

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**Influência das Condições de Alimentação de Glicerol e
Ornitina na Produção de Ácido Clavulânico por
*Streptomyces clavuligerus***

Juliana Conceição Teodoro

**São Carlos - SP
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**Influência das Condições de Alimentação de Glicerol e
Ornitina na Produção de Ácido Clavulânico por
*Streptomyces clavuligerus***

Juliana Conceição Teodoro

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr.

**São Carlos - SP
2008**

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

T314ic

Teodoro, Juliana Conceição.

Influência das condições de alimentação de glicerol e ornitina na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* / Juliana Conceição Teodoro. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

127 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Fermentação. 2. Antibióticos. 3. Ácido clavulânico. 4. *Streptomyces clavuligerus*. 5. Aminoácidos. 6. Batelada alimentada. I. Título.

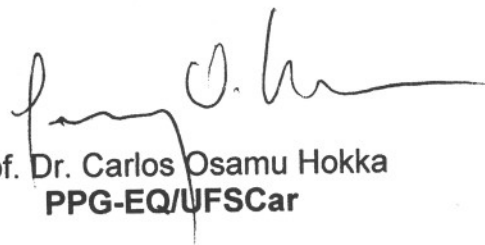
CDD: 660.28449 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE JULIANA CONCEIÇÃO TEODORO, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 26 DE MARÇO DE 2008.

BANCA EXAMINADORA:



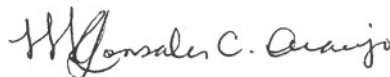
Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior
Presidente, PPG-EQ/UFSCar



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



Prof. Dr. Teresa Cristina Zangirolami
PPG-EQ/UFSCar



Profa. Dra. Maria Lúcia Gonsales da Costa Araújo
IQ/UNESP



Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
PPG-EQ/UFU

*“Bem aventurado o homem que encontra sabedoria,
e o homem que adquire conhecimento,
pois ela é mais valiosa que o ouro”*
Provérbios 3:13

*A meus pais, Nega e Osvaldo, minha avó Conceição e Rodrigo meu irmão....
por me apoiar, acreditar em mim e demonstrar seu amor incondicional
em todos os momentos. Amo vocês!*

Agradecimentos

Seria impossível listar todos os nomes a quem devo gratidão e se esquecesse alguém seria uma grande falta, por isso deixo aqui um terno abraço a todos aqueles que fazem parte do meu convívio. No entanto, não posso deixar de agradecer a Deus a presença de algumas pessoas na minha vida:

Ao Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr. pela orientação. Mostrou-me com paciência, dedicação, amizade e ética que a ciência pouco significaria se não fosse transmitida.

Ao Dr. Álvaro de Baptista Neto pelos esclarecimentos, suporte técnico, sugestões que contribuíram para o enriquecimento dessa tese, e principalmente pela amizade a mim dispensada ao longo desses anos.

A todos com quem tive a oportunidade de trabalhar durante esses anos... os quais nos meus incansáveis dias de trabalho estiveram presentes : Adriano, Adilson, Carolina, Clóvis, Douglas, Edson, Eliton, Geísa, Isara, Luiz, Luana, Luciana, Marcel, Mônica, Sheila. E a todos que embora não tenham seus nomes aqui podem ter certeza que estão no meu coração.

Sou grata ao técnico Amadeus por me ajudar a entender o HPLC e fazer as análises cromatográficas, sem isso esse trabalho não estaria completo.

Às minhas queridas Kamilla e Vanessa... por todos os momentos que já passamos nesses 12 anos de amizade. Espero que a vida nos mantenha sempre unidas seja em pensamento, seja no coração. Conhecer vocês mudou o meu destino.

Aos meus queridos casais Célia e Charles, Rose e Antonio e a pequena Julia, por todos os momentos que passamos juntos e por se fazerem tão especiais na minha vida.

Sou grata a todos os meus amigos “*sãocarlenses*” que me ensinaram a compreender esta cidade e tornaram a minha muito mais fácil e prazerosa. Em especial as amigas Juliana Donadone e Juliana Giordano.... Não imagino a vida sem este trio de Ju’s!

Um agradecimento especial ao Marcelo, que me suportou quando eu mesma já não suportava. Obrigada por seu tempo, atenção, carinho e principalmente compreensão.

A meus tios, primos e amigos de uma vida inteira, que acreditaram, apoiaram, se interessaram e principalmente oraram para que eu realizasse mais essa conquista.

As agências financiadoras desse projeto, CNPq e FAPESP.

SUMÁRIO

<i>Resumo</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>ii</i>
<i>Índice de Figuras</i>	<i>iii</i>
<i>Índice de Tabelas</i>	<i>iv</i>
<i>Índice de Símbolos</i>	<i>vii</i>

Capítulo 1. Introdução

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	3

Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Metabólitos secundários e antibióticos	5
2.2. <i>Streptomyces clavuligerus</i>	7
2.3. Ácido clavulânico	9
2.3.1. Biossíntese do ácido clavulânico	11
2.4. Produção de ácido clavulânico por <i>Streptomyces clavuligerus</i>	15
2.4.1. Cultivos em batelada	15
2.4.2. Cultivos em batelada alimentada	18
2.5. Modelagem	21
2.6. Considerações Finais	23

Capítulo 3. Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Microrganismo	24
3.2. Equipamentos	24
3.3. Meios de Cultura	26

3.3.1. Meio de cultura de reativação.....	26
3.3.2. Meio de cultura de inóculo.....	27
3.3.3. Meio de cultura de produção.....	27
3.3.4. Meio de cultura suplementar.....	27
3.4. Conservação e Preservação do Microrganismo.....	28
3.4.1 Procedimento básico para preservação do microrganismo em criotubos.....	28
3.4.2. Procedimento básico para preservação do microrganismo em “slants”.....	29
3.5. Métodos Analíticos.....	29
3.5.1. Determinação da concentração celular (Cx).....	29
3.5.2. Caracterização reológica do caldo.....	30
3.5.3. Determinação da concentração de glicerol (Cs).....	30
3.5.4. Determinação da concentração de ácido clavulânico (Cp).....	31
3.5.4.1. Método CLAE.....	31
3.5.4.2. Método espectrofotométrico.....	31
3.5.5. Análise de aminoácidos.....	32
3.6. Metodologia experimental.....	32
3.7. Ensaio em Biorreator.....	34
3.7.1 Estudo da influência da ornitina na produção de AC em cultivos em batelada e em batelada alimentada.....	34
3.7.1.1. Cultivos em batelada.....	34
3.7.1.2. Cultivos em batelada alimentada.....	34
3.7.2. Modelagem cinética da produção de AC em cultivos em batelada e em batelada alimentada.....	35
3.7.3. Estudo da influência da composição do meio suplementar na produção de AC em batelada alimentada.....	37
3.7.4. Avaliação da produção de AC em batelada alimentada em diferentes condições de alimentação.....	37
3.7.5. Variação de escala do biorreator - avaliação da produção de AC em batelada alimentada em bioreatores convencionais de 5 e 10L.....	38

Capítulo 4. Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
---------------------------------------	-----------

4.1 Estudo da influência da ornitina na produção de AC em cultivos em batelada e em batelada alimentada.....	40
4.1.1 Cultivos em batelada.....	40
4.1.2 Cultivos em batelada alimentada.....	48
4.2 Modelagem cinética da produção de AC em cultivos em batelada e em batelada alimentada.....	56
4.3 Estudo da influência da composição do meio suplementar na produção de AC em batelada alimentada.....	62
4.4 Avaliação da produção de AC em batelada alimentada em diferentes condições de alimentação.....	64
4.5 Variação de escala do biorreator - avaliação da produção de AC em batelada alimentada em biorreatores convencionais de 5 e 10L.....	72
4.6 Considerações Finais.....	76

Capítulo 5. Conclusões

5. CONCLUSÕES.....	78
---------------------------	-----------

Capítulo 6. Sugestões

6. SUGESTÕES.....	79
--------------------------	-----------

Capítulo 7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
---	-----------

Anexos

ANEXO1: Características da proteína isolada de soja.....	86
ANEXO 2: Artigo submetido ao Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology em fevereiro de 2008.....	87
ANEXO 3: Artigo publicado no Applied Microbiology and Biotechnology (Teodoro <i>et. al.</i>, 2006).....	88

Resumo

O ácido clavulânico (AC) é um potente inibidor de enzimas β -lactamases que clivam o anel β -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 se inclui o AC, a produção em BA é preferível, uma vez que torna possível controlar os níveis de nutrientes no caldo. No presente trabalho foi estudado a influência da alimentação de glicerol e ornitina na produção de ácido clavulânico (AC) por *S. clavuligerus* em cultivos em batelada e batelada alimentada operados a 800 rpm, 0,5 vvm e pH 6,8. Nos experimentos em batelada com diferentes concentrações de ornitina, as concentrações máximas de AC obtidas variaram na estreita faixa entre 0,46 e 0,56 g.L⁻¹. Contudo, o valor máximo da produtividade volumétrica em AC ($P_{p_{max}}=13,7 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) obtida no experimento com concentração de ornitina de 0,66 g.L⁻¹, foi 40% superior que o valor de $P_{p_{max}}$ obtido no cultivo padrão sem adição de ornitina. Nos experimentos em batelada alimentada operados em biorreator de 5L, com diferentes concentrações de ornitina na alimentação, a concentração de AC variou entre 1,254 e 1,405 g.L⁻¹. Portanto, sob as condições experimentais utilizadas, pode-se concluir que a presença de ornitina proporciona aumentos na $P_{p_{max}}$ em CA, mas não sua produção máxima, contrariando trabalhos publicados recentemente na literatura. Um modelo cinético para produto não associado ao crescimento considerando degradação do AC foi ajustado aos resultados experimentais dos cultivos em batelada e batelada alimentada, a partir do qual foi possível simular condições que se deveria conduzir os cultivos em batelada alimentada com o intuito de se obter maior produção de AC. Com respeito à influência do glicerol na presença de ornitina no meio de alimentação numa concentração de 3,7 g.L⁻¹, a concentração máxima de AC de 1,506 g.L⁻¹ foi obtida no cultivo BA7 mostrando o efeito positivo da combinação ornitina/glicerol na biossíntese de AC. Nos experimentos em BA em biorreator de 10 L, com diferentes alimentações de ornitina, as produções máximas de AC foram próximas, em torno de 1,6 g.L⁻¹, validando os resultados obtidos em escala de 5 L. Como principal conclusão, a presença de ornitina aumentou a produtividade volumétrica máxima em AC ($P_{p_{max}}$), mas não sua produção máxima, contrariando resultados anteriores publicados em literatura.

Abstract

The clavulanic acid (CA) is a powerful inhibitor of β -lactamases, enzymes that cleaves the β -lactam ring of penicillins and cephalosporins, inactivating these compounds. CA is traditionally produced by *Streptomyces clavuligerus* in batch and fed-batch cultivations. Considering that the products of the catabolism of easily assimilable carbon source repress the biosynthesis of secondary metabolites, including CA, its production in fed-batch mode is preferable because the control of nutrient level can be performed. In the present work the influence of glycerol and ornithine feeding on the clavulanic acid (CA) production by *S. clavuligerus* in batch and fed-batch cultivations was studied. Batch and fed-batch cultivations were performed at 800 rpm, 0.5 vvm and pH at 6.8. In batch experiments under different concentrations of ornithine, the maximum concentration of CA was within of a closed range between 0.46 and 0.56 g.L⁻¹. Nevertheless, the maximum value of volumetric productivity in CA ($P_{p_{max}}=13.7$ mg.L⁻¹.h⁻¹) was obtained in the experiment with ornithine at concentration of 0.66 g.L⁻¹, a value that is 40% higher than the $P_{p_{max}}$ obtained in run control without ornithine. In fed-batch experiments in 5 L bioreactor, with different ornithine feeding conditions, the maximum concentration of CA varied within the limited range of 1.254 and 1.405 g.L⁻¹. Therefore, under these experimental conditions, it can be concluded that the presence of ornithine increases the $P_{p_{max}}$ in CA but not its maximum concentration, contradicting literature. The kinetic model considering non-associated production with CA degradation was fitted to the experimental results of the batch and fed-batch cultivations. 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 AC production after the feeding indicate a possible inhibition/repression effect of glycerol. With the model, it was possible to simulate conditions that the cultivations should be performed with the intention of obtaining larger production of AC. With respect to the influence of glycerol in fed-batch experiments, in the presence of ornithine at the concentration of 3.7 g.L⁻¹ in feeding medium, the maximum CA concentration of 1.506 g.L⁻¹ was obtained in the run BA7 showing a positive effect of the combination ornithine/glycerol in the biosynthesis of CA. In fed-batch experiments in 10-L bioreactor, with different ornithine feeding conditions, the maximum concentrations of CA were near of 1.6 g.L⁻¹, validating the results obtained in 5-L bioreactor.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Figura ilustrativa do “ataque local” das β -lactamases nos antibióticos β -lactâmicos.

