub>Cp</sub>max (h) – tempo onde a concentração de produto é máxima.

Pp<sub>Max</sub> (mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) – produtividade de produto máxima.

M<sub>ACTCp</sub>max (g) – massa de AC no tempo onde a concentração de produto é máxima.

M<sub>max</sub> (g) – massa de AC máxima.

t<sub>M</sub>max (h) – tempo onde a massa de AC é máxima.

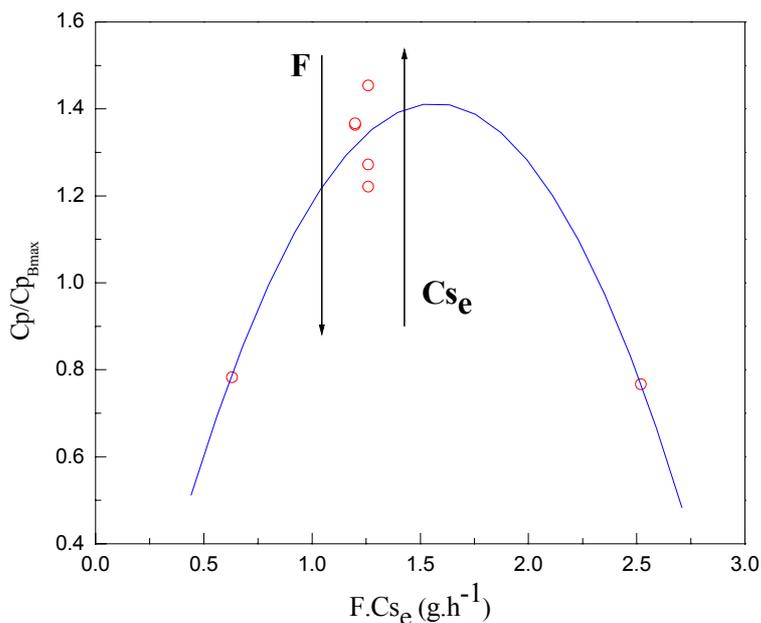


Figura 4.20: Influência simultânea da vazão volumétrica de alimentação ( $F$ ), da concentração de glicerol do meio suplementar ( $C_{s_e}$ ) e da vazão mássica de alimentação (produto  $F.C_{s_e}$ ) na produção relativa de AC nos cultivos em batelada alimentada

O gráfico acima mostra a tendência de crescimento de  $C_p$  em função de  $F$ ,  $C_{s_e}$  e do produto  $F.C_{s_e}$ . Neste gráfico pode-se observar que os valores de  $(C_{p_{max}}/C_{p_{Bmax}})$  obedecem a um padrão, isto é, têm um comportamento típico na faixa de trabalho em que foram operados os cultivos em batelada alimentada.

No primeiro extremo, com o produto  $F.C_{s_e}=0,63 \text{ g.h}^{-1}$ , tem-se que a falta de fonte de carbono deve ter sido a causadora da baixa produção de AC. Já no segundo extremo, com o produto  $F.C_{s_e}=2,52 \text{ g.h}^{-1}$ , o possível problema para a baixa produção foi justamente o contrário, supõe-se que o excesso de fonte de carbono tenha causado inibição ou mesmo repressão da biossíntese de AC.

Sendo assim, fica clara a tendência de que para o aumento na produção de AC, condições de operação com alto  $C_{s_e}$  e baixo  $F$ , independente do lote de criotubos, foram os que apresentaram melhores resultados em termos de  $C_p$ .

Cabe aqui ressaltar que o cultivo BA2 foi o único a ser excluído do gráfico da Figura 20, por ser este o único a apresentar problemas de experimentais. Neste cultivo ocorreu o vazamento do meio de cultura contido na dorna antes do início do processo, o que nos levou a repeti-lo para a confirmação dos resultados já que o fato acima poderia de alguma forma mascarrar os resultados obtidos.

## 5. Conclusões

Com base nos resultados do presente trabalho cujo objetivo foi estudar a influência da velocidade de alimentação de glicerol na produção de ácido clavulânico em batelada alimentada pode-se concluir que:

- o modelo de produção não associada ao crescimento com degradação do produto obteve-se bom ajuste apenas com os resultados encontrados no cultivo em batelada (B1). Uma possível explicação para o fato do modelo não se ajustar aos resultados dos cultivos em batelada alimentada é que o mesmo não considera efeitos inibitórios e repressivos do glicerol na produção de AC, além de não associar a produção com o consumo de glicerol, resultado sistemático na maioria dos cultivos.