Figura 2.2: Ilustração da cultura de *Streptomyces clavuligerus* (DEQ/UFSCar)

Figura 2.3: Esquema representativo das enzimas ativas na biossíntese do AC e das 5S clavamas

Figura 2.4: Estrutura molecular do ácido clavulânico (AC)

Figura 2.5: Esquema da rota biossintética de produção do ácido clavulânico por *S. clavuligerus* (Bushell *et al.*, 2007)

Figura 3.1: Biorreator Bioflo 310 com dorna de 5L, New Brunswick Scientific

Figura 3.2: Metodologia experimental utilizada nos cultivos em batelada e batelada alimentada

Figura 4.1: Perfis de concentração relativos ao “cultivo padrão” (B1) em batelada para a produção de AC, sem adição de ornitina.

Figura 4.2: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada com ornitina B2 ($C_{orn}=0,66 \text{ g.L}^{-1}$).

Figura 4.3: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada com ornitina B3 ($C_{orn}=0,99 \text{ g.L}^{-1}$).

Figura 4.4: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada com ornitina B4 ($C_{orn}=1,32 \text{ g.L}^{-1}$).

Figura 4.5: Perfis de concentração relativos aos cultivos B2 ($C_{orn}=0,66 \text{ g.L}^{-1}$), B3 ($C_{orn}=0,99 \text{ g.L}^{-1}$) e B4 ($C_{orn}=1,32 \text{ g.L}^{-1}$): (a) concentrações de ornitina e AC; (b) concentrações de ornitina e arginina.

Figura 4.6: Perfis de concentração de AC (C_p) e de produtividade volumétrica (P_p) relativas aos cultivos com diferentes concentrações de ornitina: B1 ($C_{orn}=0,00 \text{ g.L}^{-1}$), B2 ($C_{orn}=0,66 \text{ g.L}^{-1}$), B3 ($C_{orn}=0,99 \text{ g.L}^{-1}$), e B4 ($C_{orn}=1,32 \text{ g.L}^{-1}$).

Figura 4.7: Perfis de concentração relativos ao cultivo padrão (B5) em batelada para a produção de AC, sem adição de ornitina.

Figura 4.8: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada alimentada BA1 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$; $C_{s_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$) sem adição de ornitina.

Figura 4.9: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada alimentada BA2 ($C_{orn_e}=11,10 \text{ g.L}^{-1}$)

Figura 4.10: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada alimentada BA3 ($C_{orn_e}=7,40 \text{ g.L}^{-1}$).

Figura 4.11: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada alimentada BA4 ($C_{orn_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$).

Figura 4.12: Perfis de concentração de AC (C_p) e de produtividade volumétrica (P_p) ao longo do cultivo em batelada (B5) e dos cultivos em batelada alimentada: BA1 ($C_{orn_e}=0,00 \text{ g.L}^{-1}$) BA2 ($C_{orn_e}=11,10 \text{ g.L}^{-1}$), BA3 ($C_{orn_e}=7,40 \text{ g.L}^{-1}$) e BA4 ($C_{orn_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$).

Figura 4.13: Perfil de concentração de ornitina (C_{orn_e}) dos cultivos em batelada alimentada: BA2 ($C_{orn_e}=11,10 \text{ g.L}^{-1}$), BA3 ($C_{orn_e}=7,40 \text{ g.L}^{-1}$), e BA4 ($C_{orn_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$).

Figura 4.14: Ajuste do modelo cinético aos valores experimentais do cultivo em batelada (B1).

Figura 4.15: Resultados experimentais e simulados da concentração de AC relativos (C_p) e concentração de glicerol (C_s) ao cultivo FB1 realizado com $F=0,08 \text{ L.h}^{-1}$ e $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$.

Figura 4.16: Resultados experimentais e simulados de C_p relativos aos cultivos FB2 ($F=0,08 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$), FB3 ($F=0,04 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$), FB4 ($F=0,02 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{s_e}=60 \text{ g.L}^{-1}$) e BA1 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{s_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$).

Figura 4.17: Comparação dos perfis de concentração de AC (C_p) simulados e experimentais relativos aos cultivos em batelada alimentada: BA1 ($C_{orn_e}=0,00 \text{ g.L}^{-1}$) BA2 ($C_{orn_e}=11,10 \text{ g.L}^{-1}$), BA3 ($C_{orn_e}=7,40 \text{ g.L}^{-1}$) e BA4 ($C_{orn_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$).

Figura 4.18: Perfis de concentração de AC (C_p) ao longo dos cultivos BA4 (meio completo) e BA5 (meio simples) com $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{orn_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$ e $C_{s_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$

Figura 4.19: Perfis de concentração de AC (C_p) ao longo dos cultivos em batelada alimentada com $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$ e $C_{orn_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$: BA5 ($C_{s_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$), BA6 ($C_{s_e}=150 \text{ g.L}^{-1}$), BA7 ($C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$) e BA8 ($C_{s_e}=240 \text{ g.L}^{-1}$)

Figura 4.20: Perfis de concentração de glicerol (C_s) e do índice de consistência (K) ao longo dos cultivos em batelada alimentada com $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$ e $C_{orn_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$: BA5 ($C_{s_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$), BA6 ($C_{s_e}=150 \text{ g.L}^{-1}$), BA7 ($C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$) e BA8 ($C_{s_e}=240 \text{ g.L}^{-1}$)

Figura 4.21: Perfis de concentração de AC (C_p) ao longo dos cultivos BA7 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$) e BA9 ($F=0,005 \text{ L.h}^{-1}$)

Figura 4.22: Perfis de concentração de glicerol (C_s) e do índice de consistência (K) ao longo dos cultivos em batelada alimentada com $C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$ e $C_{orn_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$: BA7 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$) e BA9 ($F=0,005 \text{ L.h}^{-1}$)

Figura 4.23: Perfis de concentração relativos ao cultivo padrão (B6) em batelada para a produção de AC, sem adição de ornitina.

Figura 4.24: Perfis de concentração de glicerol (Cs) e do índice de consistência (K) ao longo dos cultivos em batelada alimentada com $C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$ e $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$: BA10 ($C_{o_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$) e BA11 ($C_{o_e}=5,55 \text{ g.L}^{-1}$)

Figura 4.25: Perfis de concentração de AC (Cp) e de produtividade volumétrica (Pp) ao longo dos cultivos em batelada alimentada com $C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$ e $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$: BA10 ($C_{o_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$) e BA11 ($C_{o_e}=5,55 \text{ g.L}^{-1}$)

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Ensaios realizados para cultivos em Batelada e Batelada Alimentada (B: batelada, BA: batelada alimentada)

Tabela 4.1: Valores otimizados de β e k_d (graus de confiança de 95%)

Tabela 4.2: Resultados de produção de AC obtidos na literatura e no presente trabalho

Tabela 4.3: Coeficientes de rendimento e concentração de AC obtida nos Cultivos em batelada e batelada alimentada

Tabela 4.4: Cronograma resumido da conservação e preservação do microrganismo *S. clavuligerus* ATCC 27064 após a etapa de liofilização.

Lista de Símbolos

AC – Ácido clavulânico

B – Batelada

BA – Batelada alimentada

C_x – Concentração celular - (g.L⁻¹)

C_s – Concentração de substrato (glicerol) - (g.L⁻¹)

C_{se} – Concentração de substrato (glicerol) no meio de cultura suplementar - (g.L⁻¹)

C_p – Concentração de produto (AC) - (g.L⁻¹)

C_{pmax} – Concentração máxima de produto (AC) - (g.L⁻¹)

C_{psim} – Concentração de produto (AC) simulado - (g.L⁻¹)

C_{orn} – Concentração de ornitina - (g.L⁻¹)

C_{orne} – Concentração de ornitina suplementar - (g.L⁻¹)

CV – Células vegetativas

D – Taxa de diluição (D=F/V) - (h⁻¹)

ES - Esporos

F – vazão de alimentação - (L.h⁻¹)

FB – batelada alimentada (“Fed-batch”) para os cultivos realizados na dissertação de mestrado de Teodoro, 2004.

f(C_{s1}) – Função degrau (0-1) que depende da concentração de glicerol na qual se inicia a morte celular

f(C_{s2}) – Função degrau (0-1) que depende da concentração crítica de glicerol na qual se inicia a biossíntese de AC

K – Índice de consistência - (dina.cm⁻².sⁿ)

k_d – Constante de morte celular - (h⁻¹)

k_{dp} – Constante de degradação de produto - (h⁻¹)

K_s – Constante de saturação - (g.L⁻¹)

MI – Meio de cultura de inóculo

MR – Meio de cultura de reativação

MP – Meio de cultura de produção

n – Índice de comportamento de escoamento (adimensional)

OD – Oxigênio dissolvido - (%)

P_p – Produtividade volumétrica (C_p/t) - ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

$P_{p_{\max}}$ – Produtividade volumétrica ($C_{p_{\max}}/t_{C_{p_{\max}}}$) - ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

V – Volume - (L)

$Y_{x/s}$ – Coeficiente de rendimento de substrato a células - (gx.gs^{-1})

$Y_{p/s}$ – Coeficiente de rendimento de substrato a produto - (gp.gs^{-1})

$Y_{p/orn}$ – Coeficiente de rendimento de ornitina a produto - (gp.gorn^{-1})

β – Velocidade específica de produção de AC - ($\text{g}_{CA}.\text{g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$)

γ – Gradiente de velocidade – (s^{-1})

η_p – Eficiência - (%)

θ – Tempo de residência

μ – Velocidade específica de crescimento celular - (h^{-1})

μ_{\max} – Velocidade específica máxima de crescimento celular – (h^{-1})

τ – Tensão de cisalhamento – (dina.cm^{-2})

1. INTRODUÇÃO

Dos produtos tradicionais obtidos por processos fermentativos, os mais importantes para a saúde humana são os metabólitos secundários, destacando-se os antibióticos, compostos químicos produzidos por microrganismos e por via sintética que, em baixas concentrações têm como propriedade comum a atividade bactericida, quando eliminam as bactérias provocando a destruição da parede bacteriana, e bacteriostática, quando detêm o crescimento das bactérias, deixando ao sistema imunológico a tarefa de eliminar a infecção (Demain e Elander, 1999).

Segundo Elander (2003), os antibióticos beta-lactâmicos obtidos por via fermentativa representam 65% do mercado mundial de antibióticos produzidos industrialmente. Possuem este nome por apresentarem em sua estrutura um anel beta-lactâmico, geralmente ligado formando um anel bicíclico ou presente como anel isolado (monobactams) (Essack *et al.*, 2001).

Certas bactérias podem adquirir uma resistência especial a um determinado antibiótico. Isto acontece quando a bactéria se desenvolve seguindo uma via metabólica que não é bloqueada pela ação do fármaco, ou consegue produzir uma enzima que torna inativo o próprio antibiótico. Esta resistência é uma consequência inevitável da seletividade imposta pelo mau uso ou uso indiscriminado dos antibióticos (Sanders e Sanders, 1979; Spratt, 1994). Para nenhum grupo de antibióticos esta resistência ou suas consequências são mais evidentes do que para os beta-lactâmicos, que representam cerca de 50% dos antibióticos de uso sistemático pela sua alta eficácia, segurabilidade e disponibilidade de vários derivados (Essack *et al.*, 2001). O mais importante mecanismo de resistência das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é a habilidade de produzirem enzimas beta-lactamases que hidrolisam o anel beta-lactâmico de penicilinas e cefalosporinas tornando-as inativas.

Em 1977, Reading e Cole publicaram um trabalho a respeito da descoberta de um potente inibidor de beta-lactamases, o qual foi denominado ácido clavulânico (AC), capaz de inibir irreversivelmente uma grande gama dessas enzimas. O ácido clavulânico é empregado de forma associada com penicilinas semi-sintéticas, apresentando assim o melhor uso de um inibidor de beta-lactamases combinado com um antibiótico sensível à ação destas (Chen *et al.*, 2002). A combinação amoxicilina/clavulanato representa um agente bactericida de largo espectro, cujo uso já tem mais de 20 anos (Buynak, 2006). No Brasil, os medicamentos compostos de clavulanato de potássio e amoxicilina são comercializados pelos

laboratórios Rambaxy, Novartis, Eurofarma, EMS, Brainfarma (genéricos), Haller (Clavoxil), Ache (Novamox) e GlaxoSmithKline Farmacêutica (Clavulin) (www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/lista/registrados.htm).

O AC é tradicionalmente produzido em cultivos em batelada ou batelada alimentada pela bactéria *Streptomyces clavuligerus*, utilizando um meio de cultura complexo contendo glicerol e derivados de soja como fontes de carbono (C), nitrogênio (N) e energia, respectivamente (Mayer e Deckwer, 1996, Chen *et al.*, 2002, 2003; Wang *et al.*, 2005; Teodoro *et al.*, 2006a; Ortiz *et al.*, 2007). Os diferentes precursores e suas concentrações podem gerar o acúmulo de diferentes metabólitos no caldo de fermentação e no caso do AC, os níveis das fontes de carbono e nitrogênio podem influenciar de forma quantitativa a síntese do produto (Gouveia *et al.*, 1999; Kirk *et al.*, 2000).