- melhores desempenhos para o processo em questão foram obtidos na vazão mássica de alimentação de  $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ , considerada ótima, operando a baixa vazão de alimentação baixa ( $F \downarrow$ ) e com alta concentração de glicerol no meio suplementar ( $C_{s_e}$ ), condição que assegura suficiência em fonte de carbono, minimizando os efeitos de diluição do caldo.

- a concentração de produto aumentou com simultânea diminuição da concentração de glicerol independentemente da concentração no meio suplementar.

- uma alta concentração de glicerol no meio suplementar ( $C_{s_e}$ ) somada a uma alta vazão volumétrica de alimentação ( $F$ ) gerou condições de repressão na biossíntese do produto no cultivo BA1.

- na primeira bateria de ensaios com o lote de criotubos preparados em outubro/2002, a condição experimental que resultou nos melhores resultados foi promovida por cultivos operados com  $C_{s_e}$  alto e  $F$  baixo (cultivo BA3:  $F=0,04 \text{ L.h}^{-1}$  e

$C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$ ), com produção de AC, cerca de 45% superior ao valor obtido no cultivo padrão (B1).

- na faixa de concentração de glicerol no meio suplementar ( $C_{s_e}$ ) entre 15-30  $\text{g.L}^{-1}$ , a influência do glicerol foi positiva, diferentemente do que se supunha inicialmente, que o glicerol poderia inibir ou até mesmo reprimir a produção de AC, fato este comprovado pelo cultivo batelada com pulso B4.

- a partir dos cultivos paralelos realizados nas mesmas condições, porém com diferentes meios de alimentação, meio completo ou somente glicerol e água, pôde-se verificar que melhores desempenhos do processo foram obtidos com o meio suplementar na sua composição completa.

## 6. Sugestões

Para a continuidade do trabalho, sugere-se a realização de ensaios em batelada alimentada, com os meios suplementares completos e apenas com glicerol, onde o produto  $F.Cs_e$  seja mantido em valores abaixo da faixa empregada nos cultivos realizados ( $0,6 < F.Cs_e < 2,4 \text{ g.h}^{-1}$ ), com baixas vazões volumétricas de alimentação ( $F$ ) baixo e altas concentrações de glicerol no meio suplementar ( $Cs_e$ ), no sentido de se evitar problemas associados com diluição do caldo e com a exaustão de nutrientes essenciais presentes no caldo.

## 7. Referências Bibliográficas

Almeida, R. M. R. Garcia, (2003), Estudos da purificação do ácido clavulânico utilizando processo contínuo de adsorção, *Tese de doutorado*, PPG-EQ-UFSCar, São Carlos.

Baggaley, K. H.; Brown, A. G.; Schofield, C. J. (1997); Chemistry and Biosynthesis of Clavulanic Acid and Other Clavams, *Natural Production Report*, p. 309-333.

Baptista-Neto, A. (2000), Estudos cinéticos e reológicos do processo descontínuo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, *Dissertação de Mestrado*, PPG-EQ-UFSCar, São Carlos.

Battaglia, D. (2003), Produção de ácido clavulânico em batelada alimentada por *Streptomyces clavuligerus* e extração em sistema de duas fases aquosas, *Dissertação de Mestrado*, PPG-EQ-UFSCar, São Carlos.

Betlem, Ben H. L.; Mulder, Pieter; Roffel, Brian (2002); Optimal mode of operation for biomass production, *Chemical Engineering Science*, v. 57, p. 2799-2809.

Brown, A. G.; Butterworth, D.; Cole, M.; Hascomb, G.; Hood, J. D.; Reading, C.; Rolinson, G. N. (1976); Naturally Occurring  $\beta$ -lactamase-inhibitors With Antibacterial Activity, *Journal Antibiotics*, v.29, p. 668-669.

Butterworth, D. (1984), Clavulanic acid: Properties biosynthesis, and fermentation. *Imm*: Vandamme, E.J. *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, New York, Marcel Dekker, v.22, p.225-235.

Chen, K.; Lin, Y.; Tsai, C.; Hsieh, C.; Houg, J. (2002), Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with glycerol feeding, *Biotechnology Letters*, v.24, p. 455-458.

Chen, K.; Lin, Y.; Tsai, C.; Hsieh, C.; Houg, J. (2003), Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding, *Enzyme and Microbial Technology*, v.32, p. 152-156.

Díez, Bruno; Mellado Encarnación; Rodríguez, Marta; Fouces, Roberto; Barredo, José-Luis (1996); *Recombinant Microorganisms for Industrial Production of Antibiotics*, *Biotechnology and Bioengineering*, v.55, n. 1, p.216-226.

Elander, R. P. (2003); *Industrial Production of  $\beta$ -lactam Antibiotics*, *Applied Microbiol Biotechnol*, v. 61, p. 385-392.

Essack, S. Y. (2001), The development of  $\beta$ -lactam antibiotics in response to the evolution of  $\beta$ -lactamases, *Pharmaceutical Research*, v. 18, n. 10, p. 1391-1399.

Gresser, U. (2001); Amoxicillin-Clavulanic Acid Therapy May be Associated With Severe side Effects –Review of the literature, *Europe Journal Medical Research*, v.4, p.139-149.

Guterman, A.L.; Ribon, V. and Boltanski, A.(1985), Incorporation of hydroxypropionate into the beta-lactam s\residue of clavulanic acid, Journal of the Chemical Society, Chemical Communication, N.22, p.1627-1629.

Hakimelahi, G. H.; Shia, Kak-Shan; Xue Cuihua; Hakimelahi, S.; Moosavi-Movahedi, A. A.; Soltani-Rad, M. N.; Osyetrov, V.; Wang, Kung-Pern; Liao, Jyh-Hsiung; Luo, Fen-Tair (2002); design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Series of  $\beta$ -lactam-Based Prodrugs, Bioorganic & Medical Chemistry, v.10, p. 3489-3498.

Hokka, C. O.; Moraes, O. I. (1978); Fermentação Semicontínua. I – Análise do Comportamento da Fermentação para Produção de Penicilina, III Congresso Brasileiro de Engenharia Química, p. 175-180.

Ives, P. R. and Bushell, M. E. (1997), Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, Microbiology, v.143, p.633-636.

Large, K. P.; Ison, A. P.; Williams, D. J. (1998), The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, Journal of Biotechnology, v. 63, p. 111-119.

Liras, P.; Rodriguez-Garcia, A. (2000), Clavulanic acid, a  $\beta$ -lactam inhibitor: biosynthesis and molecular genetics, Appl. Microbiol. Biotechnol., v.54, p. 467-475.

Kim, I-C.; Kim, C-H.; Hong, S-I.; Kim, S-W. (2001), Fed-batch cultivation for the production of clavulanic acid by an immobilized *Streptomyces clavuligerus* mutant, World J. Microbiol. Biotechnol., v.17, p. 869-872.

Kranjc S., Racman A.(1997) Process for the preparation of clavulanic acid. Patent Number WO09739137.

MacGowan, S. J.; Bycroft, B. W. and Salmond, P. C. (1998), Bacterial production of carbapenems and clavanas: evolution of beta-lactam antibiotic pathways, Trends in Microbiology, v.6, N.5, p.203-208.

Mayer, A. F.; Deckwer, W. D. (1996), Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations, Appl. Micr. Biotech., v.45, p. 41-46.

Moo-Young, M. (1985), Comprehensive biotechnology: The principles, applications e regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine, Oxford, U.K., Pergamon Press, v.1, 688p..

Nabais, A. M. A. e Fonseca, M. M. R. (2000), Improved process for clavulanic acid production, número da patente WO0005397.

Neves, A.A., Vieira, L. M., Menezes, J. C. (2001), Effects of Preculture Variability on Clavulanic Acid Fermentation, Boitech. and Bioengineering, v. 72, n.6.

Neu, Harold, Gootz, T. D. (1999), Antimicrobial Chemotherapy, chapter 11, p. 1-25.  
<http://129.109.136.65/microbook/ch011.htm>.

Phaff, H. J. (1981); *Industrial Microorganisms*, Scientific American, v. 77, n. 245 (3).

Pitlik, J. and Townsend, C. A. (1997), The fate of [2,2,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>,1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]-D,L-glycerate in clavulanic acid biosynthesis, *Chemical Communication*, N.2, p.225-226.

Puentes, J. L. F. C.; Valle, M.A.M.; Maldonado, F. S.; Izard, T. O. PLA, L.C.; Souza-Faro, J. M. (1989), Preparation of clavulanic acid and its salts and esters. Patent Number EP0312813, 1989.

Reading C. e Cole M. (1977), Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*, *Antimicrob Agents Chemother*, v.11, p.852-857.

Romero, J., Lira, P. and Martin, J. F. (1994), Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, *Journal Applied Microbiology. Biotechnology*, v. 20, p.318-325.

Rosa, J. C. (2002), Influência das condições de transferência de oxigênio na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, *Dissertação de Mestrado*, PPG-EQ-UFSCar, São Carlos.