Os aminoácidos têm importante papel na regulação metabólica do nitrogênio em *Streptomyces sp*, sendo estes precursores de um grande número de antibióticos, incluindo o ácido clavulânico e a cefamicina C produzidos em particular por *S. clavuligerus* (Bushell *et al.*, 2006).

A literatura reporta vários trabalhos com ênfase à importância do glicerol e dos aminoácidos na produção de AC, pois estes mantêm o crescimento celular e aumentam a formação de AC na idiofase, tanto em processos em batelada quanto em batelada alimentada. Entretanto, esses estudos foram realizados em mesa incubadora rotativa em condições de limitação de oxigênio, o que não ocorre industrialmente, e o consumo dos aminoácidos durante o processo não foi avaliado, o que dificulta o entendimento do papel destes na formação do AC (Mayer e Deckwer 1996; Chen *et al.* 2002, 2003; Wang *et al.* 2005; Saudagar e Singhal, 2007).

Um dos escopos deste trabalho foi justamente estudar a influência da adição dos precursores da molécula de AC, como o glicerol e a ornitina, visando à definição de condições de cultivo adequadas para a produção de AC em biorreator convencional de bancada em condições apropriadas de suplementação de oxigênio. As conclusões obtidas aqui colaboram na elucidação da rota biossintética de produção do AC, tornando os estudos relacionados à produção e a síntese da molécula em si um assunto de mais fácil entendimento.

O presente trabalho se insere numa linha de pesquisa desenvolvida no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar (LEB-DEQ/UFSCar), voltada à produção de AC por *Streptomyces clavuligerus*. Estudos realizados anteriormente pelo grupo investigaram diversos aspectos do processo de produção do AC. Gouveia *et al.* (1999), realizaram estudos preliminares comparando diferentes fontes

de nitrogênio: aminoácidos, farinha de soja, isolado protéico de soja, onde se verificou que se obtiveram melhores resultados com a última. Trabalhos subseqüentes estudaram a cinética de formação do AC em biorreator de 4L, utilizando glicerol como fonte de C e peptona e proteína isolada de soja como fontes de N (Baptista-Neto *et al.*, 2000); diferentes composições do meio de cultura, combinando diferentes fontes de nitrogênio (Gouveia *et al.*, 2001); avaliação do desempenho de biorreator “airlift” para a produção de AC (Cassiano Filho *et al.*, 2003); determinação das melhores condições de agitação e aeração (Rosa *et al.*, 2005); comparação entre biorreator convencional e “airlift” de circulação interna para produção de AC (Cerri *et al.*, 2005); utilização de óleo vegetal na produção de AC (Maranesi *et al.*, 2005); estudo da utilização da resina PEG-fosfato para extração do AC do caldo fermentado (Hirata *et al.*, 2005); estudo da influência das condições de alimentação com meio contendo glicerol (Teodoro *et al.*, 2006a); utilização de derivados de soja no meio para a produção de AC (Ortiz *et al.*, 2007).

1.1 OBJETIVOS

Face ao apresentado anteriormente, com o intuito de dar continuidade ao estudo da produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* no LEB-DEQ/UFSCar, o presente trabalho focou os seguintes objetivos:

Objetivo Geral:

Estudo do processo de produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* em biorreator convencional de bancada visando à obtenção de altas concentrações de produto.

Objetivos Específicos:

Na busca de se alcançar o objetivo geral estabelecido, propôs-se os seguintes objetivos específicos:

- i) Estudo da influência da L-ornitina na produção de AC em cultivos em batelada e em batelada alimentada;

- ii) Estudo da influência da composição do meio suplementar na produção de AC em batelada alimentada;
- iii) Avaliação da produção de AC em batelada alimentada em diferentes condições de alimentação;
- iv) Modelagem cinética da produção de AC em cultivos em batelada e em batelada alimentada;
- v) Variação de escala do biorreator - avaliação da produção de AC em batelada alimentada em bioreatores convencionais de 5 e 10 L.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Metabólitos secundários e antibióticos

Dos produtos tradicionais obtidos por processos fermentativos, os mais importantes à saúde humana e animal são os metabólitos secundários, que estão relacionados aos produtos do metabolismo primário essenciais ao crescimento celular (Demain *et al.*, 1999). 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 microrganismos competidores (Bains, 1993).

Os exemplos mais conhecidos de metabólitos secundários são os antibióticos. Estes são agentes quimioterápicos que, em baixas concentrações, têm a capacidade de destruir ou inibir o crescimento de outros microrganismos. Atualmente a maioria dos antibióticos é produzida sinteticamente, sendo alguns totalmente sintéticos (cloranfenicol), enquanto outros são parcialmente sintéticos (penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas), Calleri *et al.* (2004).

Dentre as várias formas de atuação dos antibióticos está a inibição da 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. Um conjunto particular de antibióticos que atuam por este mecanismo é conhecido como β -lactâmico (Neu *et al.*, 1999).

Nota-se que muitos dos medicamentos desenvolvidos desde a descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, já possuem patógenos resistentes, mostrando que as bactérias têm a capacidade de desenvolver mecanismos ou mutações para resistir ao efeito dos antibióticos.

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

Embora os antibióticos β -lactâmicos apresentem grande eficácia no combate à maioria das bactérias patogênicas, ao longo dos anos algumas linhagens foram desenvolvendo resistência, como tem sido amplamente reportado na literatura (Nayler, 1987; Coleman *et al.*,

1994). A maior causa de resistência a estes antibióticos é a existência das enzimas β -lactamases sintetizadas por microrganismos resistentes, que catalisam irreversivelmente a ligação amida do anel β -lactâmico, resultando na inativação do produto, isto é, gerando um produto sem ação bacteriana (Essack *et al.*, 2001). A Figura 2.1 ilustra o ponto onde ocorre a ação das β -lactamases nos antibióticos β -lactâmicos.

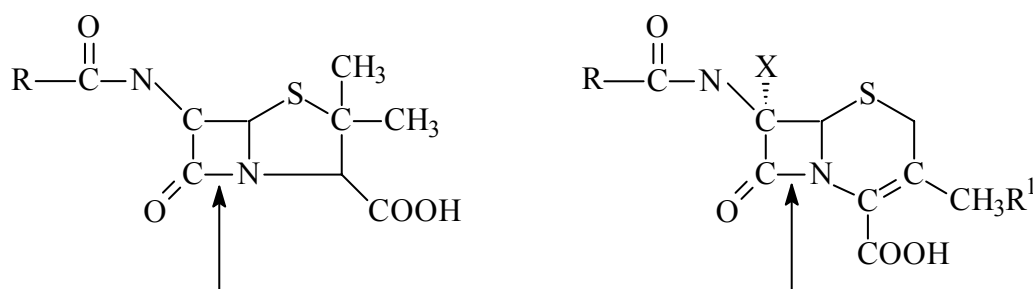


Figura 2.1: Figura ilustrativa do “ataque local” das β -lactamases nos antibióticos β -lactâmicos.

Existem várias maneiras de se evitar a ação destrutiva das enzimas β -lactamases: alterando a estrutura dos compostos β -lactâmicos, fazendo com que estes fiquem insensíveis às β -lactamases enquanto mantêm seu potencial; utilizando um reagente que bloqueie a ação da enzima β -lactamase, por exemplo, o ácido clavulânico em conjunto com um antibiótico β -lactâmico sensível a estas (Hakimelahi *et al.*, 2002).

Embora tenham sido desenvolvidos antibióticos β -lactâmicos mais potentes com a aplicação das técnicas anteriormente referidas, surgiu o interesse de se estudar os inibidores das enzimas β -lactamases que poderiam de alguma forma recuperar a ação destes antibióticos. Assim, após a execução de um grande programa de pesquisa em 1976, pesquisadores da GlaxoSmithKline descobriram e isolaram o composto β -lactâmico denominado de ácido clavulânico (AC), caracterizado como um potente inibidor destas enzimas, composto obtido de cultura da 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 se incluem os actinomicetos (Thykaer e Nielsen, 2003).

Os actinomicetos, organismos intermediários nas propriedades entre bactérias e os fungos verdadeiros, constituem o grupo ao qual pertence o gênero *Streptomyces sp*, atualmente responsável por 80% dos antibióticos utilizados (Chalis e Hopwood, 2003). Estes são microrganismos Gram-positivos, aeróbios, primariamente habitantes do solo onde atuam como importantes decompositores, que quando cultivados em culturas submersas têm a capacidade de produzir hifas vegetativas (micélios) que não se fragmentam com facilidade (Piret e Demain, 1988).

A espécie *S. clavuligerus* foi isolada em 1971 por Nagarajan e colaboradores (Nagarajan *et al.*, 1971 *apud* Jensen e Paradkar, 1999) a partir de um trabalho de seleção de microrganismos capazes de produzirem compostos β -lactâmicos resistentes às enzimas β -lactamases. A Figura 2.2 ilustra o crescimento na forma de micélios de uma cultura de *Streptomyces clavuligerus* realizada no DEQ/UFSCar.

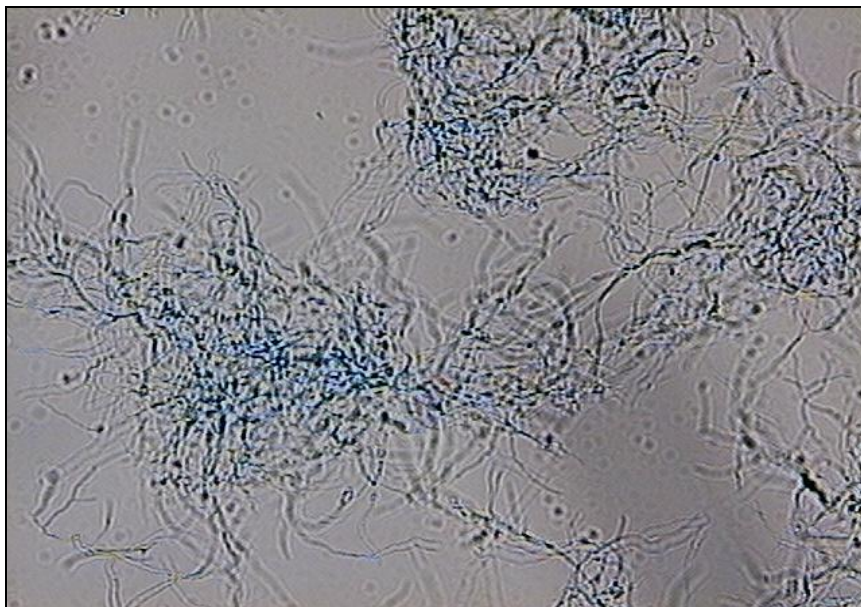


Figura 2.2: Ilustração da cultura de *Streptomyces clavuligerus* (DEQ/UFSCar)

O crescimento em placas mostra formação de colônias circulares, superfície rugosa, margens levemente onduladas, não espalhadas, levemente aderentes, branco leitoso no início e cinza quando ocorre a formação de hifas aéreas, anterior à fase de esporulação. Quando cultivado em meio de cultura sintético por 24 horas a 28°C apresenta ligeira turvação do meio por causa do crescimento do micélio, que formam hifas de 0,5 a 1,0 μm de diâmetro (Bushell, 1988).

Streptomyces clavuligerus é um dos mais importantes microrganismos do ponto de vista industrial, sendo capaz de produzir diversos metabólitos secundários, incluindo vários antibióticos β -lactâmicos como cefamicina C, penicilina N, desacetoxicefalosporina C, além do ácido clavulânico (Neves *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 1984). Esta diversidade de atividade metabólica é possível devido seu extenso genoma composto por centenas de fatores de transcrição que controlam seus genes de expressão fazendo que estes sejam específicos para cada necessidade (Jensen e Paradkar, 1999).

Por se tratar de uma bactéria estritamente aeróbia e filamentosa, o cultivo de *S. clavuligerus* apresenta elevada demanda de oxigênio e, simultaneamente, gera caldos com alta viscosidade aparente, o que dificulta a transferência de O_2 da fase gasosa para a fase líquida, reduzindo a concentração de O_2 dissolvido, limitando o crescimento bacteriano e a própria biossíntese do produto de interesse. Para superar tal demanda de oxigênio, faz-se necessário o emprego de altas vazões de alimentação de ar ou ar enriquecido com O_2 e, principalmente, operar o biorreator com altas frequências de rotação do eixo do agitador, o que gera altos valores de cisalhamento no interior do biorreator. Deve-se salientar que sob altas condições de cisalhamento a produção de AC por *S. clavuligerus* é melhorada (Rosa *et al.*, 2005).