Roubos, J.A.; Krabben, P.; Laat, W. T. A. de; Baduska, R. Heijnen, J. J. (2001), Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations, *Biotechnology Progress*, v.18, n.3, p. 451-457.

Roubos, J.A.; Krabben, P.;Luiten, R. G. M.; Verbruggen, H. B.; Heijnen, J. J. (2001), A Quantitative Approach to Characterizing Cell Lysis Caused by Agitation of *Streptomyces clavuligerus*, *Biotechnology Progress*, v.17, n 2, p. 336-347.

Sanchez, Sergio; Demain, Arnold L. (2002); Metabolic regulation of Fermentation Processes, *Enzyme and Microbial Technology*, 6153, p. 1-12.

Sebastine, I. M.; Stocks, S. M.; Cox P. W.; Thomas, C.R. (1999), Characterisation of percentage viability of *Streptomyces clavuligerus* using image analysis, *Biotechnonology Techniques*, v. 13, p. 419-423.

Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (2001), *Biotecnologia Industrial*, Ed. Edgard Blücher Ltda, v. 2, p. 205-216.

Silva, F. H. da; Moura, L. F.; Badino Jr, A. C. (2003); AnaBio 1.0: Um Programa para Análise de Biorreatores, XIV Simpósio Nacional de Fermentação, anais, Florianópolis – Santa Catarina – Brasil.

Thirkettle, J. E.; Baldwin, F. E.; Edwards, J.; Griffin, J. P. and Schofeld, C. J. (1997), The origin of the beta-lactam carbons of clavulanate acid, *Chemical Communication*, N.11, p.1025-1026.

## Apêndice A

Os dados apresentados nas tabelas seguintes foram os utilizados na construção dos gráficos apresentados na sessão 4, Resultados e Discussões.

Tabela A1 : Resultados do cultivo Batelada, B1

<b>Tempo (h)</b>	<b>Cs (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cp (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K (dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>Cx (g.L<sup>-1</sup>)</b>
0	13,76	0	0,18	0,70
3	13,53	0	0,20	0,83
6	13,20	0	1,55	1,02
9	11,50	0	3,91	1,99
12	9,39	13,22	6,37	3,20
15	6,74	50,92	9,32	4,72
18	4,17	89,80	22,12	6,20
21	1,46	170,80	25,51	7,75
24	0	229,50	26,95	7,96
28	0	351,11	23,13	7,23
32	0	366,10	18,03	6,18
36	0	380,52	15,04	5,51
40	0	416,74	13,03	5,03
44	0	428,60	12,84	4,99
48	0	423,12	10,72	4,45
52	0	439,00	11,79	4,73
56	0	467,11	7,74	3,63

Tabela 2 : Resultados do cultivo em Batelada Alimentada, BA1

Tempo(h)	Cs(g.L <sup>-1</sup> )	Cp(mg.L <sup>-1</sup> )	K(dina.cm <sup>2</sup> .s <sup>n</sup> )	Cx(g.L <sup>-1</sup> )	n
0	14,88	0	0,13	0,70	0,69
4	13,45	0	0,015	1,52	0,98
8	12,98	0	0,29	1,79	0,60
12	11,75	0	21,22	2,49	0,39
16	9,69	31,69	86,38	3,67	0,27
20	7,10	77,48	199,11	5,16	0,19
21	5,79	129,58	204,27	5,91	0,18
24	6,46	130,15	223,32	--	0,17
30	6,12	228,19	288,28	--	0,15
36	5,13	247,48	256,34	--	0,18
42	4,38	358,25	222,49	--	0,22
48	4,44	299,50	218,24	--	0,24
54	3,99	274,26	220,19	12,42	0,27
60	3,18	215,67	250,85	--	0,27
66	3,74	191,98	252,49	--	0,29
72	3,46	136,03	265,18	--	0,31
78	2,60	115,64	246,88	--	0,33
84	3,87	86,52	--	--	--
91	3,14	62,90	237,61	--	0,41
95	2,16	68,28	229,68	14,05	0,43

Tabela 3: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada, BA2

<b>Tempo(h)</b>	<b>Cs (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cp (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K(dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>Cx (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>n</b>
0	14,25	0	0,04	0,7	0,89
4	--	0	0,39	--	0,78
8	13,87	0	0,19	0,92	0,63
12	11,17	0	1,49	2,46	0,45
16	10,04	22,35	5,31	3,11	0,33
20	8,94	35,9	--	3,74	--
24	7,33	83,1	--	4,67	--
30	6,41	152,9	15,74	--	0,32
36	6,00	265,8	25,62	--	0,28
42	4,15	--	29,23	10,27	0,29
48	2,38	412,3	--	--	--
54	1,15	416,5	21,91	10,82	0,35
60	0,92	509,8	12,43	--	0,39
66	--	570,5	--	10,25	--
72	--	481,1	6,73	10,48	0,43
78	0,25	469,7	4,51	9,75	0,47
84	0,60	462,5	3,84	11,42	0,49
90	0,71	430,3	5,64	9,25	0,42
96	0,67	420,4	5,91	10,54	0,41
102	0,60	185,0	6,65	--	0,41
108	0,80	178,8	9,21	12,41	0,36

Tabela 4: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada, BA3

<b>Tempo(h)</b>	<b>Cs(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cp(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K(dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>Cx(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>n</b>
0	13,96	0	0,03	0,68	0,97
4	--	0	0,35	--	0,81
8	13,09	0	1,39	118,22	0,41
12	8,97	0	5,41	354,70	0,32
16	8,35	58,78	15,07	390,29	0,24
20	6,87	133,00	21,15	475,24	0,29
24	5,4	247,00	23,66	559,62	0,33
30	4,45	358,71	19,69	--	0,32
36	4,42	379,63	7,91	10,44	0,33
42	--	319,92	5,38	--	0,37
48	4,35	317,71	--	8,66	--
54	4,56	303,92	9,12	9,62	0,34
60	4,45	355,74	10,88	10,21	0,35
66	4,06	--	--	--	--
72	3,51	426,56	15,26	11,36	0,35
78	3,08	467,18	18,11	12,34	0,34
84	2,85	564,92	15,35	12,84	0,39
90	1,49	623,34	11,63	11,89	0,38
96	0,88	679,37	8,08	12,66	0,41
102	1,24	311,66	5,04	12,61	0,46
108	0,91	267,12	3,64	12,85	0,48

Tabela 5: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada, BA4

Tempo(h)	Cp(mg.L <sup>-1</sup> )	K(dina.cm <sup>-2</sup> .s <sup>n</sup> )	Cx(g.L <sup>-1</sup> )	n
0	0	--	--	--
4	0	0,43	--	0,59
8	0	31,43	--	0,37
12	0	100,88	--	0,25
16	40,11	207,66	--	0,20
20	92,62	170,01	11,27	0,24
24	92,89	165,49	--	0,27
28	113,22	209,36	11,68	0,28
34	124,84	221,48	12,31	0,30
40	133,51	210,84	11,12	0,32
46	160,43	199,69	--	0,33
52	178,58	203,03	11,41	0,30
58	149,75	163,67	12,25	0,36
65	177,66	18,06	10,96	0,32
70	186,21	185,14	10,85	0,35
76	178,82	139,43	11,54	0,37
82	185,23	107,57	10,94	0,38
88	181,81	94,97	10,69	0,37
94	151,92	7,37	12,04	0,40

Tabela 6: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada, BA5

<b>Tempo(h)</b>	<b>Cp(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K(dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>Cx(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>n</b>
0	0	0,18	--	0,65
4	0	0,30	--	0,62
8	0	3,32	--	0,37
12	0	145,91	--	0,19
16	28,34	187,78	--	0,20
20	68,46	221,42	11,67	0,25
24	130,12	214,37	12,72	0,22
28	132,33	169,55	11,78	0,23
34	140,34	142,12	11,15	0,26
40	145,85	116,17	9,53	0,30
46	156,61	108,51	10,55	0,30
52	155,52	9,78	10,78	0,32
58	168,65	120,03	10,82	0,31
65	155,88	175,67	10,46	0,26
70	174,55	183,86	10,26	0,28
76	176,41	160,44	10,16	0,31
82	206,23	142,76	8,53	0,35
88	210,34	129,58	6,16	0,33
94	193,87	110,78	8,07	0,36
99	--	85,75	--	0,38
104	--	53,61	--	0,41
113	--	4,17	--	0,40

Tabela 7: Resultados do cultivo em Batelada, B3

<b>Tempo(h)</b>	<b>Cp(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cs(mg.L<sup>-1</sup>)</b>
0	0	142,27
3	0	14,28
6	0	134,72
9	0	11,93
12	0	10,08
15	21,74	73,38
18	51,64	47,12
21	94,91	19,13
24	170,23	0,69
28	248,45	0,49
32	339,26	0
36	345,82	0
40	352,43	0
44	345,21	0
48	355,44	0
52	346,59	0