De acordo com Puentes *et al.* (1989), esta bactéria não consome facilmente mono e dissacarídeos como glicose, frutose, sacarose e lactose normalmente utilizadas como principais fontes de carbono e energia em processos fermentativos.

A escolha das fontes de C e N utilizadas no cultivo de *S. clavuligerus* pode levar à produção específica de AC ou de outros compostos clavâmicos, que diferem entre si principalmente pela estereoquímica da molécula formada. O grupo das clavamas com estereoquímica 3S,5S não apresentam atividade contra β -lactamases, diferenciando-se assim do AC, embora possuam alguma propriedade antibactericida ou antifúngica que os torna interessante industrialmente (Jensen *et al.*, 2004). A Figura 2.3 ilustra o esquema representativo das enzimas ativas na biossíntese do AC e das clavamas 5S proposto por Jensen *et al.* (2004).

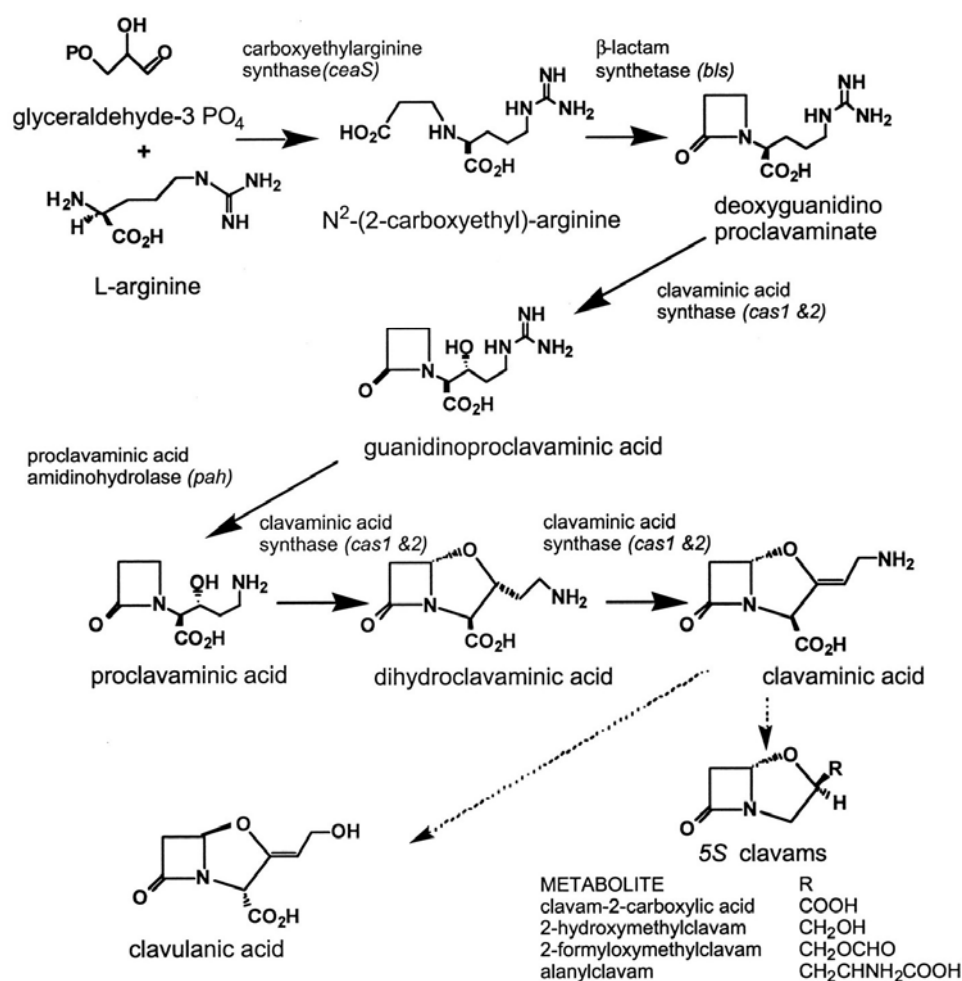


Figura 2.3: Esquema representativo das enzimas ativas na biossíntese do AC e das 5S clavamas (Jensen *et al.*, 2004)

2.3. Ácido clavulânico

O ácido (3R,5R,Z)-3-(2-hidroxietilideno)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo-[3,2,0]-heptano-2-carboxílico é o nome do ácido clavulânico (AC) de acordo com a IUPAC. Este possui uma estrutura molecular formada por dois anéis, o β-lactâmico e o anel oxazolidínico (Nabais *et al.*, 2000), como ilustra a Figura 2.4. A massa molar do AC é de aproximadamente 199 g.mol⁻¹.

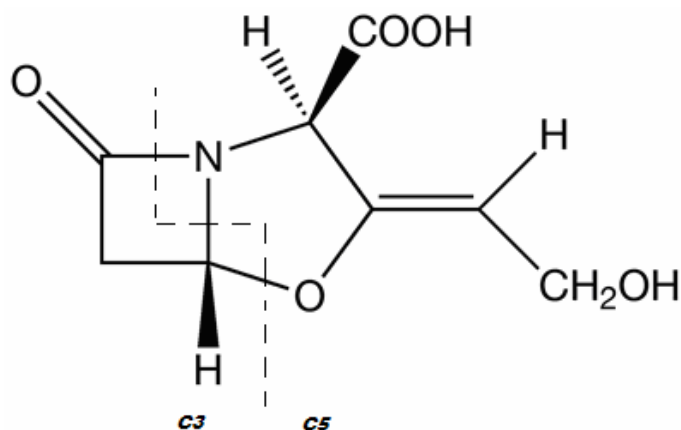


Figura 2.4: Estrutura molecular do ácido clavulânico (AC)

O ácido clavulânico (AC) foi identificado e descrito pela primeira vez como um produto de *S. clavuligerus* por Brown *et al.* (1976). A ação do AC associado com diversos antibiótico foi motivo de estudo de diversos pesquisadores. Yamaoka e colaboradores (1990) estudaram o efeito de vários antibióticos β -lactâmicos contra a bactéria *Bacteroides fragilis*. Observaram que na presença de AC, a concentração de ampicilina utilizada para inibir a proliferação das colônias foi de $6,25 \text{ mg.L}^{-1}$, muito inferior que a quantidade de 1600 mg.L^{-1} necessária sem a adição do AC. Desde então o ácido clavulânico (AC) tornou-se o mais conhecido dentre os compostos clavâmicos, sendo um potente inibidor de β -lactamases produzidas por bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (Kim *et al.*, 2001).

O AC em sua forma molecular é quimicamente instável, assim como outros compostos β -lactâmicos, sendo utilizado clinicamente na forma de um sal de potássio, denominado clavulanato de potássio. Bersanetti *et al.* (2005) observaram que o AC é mais estável em pHs em torno de 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.

A forma de atuação do AC é bastante conhecida. Sabe-se que a molécula se liga irreversivelmente ao grupo hidroxila de um resíduo de serina presente no sítio ativo de β -lactamases, produzindo um intermediário acilado estável e resultando na inativação da enzima. Devido à sua atividade anti- β -lactamásica, o AC é usado clinicamente em combinação com outros antibióticos, apresentando bons resultados no tratamento de infecções bacterianas, sendo restrito apenas em situações onde estas combinações causam efeitos colaterais (Gresser *et al.*, 2001).

A utilização do ácido clavulânico como inibidor de β -lactamases é realizada em conjunto com um antibiótico β -lactâmico convencional, que possui maior ação antibacteriana, mas é sensível as β -lactamases (Baggaley *et al.*, 1997). Esta combinação apresenta um amplo espectro antibactericida, sendo utilizada há mais de 20 anos e com grande aplicação até hoje (Buynak, 2006).

Um dos medicamentos comercializados no Brasil é o Clavulin[®] (Glaxo SmithKline do Brasil Ltda.), uma combinação de 500 mg de amoxicilina e 125 mg de ácido clavulânico. Existem outras combinações entre o AC/amoxicilina, mas a relação de 1/4 é sempre mantida. Há ainda a utilização do AC associado à amoxicilina (Augmentin[®]), porém este medicamento não é comercializado no Brasil.

Devido à frequência da administração clínica dessas combinações, não é surpresa que a resistência a estes inibidores tenha surgido, já que as bactérias possuem altas taxas de reprodução e têm mutações frequentes. O termo “resistência a inibidores” se refere usualmente à resistência amoxicilina/clavulanato e não necessariamente implica na resistência a outros inibidores (Buynak, 2006).

Estudos recentes mostram que a incidência total de resistência à combinação amoxicilina/AC está em torno de 3-5% (Kayene *et al.*, 2004). Entretanto, historicamente a resistência a uma classe de antibióticos aparece após seu uso contínuo por vários anos, o que torna inevitável o estudo de novos antibióticos, que invariavelmente também encontrarão resistência futura (Buynak, 2006).

2.3.1. Biossíntese do ácido clavulânico

Diversos estudos foram realizados em relação à biossíntese do ácido clavulânico pela sua semelhança química estrutural com cefalosporinas e penicilinas, onde se achava que os mecanismos biossintéticos seriam semelhantes. Porém, esta hipótese foi descartada com o conhecimento de parte da rota biossintética das penicilinas e cefalosporinas, que requerem substratos específicos incompatíveis com os precursores do AC (Jensen e Paradkar, 1999).

Braña *et al.* (1983) observaram que a interferência do glicerol e de outras fontes de carbono na produção de antibióticos em células em repouso de *S. clavuligerus* dependeu das condições de aeração. Ou seja, quando a concentração de oxigênio dissolvido

foi mantida em níveis altos, a velocidade de produção de antibióticos não foi influenciada pela concentração das fontes de carbono utilizadas.

Contudo, desde a descoberta do AC vários estudos têm sido realizados com o intuito de se conhecer mais esses precursores. Romero *et al.* (1984) propuseram através de estudos com arginina, ácido glutâmico e ornitina, que os carbonos do anel β -lactâmico do AC eram originários do glicerol e os demais carbonos eram provenientes da ornitina que pode ser sintetizada a partir do ácido glutâmico ou da arginina.

Guteman *et al.* (1985) propuseram que o ácido clavulânico tinha como precursor o ácido beta-hidroxiacético proveniente do metabolismo do glicerol com o ácido glutâmico ou a ornitina.

Elson *et al.* (1987) propuseram o ácido proclavamínico, isolado do extrato micelial de cultivos com *S. clavuligerus*, como intermediário na síntese do AC. A semelhança estrutural entre o ácido proclavamínico e o ácido clavamínico levou ao estudo e a descoberta da enzima claviminato sintetase, que após alguns estágios converte o ácido proclavamínico em ácido clavulânico.

Valentine *et al.* (1993) utilizaram um mutante de *S. clavuligerus* com as enzimas arginase (*argF* e *argG*) bloqueadas, o que impede a conversão do aminoácido ornitina em arginina, para o estudo da biossíntese do AC. Os autores observaram, numa seqüência análoga ao ciclo da uréia em mamíferos, que a arginina é o precursor direto do ácido clavulânico.

Ives e Bushell (1997) e Pitlik e Townsend (1997) propuseram o piruvato como precursor do anel β -lactâmico e 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, que pode ser o glicerol ou o piruvato, como precursores do ácido clavulânico.

Ives e Bushell (1997) concluíram que a adição de arginina aumentou o número de metabólitos produzidos por *Streptomyces clavuligerus*, porém este aumento não seria necessariamente na biossíntese de ácido clavulânico. A importância da ornitina na síntese do AC não é somente fornecer o carbono C₅ da estrutura do anel oxazolidínico, mas também por favorecer a competição pelo carbono C₃ proveniente do glicerol.

Pérez-Redonto *et al.* (1999), através da identificação do gene *pyc* (“piruvato-converting”), demonstraram que o piruvato é precursor do ácido clavulânico, pois um microrganismo que não possui este gene é incapaz de produzi-lo. A inativação do gene *pyc* levou à incapacidade de se produzir o ácido clavulânico em cultivos em meios complexos,

porém não em meios definidos como o GSPG (que contém glicerol, sacarose, prolina, ácido glutâmico e sais minerais) sugerindo a existência de uma rota metabólica alternativa para produzir o anel β -lactâmico diretamente a partir do glicerol.

A incorporação da arginina como precursor direto do ácido clavulânico depende da concentração de ornitina presente no caldo, por ser esta intermediária na biossíntese da arginina, desde que a enzima ornitina carbamoil transferase produzida por *Streptomyces clavuligerus* tenha a atividade da arginase, que converte arginina em ornitina (Liras e Rodríguez-Garcia, 2000).

No momento se conhecem no mínimo oito genes relacionados com a biossíntese de AC. As etapas iniciais e finais da rota biossintética do AC ainda permanecem pouco esclarecidas. Entretanto, confirma-se que a síntese é iniciada com os precursores arginina e piruvato, continuando com a formação do ácido proclavamínico, que dá origem ao ácido clavamínico, como mostrado no esquema da Figura 2.3. A conversão do ácido clavamínico em ácido clavulânico implica em modificações na cadeia lateral, assim como a inversão da estereoquímica do anel, sendo que estas modificações estereoquímicas são responsáveis pela aquisição da atividade anti-beta-lactamásica, a qual atribui ao AC sua grande importância terapêutica e comercial (Liras e Rodríguez-Garcia, 2000).

Atualmente, a biossíntese do AC e de outros compostos clavâmicos vêm sendo melhor compreendidas. A sugestão de rotas metabólicas é o resultado da combinação de estudos bioquímicos relacionados com o isolamento e purificação de enzimas que atuam nos passos metabólicos da rota biossintética e de estudos dos genes que codificam estas enzimas.

A Figura 2.5 ilustra o esquema da rota biossintética proposta por Bushell *et al.* (2007), que leva em consideração o fluxo de carbonos, os aminoácidos e os ciclos presentes na formação da molécula de ácido clavulânico por *S. clavuligerus*.

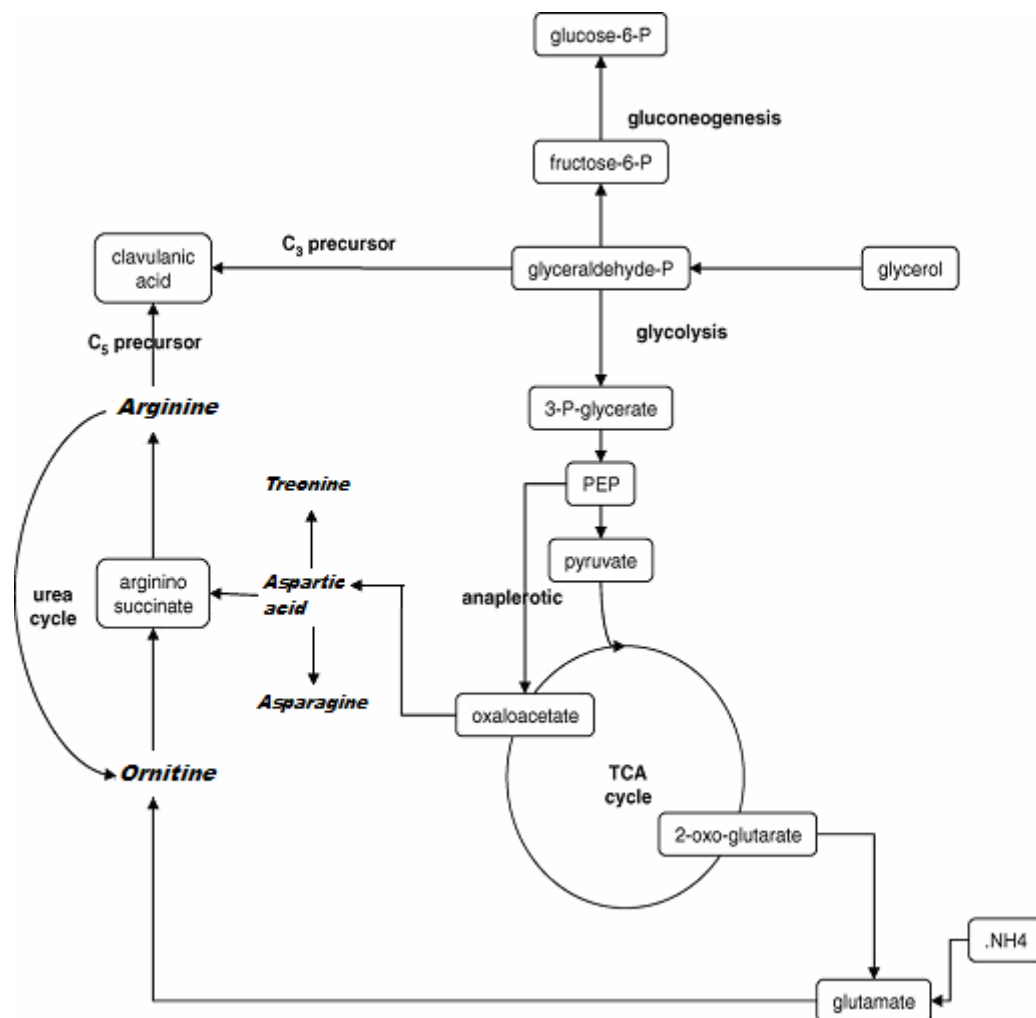


Figura 2.5: Esquema da rota biossintética de produção do ácido clavulânico por *S. clavuligerus* (Bushell *et al.*, 2007)

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, 1995).

Vários trabalhos recentes da literatura relatam que os aminoácidos têm um papel importante no mecanismo que regula o metabolismo de nitrogênio em *S. clavuligerus* e que estes são precursores de um grande número de antibióticos, incluindo em particular o AC e a cefamicina C (Chen *et al.*, 2002, 2003; Wang *et al.*, 2005; Bushell *et al.*, 2006).

O uso de proteínas como fonte de aminoácidos surge como uma alternativa para a adição destes ao meio de cultura. Sabe-se que a adição de aminoácidos individualmente costuma aumentar os custos do processo devido seu alto preço agregado. Entretanto a adição

de proteínas tem sua desvantagem quanto à heterogeneidade e possível variação na qualidade associada a estes complexos de nutrientes (Laat e Krabben, 2000). Na produção de ácido clavulânico são comumente utilizadas proteínas derivadas da soja como fonte de nitrogênio e glicerol como fonte de carbono (Butterworth, 1984).

2.4. Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*

Diferentes formas de cultivos podem ser adotadas para a produção de bioprodutos, principalmente metabólitos secundários, as quais incluem os cultivos em batelada, em batelada alimentada e contínuos.

Os cultivos em batelada são freqüentemente utilizados como padrões para comparações com outros modos de cultivo, e os cultivos em batelada alimentada são interessantes, pois podem proporcionar alto crescimento celular e a manutenção de condições que evitam repressão catabólica, gerando com isso uma alta produtividade do processo (Kim *et al.*, 2001).

2.4.1. Cultivos em batelada

Na literatura encontram-se alguns trabalhos relacionados com a produção de AC em cultivos em batelada utilizando o microrganismo *Streptomyces clavuligerus*.

Lebrini *et al.* (1987) estudaram a produção de cefamicina C e de AC por *S. clavuligerus* NRRL 3585, em mesa incubadora rotativa a 28°C, 250 rpm e pH controlado em 6,9, com controle na concentração de fosfato. Propuseram cultivos com diferentes concentrações iniciais de fosfato, 2 e 75 mM, e glicerol 5,5 e 2,5 g.L⁻¹, respectivamente. Observaram no primeiro caso, que a concentração celular foi de 0,8 g.L⁻¹ em base seca e a concentração de AC ficou em torno de 90 mg.L⁻¹. No segundo caso, a concentração celular foi de 2,0 g.L⁻¹ em base seca e a concentração máxima de AC foi 20 mg.L⁻¹. Concluíram, portanto, que altas concentrações de fosfato exercem efeito negativo na produção de AC, mostrando que este pode reprimir as enzimas que controlam a biossíntese da molécula.

Kranjc Sasa *et al.* (1997) propuseram a patente do processo de produção de ácido clavulânico em batelada, utilizando o microrganismo *S. clavuligerus* obtido após tratamento mutagênico, no qual a concentração de fósforo assimilável no meio de cultura

deve ser inferior a 0,15% m/v. Após 96 horas de cultivo, a produção de ácido clavulânico foi de 3,58 g.L⁻¹. As fontes assimiláveis de fósforo utilizadas foram fosfato de sódio, fosfato de potássio e fosfato diácido de potássio. As fontes de carbono e nitrogênio utilizadas foram, respectivamente, glicerol e amônia.

A patente depositada por Moreno-Valle *et al.* (1997) propõe cultivos em mesa incubadora rotativa utilizando o microrganismo *S. clavuligerus* ATCC 27064 após mutação por irradiação com UV e aplicação de NTG (nitrosoguanidina). Os cultivos foram realizados a 25°C, 250 rpm e pH 7,0, com meio de cultura composto basicamente de farinha de soja, dextrina de milho, acetato de sódio, óleo de soja e uma concentração inicial de fosfato solúvel de 1,580 g.L⁻¹. A concentração máxima obtida de AC foi de 2,24 g.L⁻¹ em 96 horas de cultivo.

Large *et al.* (1998) realizaram estudos sobre a influência da agitação no consumo de lipídeos e na produção de ácido clavulânico em cultivos com *Streptomyces clavuligerus* em fermentador de 7 L com volume de trabalho de 5 L, com um meio de cultura contendo 23 g.L⁻¹ de um óleo vegetal não especificado. A concentração máxima de biomassa foi obtida quando se aumentou a velocidade na ponta do impelidor de 1,88 para 2,83 m.s⁻¹. Os resultados mostram que o aumento na atividade da lipase ocorreu no inverso destas velocidades, indicando que esta atividade sofre os efeitos do aumento da agitação no biorreator. A concentração máxima de AC foi de 800 mg.L⁻¹ em 110 horas de cultivo, para uma velocidade na ponta do impelidor de 2,83 m.s⁻¹, levou os pesquisadores a concluir que a produção do AC foi limitada pela diminuição na atividade da lipase e por uma maior fragmentação do microrganismo.

Baptista-Neto *et al.* (2000) estudaram a cinética de formação de ácido clavulânico em biorreator convencional de bancada de 4 litros, utilizando como fonte de carbono o glicerol e como fontes de nitrogênio peptona e proteína isolada de soja. A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em torno de 40% de saturação. Após 35 horas de cultivo em batelada, a produção de AC do caldo com meio de cultura contendo peptona foi de 450 mg.L⁻¹ e a do caldo com meio contendo proteína isolada de soja foi de 800 mg.L⁻¹.

Na patente proposta por Laat e Krabben em 2000, os autores relatam que o crescimento do *S. clavuligerus* 27064, após mutação com irradiação UV e NTG, foi mais rápido em meios contendo aminoácidos ao invés de amônia como fonte de N. Em cultivos em batelada, com baixos níveis de glutamato livre no meio, cerca de 2,5 g.L⁻¹, a concentração máxima de AC foi 280 mg.L⁻¹ em 40 horas. O processo foi operado em fermentador de 29 L, com controle de temperatura em 30°C, oxigênio dissolvido em 50% e pH em torno de 6,95.

Roubos *et al.* (2001) estudaram a influência do cisalhamento sobre o crescimento de *Streptomyces clavuligerus* CBS 26.75 em reatores de 42 L com volume de trabalho de 20-35 L, operados em batelada. A concentração de O₂ dissolvido foi mantida em valores acima de 50% através da variação da vazão da corrente de alimentação de ar. O estudo concluiu que as células de *Streptomyces clavuligerus* são bastante sensíveis ao cisalhamento, para os meios de cultura compostos principalmente por maltose e glutamato; glicerol, glutamato e glicerol; glutamato e íons amônia, respectivamente. A produção máxima de AC ficou em torno de 490 mg.L⁻¹ em torno de 72 horas de cultivo.

Chen *et al.* (2003) estudaram a influência de ornitina no meio de cultura e seu efeito na produção de AC por *S. clavuligerus* ATCC 27064 em mesa incubadora rotativa. Utilizaram um meio de cultura composto basicamente de glicerol (15 g.L⁻¹), extrato de farinha de soja, peptona, K₂HPO₄ (1 g.L⁻¹), adicionado inicialmente dos aminoácidos L-ornitina e L-arginina com concentrações de 1,32 e 1,74 g.L⁻¹, respectivamente. Observaram que a biomassa não sofreu variação com o acréscimo dos aminoácidos e que o glicerol foi consumido mais rapidamente quando a ornitina foi adicionada. Quanto à concentração de AC, os autores observaram que com a adição de ornitina a produção foi de 200 mg.L⁻¹, o dobro sem a adição deste aminoácido, e que a arginina não promoveu aumento de AC quando adicionada sozinha.

Wang *et al.* (2005) fizeram um estudo sobre a otimização do meio de produção de AC utilizando *S. clavuligerus* ATCC 27064, em cultivos em batelada em mesa incubadora rotativa operada a 250 rpm e 28°C. Utilizando planejamento experimental chegaram a um meio de cultura contendo glicerol (15-18,75 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (0,1-0,125 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,2-0,25 g.L⁻¹) e concentrações otimizadas de ornitina, FeSO₄.7H₂O e farinha de soja, 1,2, 0,4 e 3,8 g.L⁻¹, respectivamente. A concentração máxima obtida de AC foi de 681 mg.L⁻¹, cerca de 50% superior em relação ao resultado com meio de cultura original (sem otimização).

No mesmo ano, Maranesi *et al.* (2005) avaliaram a produção de AC por *S. clavuligerus* ATCC 27064 em cultivos operados em mesa incubadora rotativa em batelada. Utilizaram diferentes concentrações e tipos de óleos comestíveis na composição do meio de cultura. A concentração máxima de AC, de 722 mg.L⁻¹ em 120 horas, foi obtida em cultivo com farinha de soja como fonte de N e glicerol e óleo de soja (23 g.L⁻¹) como fontes de carbono.