Tabela 8: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada, BA6

<b>Tempo(h)</b>	<b>Cs(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cp(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K(dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>Cx(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>n</b>
0	13	0	--	0,70	--
3	11,09	0	--	1,31	--
6	9,79	0	2,27	2,54	0,40
9	7,78	0	5,51	3,69	0,31
12	9,23	19,00	9,79	2,86	0,25
15	6,35	40,00	9,62	4,52	0,31
18	4,49	56,00	6,12	5,58	0,22
21	1,19	124,00	27,29	7,47	0,25
24	0,00	165,00	28,96	--	0,26
30	0,24	202,00	25,54	12,51	0,27
36	0,50	203,00	21,19	10,4	0,30
43	0,69	184,00	16,94	11,25	0,31
48	0,41	209,00	16,32	13,06	0,31
54	0	221,00	13,23	13,72	0,33
61	0	239,00	11,57	11,67	0,34
69	0	253,00	11,05	12,08	0,33
74	0	256,00	10,69	11,88	0,34
78	0	272,00	11,03	11,68	0,32
86	0	278,00	11,03	10,23	0,34
94	0	284,00	12,56	--	0,32

Tabela 9: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada, BA7

<b>Tempo(h)</b>	<b>Cs(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cp(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K(dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>Cx(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>n</b>
0	14,49	0	0,10	0,70	0,73
3	14,23	0	0,22	0,85	0,62
6	13,26	0	1,24	1,41	0,47
9	11,74	0	2,78	2,27	0,38
12	8,86	45,00	4,95	3,94	0,32
15	10,88	55,00	7,40	2,77	0,28
18	8,96	103,00	15,53	3,87	0,21
21	6,84	146,00	17,07	5,09	0,24
24	4,76	209,00	19,11	6,28	0,25
30	3,31	163,00	10,94	7,25	0,22
35	3,01	152,00	15,23	8,69	0,20
40	2,62	115,00	15,05	8,94	0,30
46	2,28	107,00	15,74	9,56	0,29
52	1,15	129,00	18,63	9,41	0,27
58	1,66	190,00	20,58	9,96	0,29
64	1,35	273,00	22,72	12,19	0,31
70	1,28	286,00	21,08	11,55	0,32
76	1,05	333,00	17,91	12,61	0,33
88	0,89	452,00	11,38	10,82	0,35

Tabela 10: Resultados do cultivo em Batelada, B4 com pulso

<b>Tempo(h)</b>	<b>Cs(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cp(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K(dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>Cx(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>n</b>
0	14,87	0	0,08	0,70	0,76
3	13,84	0	0,20	1,29	0,64
6	11,56	0	0,94	2,59	0,50
9	12,04	0	2,66	2,32	0,37
12	10,91	14,00	5,08	2,97	0,32
15	8,16	36,00	9,75	4,55	0,23
18	7,14	82,00	19,55	5,13	0,20
21	7,61	176,00	20,17	4,87	0,23
24	5,82	176,00	21,30	5,89	0,24
24,5	22,86	--	20,69	18,23	0,26
27	24,12	243,00	22,07	13,55	0,26
31	22,84	280,00	22,67	13,16	0,27
33	20,73	305,00	22,41	12,85	0,28
36	19,76	312,00	20,23	11,98	0,27
40	19,62	327,00	15,68	10,76	0,28
43	15,88	321,00	10,54	11,49	0,29
46	8,15	260,00	9,61	12,48	0,25
49	7,35	306,00	8,84	10,75	0,24
52	6,22	310,00	8,39	8,54	0,22
58	6,37	285,00	7,46	9,67	0,21
64	2,76	268,00	7,05	--	0,25
70	2,12	267,00	7,80	9,16	0,28
76	0	249,00	8,43	9,61	0,28
88	0	229,00	--	10,85	--

Tabela 11: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada, BA8

<b>Tempo(h)</b>	<b>Cs(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cp(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K(dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>Cx(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>n</b>
0	16,73	0	0,17	0,70	0,65
4	--	0	0,28	--	0,60
6	15,86	0	--	1,19	--
9	14,22	0	4,11	2,14	0,35
12	13,70	0	9,63	2,47	0,28
15	10,61	30,00	19,05	4,21	0,18
18	6,66	87,00	25,23	6,47	0,17
21	4,59	144,00	25,36	7,67	0,18
24	3,19	167,00	24,33	8,47	0,20
30	2,76	227,00	--	12,07	--
36	2,79	247,00	21,31	11,44	0,25
42	2,47	--	17,49	9,83	0,27
48	3,20	310,00	15,36	9,28	0,25
54	2,43	299,00	8,22	8,78	0,31
60	2,48	298,00	4,91	7,94	0,32
66	2,08	284,00	2,76	7,53	0,33
72	2,63	280,00	0,54	7,22	0,53
78	1,81	260,00	0,31	5,02	0,59
84	2,69	209,00	0,25	4,91	0,63
90	2,26	--	0,19	4,21	0,66
96	2,72	204,00	0,15	3,84	0,68
102	0,17	212,00	--	3,87	--