Ortiz *et al.* (2007) estudaram a influência dos tipos de derivados de soja utilizados como fonte de nitrogênio na produção de AC por *S. clavuligerus* 27064 em cultivos

em batelada operados em biorreator convencional de bancada de 5 L de volume total. Concluíram que na concentração de $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrogênio total, a produção de AC foi maximizada em cultivos com farinha de soja ao invés de proteína isolada de soja, como fonte de N. Observaram também que cultivos em batelada utilizando lipídios, no caso óleo de soja, simulam cultivos em batelada alimentada, já que o consumo de glicerol é definido pela hidrólise do óleo. A concentração máxima de AC, de 960 mg.L^{-1} , foi obtida utilizando 40 e 16 g.L^{-1} de farinha de soja e óleo de soja, respectivamente, no meio de cultura.

2.4.2. Cultivos em batelada alimentada

O termo cultivo em “batelada alimentada” se refere a cultivos em batelada onde há alimentação contínua do meio nutriente sem retirada do caldo.

O processo em batelada alimentada pode ser iniciado após se introduzir o inóculo, o qual deverá ocupar uma fração do volume útil da ordem de 10 a 20% do biorreator. A alimentação do meio de cultura suplementar deve empregar uma vazão adequada às condições experimentais definidas, sem ocorrer retirada do líquido fermentado. Essa operação prolonga-se até o preenchimento do volume útil do reator, quando então se pode iniciar a retirada do caldo fermentado para a recuperação do produto. Este modo de operação é usado principalmente em processos onde ocorre inibição do crescimento ou repressão da formação de produto por excesso de substrato (Schmidell *et al.*, 2001).

O objetivo dos cultivos em batelada alimentada é maximizar os índices que melhoram o desempenho do processo de produção, tais como produtividade e crescimento celular, manipulando as variáveis de controle como a temperatura, pH e vazão de alimentação de substrato (Betlem *et al.*, 2002). Este tipo de operação é interessante por possibilitar a manutenção da velocidade de crescimento celular em altos valores, quando o produto é associado ao crescimento, e em baixos valores quando há inibição ou repressão pelo substrato.

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

Na patente proposta por Puentes *et al.* (1989), utilizou-se o microrganismo *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585. A reativação foi realizada a pH 7,0 e 28°C por dois dias e o inóculo foi realizado nas mesmas condições. A produção foi realizada em biorreator de 340 L com diferentes vazões de alimentação e concentrações de glicerol ao longo do tempo. A concentração máxima de AC, de $1,40 \text{ g.L}^{-1}$ em 160 horas, foi obtida quando se

utilizou uma vazão de alimentação de $0,1 \text{ L.h}^{-1}$ ($0,0003 \leq D \leq 0,0005 \text{ h}^{-1}$) de uma solução que continha 1,5 % de glicerol.

Mayer e Deckwer (1996) utilizaram a linhagem de *Streptomyces clavuligerus* DMS 738 (ATCC 27064) para o estudo da produção e decomposição simultânea do AC, em cultivos em biorreator de 10 L. A produção de AC foi avaliada em meios de cultivo contendo glicerol e peptona, porém com fontes de N distintas: farinha de soja e extrato da farinha de soja, no qual foi adicionado também fosfato. Os cultivos foram alimentados continuamente com uma solução de 100 g.L^{-1} de glicerol de modo a manter a concentração de glicerol entre 1 e 4 g.L^{-1} durante todo o processo com $D = 0,0055 \text{ h}^{-1}$. A concentração máxima de AC, de 520 mg.L^{-1} em 90 horas, foi obtida utilizando o meio com farinha de soja.

Moreno-Valle *et al.* (1997) propuseram cultivos em batelada alimentada utilizando o microrganismo *S. clavuligerus* ATCC 27064 após mutação por irradiação com UV e aplicação de NTG (nitrosoguanidina), em biorreator de 450 L. Os cultivos foram realizados com meio de produção composto basicamente de farinha de soja, dextrina e óleo de soja. A alimentação foi realizada com diferentes vazões de óleo de soja (100 mL.h^{-1} de 10 a 120 horas), solução com 33% de glicerol (400 mL.h^{-1} de 32 a 120 horas) e uma solução de 1% de KH_2PO_4 ($400 - 1400 \text{ mL.h}^{-1}$ de 0 a 25 horas; $1500 - 5000 \text{ mL.h}^{-1}$ de 25 a 50 horas). A concentração máxima de AC foi de $4,02 \text{ g.L}^{-1}$ em 96 horas de cultivo.

Laat e Krabben (2000) relatam em patente que o crescimento do *S. clavuligerus* 27064, após mutação com irradiação UV e NTG, foi mais rápido em meios contendo aminoácidos ao invés de amônia como fonte de N. Os cultivos em batelada alimentada foram operados em biorreator de 29 L com volume de trabalho de 24 L. A alimentação foi composta de concentrações diferentes de glicerol, glutamato, K_2HPO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, em vazões que variavam de 50 até 150 g.h^{-1} ($D = 0,0052 \text{ h}^{-1}$). A concentração máxima de AC, 500 mg.L^{-1} em 78 horas, foi obtida com baixos níveis de glutamato livre no meio ($< 1,0 \text{ g.L}^{-1}$).

Nabais *et al.* (2000) utilizaram *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, conservado em tubos inclinados, em seus experimentos em batelada alimentada visando à produção de AC. Os cultivos foram realizados em biorreator de 8 L com volume de trabalho de 3,1 L, os meios de produção foram compostos basicamente de farinha de soja, dextrina hidratada, uma solução de glicerol a 87% e antiespumante. A alimentação se iniciou em 24 horas, e os meios suplementares variavam podendo ter a mesma composição do meio de produção ou composições distintas: farinha de soja e solução de glicerol (87%); farinha de soja, solução de glicerol (87%) e maltose monohidratada. Este último foi o que apresentou

produção máxima de AC, 1,6 g.L⁻¹ em 216 horas, com variações na vazão de alimentação de 5 até 22 mL.h⁻¹ ($0,0009 \leq D \leq 0,004 \text{ h}^{-1}$) e na agitação de 500 até 900 rpm.

Kim *et al.* (2001) estudaram a produção de AC utilizando *Streptomyces clavuligerus* KK, obtido após aplicação de NTG, imobilizado em “pellets” de PUP Z97-020. A produção foi estudada em biorreator de 2,5 L com volume de trabalho de 1,5 L, tanto no modo em batelada quanto em batelada alimentada. Foram realizados cultivos com células livres e imobilizadas, com meio de produção contendo farinha de soja, K₂HPO₄, MgSO₄ e óleo de soja. No cultivo com célula livre foi adicionado 22 mL uma solução de glicerol 70% v/v a cada 2 dias, e a concentração máxima de AC de 1,5 g.L⁻¹ foi obtida no sétimo dia de fermentação. No cultivo com células imobilizadas o volume de glicerol alimentado foi o mesmo, mas a concentração máxima de AC foi cerca de 200% maior, em torno de 3,1 g.L⁻¹ no quinto dia de fermentação, o que sugere que a imobilização trouxe vantagens ao processo, tanto na produtividade de AC como na prevenção da degradação desta molécula durante o processo fermentativo.

Chen *et al.* (2002) estudaram a produção de AC a partir de cultivos com *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. Os cultivos foram realizados em biorreator de 5 L com volume de trabalho de 3 L, para os cultivos em batelada, e de 2 L para os cultivos em batelada alimentada e em mesa incubadora rotativa. O meio de cultura de produção era composto de glicerol, extrato de farinha de soja, peptona, K₂HPO₄ e MgSO₄.7H₂O, e as condições de operação foram as seguintes para os cultivos em biorreator e em mesa incubadora rotativa, respectivamente, 28°C, 500 rpm, 1vvm e pH controlado em 7,0 e 28°C e 200 rpm. Em biorreator a alimentação foi realizada com uma solução de 100 g.L⁻¹ de glicerol, alimentada continuamente numa vazão de 0,01 L.h⁻¹ ($D = 0,004 \text{ h}^{-1}$). Em mesa incubadora rotativa 2 mL de uma solução de glicerol (250 g.L⁻¹) foi adicionada a cada 12 horas em 100 mL de caldo inicial. Para os cultivos em batelada as concentrações máximas de AC foram 115 e 230 mg.L⁻¹ nos cultivos em mesa incubadora rotativa e em biorreator, respectivamente. Nos cultivos em batelada alimentada as concentrações máximas de AC foram 270 e 280 mg.L⁻¹ nos cultivos em mesa incubadora rotativa e em biorreator, respectivamente.

No ano seguinte, Chen *et al.* (2003) reportaram resultados relativos a experimentos em batelada e batelada alimentada onde foi estudada a influência da adição de glicerol e dos aminoácidos ornitina e arginina na produção de AC. Nos cultivos em batelada alimentada, a concentração máxima de AC foi de 311 mg.L⁻¹, com adição de glicerol e ornitina e de 220 mg.L⁻¹, quando a alimentação continha somente glicerol. A alimentação teve início em 60 horas de cultivo, onde 2 mL de uma solução foi adicionada a cada 12 horas ($D =$

0,002 h⁻¹). Esta solução foi composta de 0,5 g de glicerol, 33 mg de ornitina e 43,5 mg de arginina. Nessas condições, a concentração máxima de AC foi de 311 mg.L⁻¹, cerca de 2,7 vezes maior que nos cultivos em batelada.

Teodoro *et al.* (2006a) investigaram a influência da concentração de glicerol e da vazão de alimentação para a produção de AC em cultivos em batelada alimentada utilizando o microrganismo *S. clavuligerus* ATCC 27064. Concluíram que a melhor condição experimental se deu com $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$ e $C_{s_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$. Nessas condições, a concentração de AC atingida foi maximizada, atingindo 700 mg.L⁻¹ em 130 horas de cultivo, praticamente o dobro do obtido no cultivo em batelada.

Recentemente, Saudagar e Singhal (2007) investigaram o efeito da alimentação de glicerol associado a aminoácidos na produção de AC em mesa incubadora rotativa, utilizando *S. clavuligerus* MTCC 1142, indicado como linhagem selvagem. A composição do meio de produção foi similar ao do meio de cultura GSPG (glicerol, sacarose, prolina e ácido glutâmico) modificado por Gouveia *et al.* (1999). A alimentação foi realizada pela adição de 2 mL da solução de suplementação (15 g.L⁻¹ de glicerol, 0,1 M de arginina, 1 M de treonina) a cada 12 horas ($D = 0,002 \text{ h}^{-1}$). A concentração máxima de AC foi de 1,31 e 1,86 g.L⁻¹ em 120 horas, quando a alimentação continha arginina e treonina, respectivamente.

2.5. Modelagem

A modelagem matemática é uma importante ferramenta em engenharia, ao estabelecer uma relação funcional entre as variáveis do processo. Desta forma, o modelo pode ser utilizado para prever e interpretar o comportamento do sistema, auxiliando na implementação de técnicas de otimização e controle das estratégias aplicadas (Gombert e Nielsen, 2000).

Os modelos cinéticos são classificados como modelos estruturados e não estruturados, segregados e não segregados. Quando aplicados a processos bioquímicos, os modelos estruturados descrevem a cinética das etapas intermediárias do bioprocessamento, enquanto o modelo não estruturado descreve uma cinética global, considerando uma velocidade média de todas as reações envolvidas no interior das células. Os modelos segregados consideram as características de cada indivíduo dentro da população microbiana, considerando as diferentes idades de uma população. Em contrapartida, o modelo não

segregado desconsidera a diferença entre as células, considerando uma distribuição média da população (Pinto e Lage, 2001).

Bailey e Ollis (1986) afirmam que a representação de um bioprocessamento deve ser realizada com modelos que mesclam modelos estruturados e segregados. Mesmo com modelos como estes que acabam sendo mais completos e por isso mais precisos, a estimativa do grande número de parâmetros acaba exigindo a elaboração de várias hipóteses que, ao invés de tornar o modelo mais simples, acabam por dificultar sua resolução.

A modelagem de cultivos em biorreatores costuma relacionar o crescimento microbiano ou a produção do produto de interesse com o consumo do substrato limitante. A morte celular ocorre quando há falta de algum nutriente essencial no meio e pode ser influenciada pelas condições de operação do biorreator como as condições iniciais, vazão de alimentação (F) e taxa de diluição ($D=F/V$) (Baptista-Neto, 2004).

Em toda a literatura pesquisada, há poucos trabalhos de modelagem matemática envolvendo modelos estruturados aplicados à produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.