Tabela 12: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada, BA9

<b>Tempo(h)</b>	<b>Cs(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cp(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K(dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>Cx(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>n</b>
0	19,61	0	0,14	0,70	0,67
3	--	0	0,31	4,27	0,59
6	13,87	0	1,84	3,99	0,42
9	13,82	0	3,13	4,02	0,35
12	11,19	0	5,84	5,53	0,32
15	9,81	33,00	11,85	6,32	0,22
18	8,22	58,00	--	7,24	--
21	5,47	91,00	27,25	8,81	0,20
24	1,74	121,00	27,10	10,95	0,17
30	4,79	146,00	26,74	8,38	0,16
36	7,47	161,00	19,34	7,72	0,17
42	8,51	178,00	10,52	9,72	0,22
48	7,45	193,00	8,15	8,69	0,27
54	7,33	210,00	8,01	9,09	0,30
60	6,22	230,00	9,64	8,64	0,32
66	5,85	248,00	9,25	8,02	0,31
72	5,34	283,00	11,89	8,98	0,33
78	5,19	286,00	12,99	9,29	0,32
84	5,17	353,00	13,34	7,05	0,30
89	5,16	352,00	13,34	7,67	0,31
96	5,11	427,00	13,94	7,40	0,28
100	5,06	485,00	10,90	4,97	0,31

Tabela 13: Resultados do cultivo em Batelada Alimentada, BA10

<b>Tempo(h)</b>	<b>Cs(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cp(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K(dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>)</b>	<b>Cx(g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>n</b>
0	16,66	0	0,11	0,70	0,71
3	13,24	0	0,35	2,66	0,59
6	14,90	0	2,04	1,71	0,42
9	12,14	0	2,83	3,29	0,38
12	11,31	0	7,07	3,77	0,30
15	9,10	26,00	6,81	5,04	0,28
18	6,3	32,00	13,38	6,64	0,21
21	4,11	--	27,18	7,90	0,24
24	2,21	91,00	28,59	8,99	0,26
30	1,63	158,00	30,46	8,81	0,30
36	0	268,00	26,18	11,01	0,28
42	0	338,00	23,26	11,38	0,30
48	0	376,00	20,37	11,05	0,29
54	0	419,00	14,85	12,42	0,31
60	0	450,00	9,28	12,32	0,35
66	0	462,00	5,46	13,07	0,38
72	0	460,00	4,40	10,44	0,39
78	0	459,00	4,07	10,49	0,38
84	0	484,00	1,43	9,35	0,54
89	0	478,00	1,36	9,95	0,54
96	0	483,00	0,80	9,91	--
100	--	480,00	--	--	--

Tabela 14: Perfis de concentração relativa de AC ( $C_p/C_{p_{Bmax}}$ )

<b>T (h)</b>	<b>B1</b>	<b>BA1</b>	<b>BA2</b>	<b>BA3</b>	<b>B3</b>	<b>B4</b>	<b>BA6</b>	<b>BA7</b>	<b>BA8</b>	<b>BA9</b>	<b>BA10</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0,028	0,067	0,047	0,125	0	0,039	0,053	0,125	0	0	0
15	0,109	0,165	0,076	0,284	0,061	0,101	0,111	0,153	0,083	0,093	0,072
18	0,192	0,277	0,178	0,528	0,145	0,231	0,158	0,289	0,244	0,164	0,091
21	0,365	0,278	0,327	0,768	0,267	0,496	0,350	0,411	0,406	0,256	--
24	0,491	0,488	0,569	0,812	0,479	0,495	0,465	0,588	0,470	0,340	0,256
27	0,751	0,529	--	0,685	0,698	--	0,569	0,458	0,638	0,417	0,444
31	0,783	0,767	0,882	0,680	0,955	0,684	0,570	0,428	0,694	0,453	0,755
33	0,814	0,641	0,891	0,650	0,974	0,787	0,517	0,324	--	0,501	0,951
36	0,892	0,587	1,091	0,761	0,992	0,859	0,587	0,302	0,873	0,542	1,060
40	0,917	0,461	1,221	--	0,972	0,878	0,621	0,363	0,843	0,592	1,178
43	0,906	0,411	1,030	0,913	1,001	0,920	0,673	0,534	0,840	0,648	1,266
46	0,940	0,291	1,005	1,000	0,976	0,903	0,713	0,770	0,800	0,697	1,300
49	1	0,247	0,990	1,209	--	0,732	0,721	0,805	0,788	0,798	1,294
52	--	0,185	0,921	1,334	--	0,861	0,767	0,938	0,731	0,806	1,293
58	--	0,134	0,900	1,454	--	0,873	0,783	1,272	0,589	0,993	1,363
64	--	0,146	0,396	0,667	--	0,803	--	--	--	0,992	1,345
70	--	--	0,382	0,571	--	0,756	--	--	0,575	1,201	1,359
76	--	--	--	--	--	0,751	--	--	0,596	1,367	1,351
88	--	--	--	--	--	0,701	--	--	--	--	--
98	--	--	--	--	--	0,644	--	--	--	--	--