Tarback et al. (1985) propuseram um modelo não segregado e não estruturado para descrever a produção de AC por *S. clavuligerus*. Consideraram o modelo proposto por Monod, considerando que o consumo de substrato estava associado ao crescimento e à produção de antibiótico. Equações de primeira ordem foram usadas para descrever a degradação do produto e a morte celular. Para verificação do modelo proposto foram realizados vários experimentos sob diferentes condições de aeração, porém o ajuste ao modelo não foi bom em nenhuma das condições estudadas.

Sabendo das dificuldades no desenvolvimento de um modelo matemático que se aplica aos diversos processos bioquímicos, a utilização de simuladores ou pacotes computacionais é de grande valia, considerando o seu poder de análise e grande diversidade de unidades de processo disponíveis para simulação e otimização.

O AnaBio 2.0 (Silva *et al.*, 2005) é um programa de análise de biorreatores que permite que os dados de entrada fornecidos pelo usuário sejam associados às equações de projeto (balanços de massa) que descrevem os diferentes cultivos (batelada, batelada alimentada e contínuos sem e com reciclo celular) comandados por diferentes cinéticas de crescimento celular, sem e com inibição e por diferentes cinéticas de produção (produção associada, não associada e parcialmente associada ao crescimento celular). O programa propõe-se em resolver os sistemas de equações diferenciais ou algébricas relativas aos balanços de massa para o substrato, células e produto em processos em batelada, em batelada

alimentada ou contínua, permitindo a obtenção de curvas de concentrações em função do tempo para cultivos no regime transiente, em função da vazão específica de alimentação (D) ou do tempo de residência (θ) para cultivos no regime permanente, possibilitando também, a análise de pontos de operação para cultivos no regime permanente utilizando métodos numéricos.

Para os cultivos em batelada, batelada alimentada e contínuos é possível a inserção de pontos experimentais junto às curvas simuladas. Esta ferramenta permite ao usuário a verificação de valores de parâmetros cinéticos e de coeficientes de rendimento já ajustados em algum programa de otimização, ou mesmo o ajuste visual destes parâmetros na própria tela, variando seus valores e observando o ajuste, lembrando que o software não apresenta subrotina de otimização de parâmetros.

2.6. Considerações Finais

Estudos relacionados com a produção de ácido clavulânico utilizando *Streptomyces clavuligerus* vêm evoluindo com o passar dos anos, sempre com o intuito de maximizar a produtividade e desvendar totalmente a biossíntese da molécula. Diversos trabalhos da literatura abordaram diferentes condições de cultivo e de operação para a produção do AC, incluindo os trabalhos em batelada alimentada, que abordaram os mais diferentes meios de produção, meios de cultura suplementares, adição de precursores da molécula, velocidade de alimentação e taxa de diluição.

Entretanto uma abordagem sobre a influência da alimentação de glicerol e ornitina, apontados como precursores na biossíntese do AC, se torna importante. A contribuição do presente trabalho foi a de preencher lacunas existentes na literatura acerca do assunto. Inicialmente, procurou-se avaliar os consumos dos aminoácidos precursores do AC, ornitina e arginina, ao longo dos cultivos para a produção de AC. Num segundo momento, foram avaliadas as influências de diferentes condições de alimentação de ornitina e glicerol na produção de AC. Salienta-se que na literatura não se tem relatos de abordagens desta natureza. Por fim, nos cultivos em batelada alimentada as seguintes estratégias foram utilizadas: baixas vazões de alimentação e altos valores na concentração do substrato alimentado, na procura de minimizar os efeitos inibitórios do glicerol e de diluição do caldo de fermentação na busca de maiores concentrações finais de AC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos apresentados a seguir referem-se aos ensaios de produção de AC por *Streptomyces clavuligerus* em mesa incubadora rotativa (“*shaker*”) e em biorreator, bem como às análises das amostras para acompanhamento das variáveis de interesse na produção de AC.

3.1. Microrganismo

Linhagem *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, sob forma de suspensão de células vegetativas preservadas em criotubos (aprox. 5,0 g.L⁻¹ em massa seca), congeladas a -70°C em solução crioprotetora de glicerol 20% m/v.

3.2. Equipamentos

Autoclaves: autoclaves da marca FABBE, modelo 103, foram utilizadas para a esterilização dos materiais e dos meios de cultura utilizados nos experimentos.

Banho termostatizado: banho da marca Neslab modelo GP-200 foi utilizado na análise de AC.

Biorreatores: biorreatores da marca New Brunswick Scientific (NBS), modelos Bioflo II, III e 310 com capacidades de 5 e 10 L, foram empregados nos ensaios em batelada e batelada alimentada.



Figura 3.1: Biorreator Bioflo 310 com dorna de 5L, New Brunswick Scientific

Câmara Asséptica: câmara de fluxo laminar da marca VECO, contendo bico de Bunsen e lâmpada germicida UV, foi utilizada na manipulação do microrganismo e do material em contato direto com o mesmo.

Centrífuga: centrífuga refrigerada da marca Eppendorf, modelo 5403, com capacidade para seis tubos de 35 mL, foi utilizada na separação do microrganismo dos caldos fermentados.

Cromatógrafo: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi empregada nas análises de AC e glicerol, utilizando cromatógrafo da marca Waters. Para análise de glicerol foi utilizado sistema com duas bombas modelo 510, refratômetro W410, injetor Rheodyne 7125 com loop de 20 μ L. Para análise de AC foi utilizado sistema com duas

bombas modelo 515, detector PDA W996, injetor automático com controle de temperatura modelo W717.

Espectrofotômetro: espectrofotômetro da marca Pharmacia Biotech modelo Ultrospec 2100 pro foi utilizado na análise de AC.

Estufa: para secagem de material limpo (80 °C) e para análise de massa seca (100°C) foi utilizada estufa da marca Qualxtron.

Mesa incubadora rotativa (“shaker”): as etapas de reativação, preparo de inóculo e em alguns casos de produção do AC, foram realizadas em frascos agitados (Erlenmeyers) em mesa incubadora rotativa com controle de temperatura e frequência de rotação, da marca New Brunswick Scientific, modelo G-25.

Reômetro: foram utilizados nas medidas reológicas do caldo (K e n), reômetro de cilindros concêntricos da marca Brookfield Engineering Laboratories, Inc., modelo LV-DVIII+.

Ultra freezer: ultra freezer da marca Forma Scientific, modelo Bio-Freezer, foi utilizado para armazenagem do microrganismo bem como das amostras de AC e glicerol à temperatura de -70°C.

Demais equipamentos como balança analítica Mettler, modelo PB 3002, pHmetro Orion, modelo 420A, utensílios e vidrarias de uso comum no laboratório foram utilizados na preparação dos meios de cultivo e nas análises.

3.3. Meios de Cultura

3.3.1. Meio de cultura de reativação

O meio de cultura de reativação (MR) proposto por Rosa *et al.* (2005) teve a seguinte composição (g.L⁻¹ em água destilada): glicerol (15,0); extrato de levedura (1,0); peptona bacteriológica (10,0); extrato de malte (10,0); tampão MOPS (“3-[N-Morpholino]-propanesulfonic acid” → 3-N-ácido morfolino propanossulfônico) (21,0); MgSO₄.7H₂O (0,75); K₂HPO₄ (2,5). A solução de sais teve a seguinte composição (g.L⁻¹ em água destilada): MnCl₂.4H₂O (1,0), FeSO₄.H₂O (1,0), ZnSO₄.H₂O (1,0).

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

3.3.2. Meio de cultura de inóculo

O meio de cultura de inóculo (MI) proposto por Teodoro (2004) teve a seguinte composição (g.L^{-1} em água destilada): glicerol (15,0); extrato de levedura (1,0) ; tampão MOPS (3-N-ácido morfolino propanossulfônico) (21,0); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,75); K_2HPO_4 (0,8); isolado protéico de soja (IPS) contendo 15% m/m de nitrogênio total (20,0); óleo de soja (1,0). Nas condições de preparo do meio a PIS não é totalmente solúvel, com $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ de sólidos em suspensão.

A solução de sais teve a seguinte composição (g.L^{-1} em água destilada): $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (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 foi ajustado em 6,8 com NaOH e o meio de cultura autoclavado por 15 minutos a 120°C .

3.3.3. Meio de cultura de produção

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 $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de antiespumante (“*Dow Corning Medical Antifoam C Emulsion – 30% m/v Dimethicone Emulsion USP*”) para os cultivos em biorreator. O pH foi controlado em 6,8 com NaOH (2 mM) e HCl (1 mM).

3.3.4. Meio de cultura suplementar

Nos cultivos em batelada alimentada, dois meios de cultura suplementares foram testados. Um denominado meio completo, com a mesma composição do meio de produção, porém com concentrações distintas de glicerol, e um outro meio contendo apenas glicerol e água destilada, denominado meio simples. Para ambos foi testada a adição do aminoácido ornitina, também em diferentes concentrações. O item 3.7 apresenta como foram definidas as concentrações de ornitina.

As condições de vazão volumétrica de alimentação (F) e concentração de glicerol no meio de cultura suplementar (Cse) foram baseadas no trabalho de Teodoro (2004), que estudou a influência da vazão mássica de alimentação de glicerol, ou seja, o produto $F \cdot C_{se}$, na produção de AC.

3.4. Conservação e Preservação do Microrganismo

3.4.1 Procedimento básico para preservação do microrganismo em criotubos

Para se iniciar um projeto de pesquisa com um determinado microrganismo é necessário o conhecimento prévio para a conservação e preservação deste, a fim de se garantir um estoque de trabalho que mantenha válido os resultados obtidos experimentalmente durante toda a pesquisa. No caso de *Streptomyces clavuligerus*, sabe-se que a conservação é parte fundamental, pois garante um inóculo com células viáveis e que mantenham a capacidade produtora, sendo este estudo tema de uma dissertação de mestrado desenvolvida atualmente no Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar.

Uma das formas para se conservar o microrganismo é sua armazenagem de forma liofilizada. A linhagem utilizada neste trabalho foi liofilizada no IPT-SP a partir da linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, tanto na forma de células vegetativas (CV) quanto na forma de esporos (ES). Para a preparação do estoque de trabalho foram realizados os passos descritos a seguir:

- 1- Rompeu-se de forma asséptica um tubo de liofilizado contendo células vegetativas (CV) de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. Aproximadamente 2 mL de meio ISP-1 (triptona, 5,0 g.L⁻¹ e extrato de levedura, 3,0 g.L⁻¹) foram transferidos ao tubo com a finalidade de rehidratar o micélio. A suspensão de micélio foi transferida para um tubo de ensaio contendo 4 mL do mesmo meio do qual cerca de 2 mL foram transferidos para Erlenmeyers contendo 10 mL de meio, que permaneceram estáticos por 10 dias à 30°C.
- 2- Passados os 10 dias, transferiram-se os conteúdos de cada Erlenmeyer para Erlenmeyers de 500 mL contendo 40 mL do meio de cultura de Reading e Cole (1977) modificado. Os frascos foram então incubados em mesa rotativa a 250 rpm e 30°C por 24 horas. Composição do meio Reading e Cole (1977) modificado (em g.L⁻¹): glicerol (20); extrato de malte (10); peptona bacteriológica (20); MgSO₄.7H₂O (0,75); K₂HPO₄ (2,5); MOPS (21g - 100mM); solução de sais (1 mL); água destilada (q.s.p 1L); pH 7,0 ajustado com NaOH.
- 3- Após 24 horas, os conteúdos dos Erlenmeyers foram misturados e 5 mL da suspensão serviu de inóculo para 45 mL do mesmo meio contido em Erlenmeyers de 500 mL. Os Erlenmeyers foram incubados em mesa rotativa a 250 rpm e 30°C por 24 horas. A

suspensão foi diluída em glicerol de modo a conter 20% m/v deste na solução final. Esta nova suspensão de células vegetativas foi transferida para criotubos (3,5 mL) e estocadas em ultra freezer a -70°C . Os lotes de criotubos foram denominados “estoques de trabalho”.

3.4.2. Procedimento básico para preservação do microrganismo em “slants”

Uma outra forma para a preservação de microrganismo é repicagem, que nada mais é que a conservação em meio sólido. No caso foi realizada a repicagem em tubos de ensaio (“slants”) do microrganismo na forma de esporos. No caso o microrganismo preservado em criotubos foi repicado em condições assépticas para os “slants” onde foi mantido de 10-15 dias em estufa incubadora com temperatura controlada em 30°C . O meio utilizado nos “slants” foi o de Sanches e Branã (1996) modificado (em g.L^{-1}): glicose (5); extrato de carne (0,5); extrato de levedura (0,5); caseína ácida (1,0); ágar (20); MOPS (21g - 100mM); água destilada (1L); pH 6,8 ajustado com NaOH.

Esses “slants” foram transferidos por meio de raspagem dos esporos com auxílio de solução salina NaCl 0,9% p/v e alça de platina, ora para Erlenmeyers de 1 L contendo 200 mL de meio sólido, mantido a 30°C por 10 dias, ora diretamente para o meio líquido de reativação. Em ambos os casos o microrganismo poder ser novamente preservado na forma de criotubos com adição da solução 20% p/v de glicerol.