Tabela 15: Perfis de massa acumulada de AC

<b>T(h)</b>	<b>B1</b>	<b>BA1</b>	<b>BA2</b>	<b>BA3</b>	<b>B3</b>	<b>B4</b>	<b>BA6</b>	<b>BA7</b>	<b>BA8</b>	<b>BA9</b>	<b>BA10</b>
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	52,8	72,2	50,9	134,0	0	56,0	43,0	101,4	0	0	0
20	203,6	174,3	80,7	299,2	86,9	144,0	89,2	122,6	66,6	75,0	58,0
24	359,2	287,6	182,8	543,4	206,5	328,4	124,8	228,4	192,4	129,7	71,6
30	683,2	316,2	408,2	871,6	379,6	704,8	272,4	319,8	355,2	199,5	--
36	918	657,2	829,2	1002,1	680,8	703,2	356,8	450,9	447,8	260,7	197,0
42	1404,4	824,1	--	911,7	992,00	--	479,2	399,0	656,8	328,5	355,0
48	1464,4	1354,1	1657,4	972,1	1356,8	971,6	522,9	429,4	769,0	390,9	651,9
54	1522	1266,8	1861,7	993,7	1383,2	1118,8	519,5	366,9	--	448,5	851,0
60	1666,8	1283,5	2523,5	1237,8	1409,6	1220,0	625,5	390,8	1103,9	502,4	982,1
66	1714,4	1106,3	3080,7	--	1380,8	1247,6	708,7	521,1	1131,7	567,5	1129,9
72	1692,4	1071,2	2814,4	1663,3	1421,6	1307,6	826,4	834,8	1193,6	642,5	1254,1
78	1756,0	820,2	2959,1	1919,7	1386,0	1283,2	949,5	1312,5	1198,9	713,3	1329,9
84	1868,0	749,3	3121,8	2440,3	--	--	1004,3	1486,4	1242,3	841,4	1365,3
90	--	599,5	3098,1	2823,5	--	1222,8	1102,8	1864,8	1210,6	876,3	1404,8
96	--	464,2	3216,0	3219,8	--	1240,4	1195,4	2709,4	1020,8	1111,0	1525,2
102	--	534,6	1498,5	1542,4	--	1141,6	1294,0	--	--	1141,1	1547,1
108	--	--	1528,7	1378,2	--	1073,6	--	--	1086,3	1420,5	1607,0
--	--	--	--	--	--	1066,8	--	--	1173,9	1660,0	1640,9
--	--	--	--	--	--	996,8	--	--	--	--	--
--	--	--	--	--	--	915,6	--	--	--	--	--

Tabela 15: Valores da vazão volumétrica de alimentação (F), da concentração de glicerol do meio suplementar ( $C_{se}$ ) e da vazão mássica de alimentação (produto  $F.C_{se}$ ) na produção relativa de AC nos cultivos em batelada alimentada

<b>F (L.h<sup>-1</sup>)</b>	<b>C<sub>se</sub> (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>F.C<sub>se</sub></b>	<b>C<sub>p</sub>/C<sub>pBmax</sub></b>	<b>Cultivo</b>	<b>Lote de criotubos</b>
0,04	15	0,63	0,783	BA6	junho/2003
0,02	60	1,2	1,363	BA10	junho/2003
0,02	60	1,2	1,367	BA9	junho/2003
0,04	30	1,26	1,454	BA3	outubro/2002
0,08	15	1,26	1,272	BA7	junho/2003
0,08	15	1,26	1,221	BA2	outubro/2002
0,04	30	1,26	0,873	BA8	outubro/2002
0,08	30	2,52	0,767	BA1	outubro/2002