3.5. Métodos Analíticos

3.5.1. Determinação da concentração celular (C_x)

A presença de sólidos insolúveis no caldo devido à composição dos meios de cultura torna o método tradicional da “massa seca” para determinação da concentração celular (C_x), 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 ($Y_{x/s}$) na fase batelada, até 24 horas de cultivo, utilizando-se $Y_{x/s}$ igual a

0,574 g_x/g_s (Baptista-Neto *et al.*, 2000) obtido com meio totalmente solúvel. Após esse tempo de cultivo, o método tradicional de massa seca foi utilizado depois de centrifugação a 10000 rpm por 20 min e secagem a 85°C por 12 h.

3.5.2. Caracterização reológica do caldo

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 (Baptista-Neto, 2000), o modelo da “Lei de Potência” foi utilizado para descrever a dependência da tensão de cisalhamento (τ) 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 que os parâmetros reológicos variam ao longo do cultivo e estão relacionados com o crescimento celular (Badino *et al.*, 1999; Neves *et al.*, 2000).

3.5.3. Determinação da concentração de glicerol (Cs)

O glicerol foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna Shodex KS 802 (Lompak-Waters) e como eluente (fase móvel) água Milli-Q. O equipamento foi operado a 80°C, 1,0 mL.min⁻¹ 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 a partir de uma solução de glicerol 0,5 g.L⁻¹ diluídas a 25, 50, e 75% (v/v).

3.5.4. Determinação da concentração de ácido clavulânico (Cp)

3.5.4.1. Método CLAE

A concentração de ácido clavulânico foi avaliada por CLAE segundo método proposto por Foulstone e Reading (1982) utilizando coluna C-18 μ -Bondapak e como eluente uma solução de 100 mM de KH_2PO_4 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⁻¹, 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[®] (Glaxo-SmithKline Farmacêutica, Rio de Janeiro, Brasil), 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 congeladas em ultrafreezer a -70°C. No momento da análise as amostras foram descongeladas, diluídas em tampão acetato (pH=4,5) e novamente centrifugadas por 5 minutos visando à retirada dos sólidos em suspensão. De cada amostra foi retirada uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante que foi adicionado a 0,5 mL de uma solução de imidazol (8,25g em 20mL, pH=6,8 e o volume completado para 50 mL com água destilada), filtrou-se esta nova solução e colocou-se num banho a 30°C por 15 minutos para que ocorresse a reação de derivatização.

3.5.4.2. Método espectrofotométrico

O método proposto por Bird *et al.* (1982) é o mais utilizado para determinação do AC. Ortiz (2005) em sua dissertação de mestrado comprovou a validade desse método frente ao método CLAE, com erros menores que 5% na concentração do AC. O método consiste na leitura da absorbância em espectrofotômetro do produto da derivatização do AC com o reagente imidazol.

Assim como no método CLAE, as amostras após sua retirada foram centrifugadas a 5°C e 10000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante congelado em ultrafreezer a -70°C. Para a análise de AC, as amostras foram descongeladas. De cada amostra foi retirada 2,0 mL, sendo a uma alíquota de 1,0 mL adicionada 5,0 mL de uma solução de imidazol (6,0g em 20 mL, pH=6,8 ajustado com HCl e o volume completado para 100 mL com água destilada), denominada solução A, e uma alíquota de 1,0 mL à qual foram adicionados 5,0 mL

de água destilada, denominada solução B. O padrão de leitura para a solução A contém 1,0 mL de água destilada, adicionada a 5,0 mL da solução de imidazol e o padrão da solução B é água destilada pura. As amostras em solução foram colocadas num banho a 30°C por 15 minutos, para que ocorresse a reação de derivatização.

As leituras das absorvâncias no espectrofotômetro foram realizadas a 311 nm e o valor da diferença das absorvâncias das soluções A e B foram relacionados com a concentração de AC por uma curva de calibração. Desta forma, a concentração de AC das amostras pôde ser calculada.

3.5.5. Análise de aminoácidos

Os aminoácidos ornitina e arginina foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) baseado no método proposto Henrikson e Meredith (1984), utilizando-se uma coluna Pico-tag (Waters), e sendo o eluente uma mistura de duas fases A e B. A fase A é composta de acetato de sódio tri-hidratado, trietilamina, água mili-Q e acetonitrila. A fase B é composta apenas de água e acetonitrila. Foram utilizadas as seguintes condições de operação: temperatura de 38°C, comprimento de onda de 254 nm, tempo de retenção 20 minutos e gradiente de vazão pré-determinado.

As amostras passaram por etapas de secagem, rehidratação, derivatização com fenilisotiocianato (PITC) até sua diluição em tampão antes de sua injeção no cromatógrafo, de acordo como o método proposto pela Waters. As concentrações de ornitina e arginina foram determinadas a partir de uma curva de calibração obtida com a injeção de amostras com concentrações de 0,1; 0,3 e 0,5 g.L⁻¹, provenientes de amostras de L-ornitina e L-arginina gentilmente cedidas pela Ajinomoto Interamericana Ltda (Brasil).

3.6. Metodologia experimental

Os cultivos em batelada e em batelada alimentada foram realizados nos biorreatores Bioflo II, III e 310 (New Brunswick Sci. Co. Inc., USA) com dornas de volume total de 5 e 10 L. Todos os cultivos foram operados a 28°C, 800 rpm, 0,5 vvm e pH controlado automaticamente em $6,8 \pm 0,1$ pela adição de solução 1 M HCl e/ou 2 M NaOH.

As suspensões de células na forma de criotubos (3,5 mL), com concentração de aproximadamente 5 g.L^{-1} em massa seca, foram inoculados em 45 mL de meio de reativação em frascos Erlenmeyer de 500 mL e incubadas em mesa rotativa a 28°C e 250 rpm por 24 horas. Na seqüência, frascos Erlenmeyers (500 mL) com 45 mL do meio de cultura de inóculo foram inoculados com 5 mL do meio reativado e incubado em mesa rotativa a 28°C , 250 rpm por 24 horas. O conteúdo equivalente a 10% do volume total foi então inoculado no reator. No caso dos reatores de 5 L com 4 L de capacidade útil, foram utilizados oito frascos (400 mL) ou 7 frascos (350 mL) que foram transferidos para o fermentador, resultando num com volume inicial de 4,0 ou 3,4 L para os cultivos em batelada ou batelada alimentada, respectivamente, considerando um biorreator de 5 L. Para um biorreator de 10 L o volume inicial foi de 7,8 L.

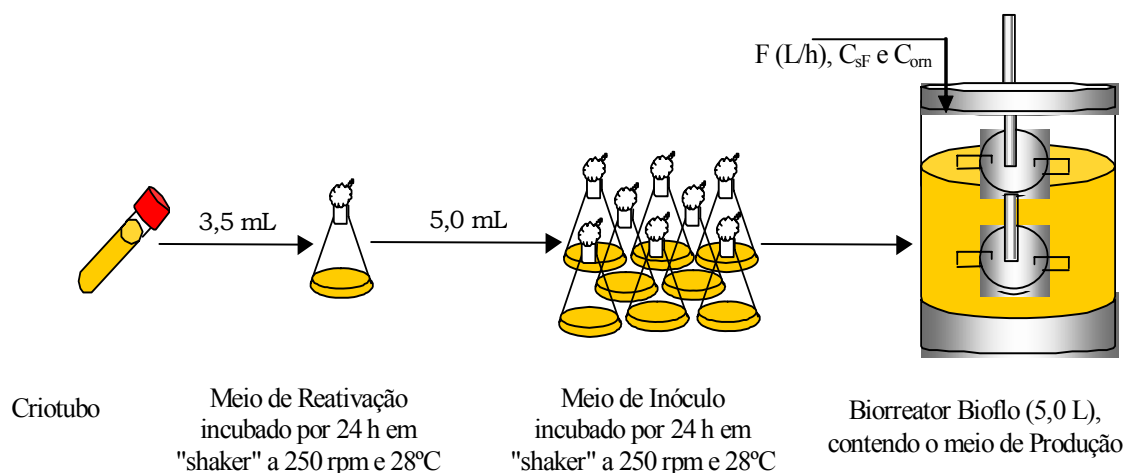


Figura 3.2: Metodologia experimental utilizada nos cultivos em batelada e batelada alimentada

Nos cultivos em batelada alimentada, a alimentação teve início após 24 horas de inoculação, com uma vazão de alimentação fixa durante todo o cultivo. Com isso a taxa de diluição ($D=F/V$) variou entre $0,0025$ e $0,0028 \text{ h}^{-1}$, valor este considerado baixo, principalmente quando comparado com outros trabalhos da literatura (Teodoro *et al.*, 2006a; Bushell *et al.*, 2006).

Amostras de 20 mL foram retiradas a cada 6 horas, sendo 10 mL para as medidas de reologia e 10 mL centrifugados a 10000 rpm e 5°C por 20 min, e o sobrenadante congelado em ultrafreezer a -70°C . Os cultivos em batelada alimentada foram finalizados

com aproximadamente 120 horas de experimento, tempo este onde o volume de trabalho do biorreator (4 L ou 8L) fosse completado.

3.7. Ensaio em Biorreator

3.7.1 Estudo da influência da ornitina na produção de AC em cultivos em batelada e em batelada alimentada

3.7.1.1. Cultivos em batelada

Inicialmente, foram realizados cultivos em batelada em biorreator convencional de bancada de 5 L de capacidade total, modelos Bioflo II e III. Os cultivos foram realizados a 800 rpm, 0,5 vvm, pH 6,8 e temperatura de 28°C.

O primeiro cultivo, denominado padrão (B1), foi realizado utilizando o meio de cultura descrito no item 3.3 sem a adição de ornitina. A faixa de concentração de ornitina utilizada no meio de produção para os cultivos em batelada foi baseada em trabalhos recentes que investigaram a influência da ornitina na produção de AC em mesa incubadora rotativa (Chen *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). Os cultivos subsequentes foram realizados com diferentes concentrações de ornitina: B2 ($C_{orn}=0,66 \text{ g.L}^{-1}$), B3 ($C_{orn}=0,99 \text{ g.L}^{-1}$) e B4 ($C_{orn}=1,32 \text{ g.L}^{-1}$).

Novos cultivos em batelada sem adição de ornitina foram realizados para servir de padrão aos cultivos em batelada alimentada nos biorreatores de 5 e 10 L, cultivos B5 e B6, respectivamente.

3.7.1.2. Cultivos em batelada alimentada

No trabalho de Chen *et al.* (2003) para cultivos em batelada alimentada, os melhores resultados foram obtidos quando o meio de cultura suplementar continha ornitina e glicerol na proporção molar de 1:21,7. Essa condição foi considerada intermediária. Assim para avaliar a influência da alimentação de ornitina nos cultivos em batelada alimentada, as

seguintes proporções molares de ornitina e glicerol foram utilizados ampliando a faixa de trabalho, 1:20, 1:13 e 1:40, sendo respectivos aos cultivos BA2, BA3 e BA4.

A concentração de glicerol no meio de cultura suplementar (C_{s_e}) de 120 g.L^{-1} e a vazão volumétrica (F) de 0.01 L.h^{-1} foram propostas por Teodoro *et al.* (2006a). Optou-se por iniciar o cultivo com um volume de cultura de 3,6 L, de modo que ao final da fermentação o volume total no biorreator fosse de 4 L, o que seria em aproximadamente 120 horas após o início. Foram realizados nessa etapa quatro cultivos em batelada alimentada, com meio de cultura suplementar completo, isto é com composição similar ao do meio de produção, porém com diferentes concentrações de ornitina e mantendo a concentração de glicerol suplementar em 120 g.L^{-1} . São eles: BA1 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1} - \text{Corn}_e=0,0 \text{ g.L}^{-1}$), BA2 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1} - \text{Corn}_e=7,4 \text{ g.L}^{-1}$), BA3 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1} - \text{Corn}_e=11,1 \text{ g.L}^{-1}$) e BA4 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1} - \text{Corn}_e=3,7 \text{ g.L}^{-1}$).

3.7.2. Modelagem cinética da produção de AC em cultivos em batelada e em batelada alimentada

A modelagem cinética do processo de produção de AC foi avaliada em cultivos em batelada e em batelada alimentada. No modelo não estruturado e não segregado proposto e ajustado aos valores experimentais, o crescimento celular foi previsto pelo modelo de Monod considerando morte celular (k_d), a produção foi considerada como não associada ao crescimento celular e considerou-se degradação de produto (k_{dp}).

O modelo foi ajustado aos valores experimentais de C_x , C_s e C_p com o tempo, obtidos no cultivo em batelada utilizando algoritmo de Marquardt, juntamente com algoritmo DDASSL (Petzold, 1989), para resolução numérica do sistema de equações diferenciais. O conjunto de Equações 3.1 a 3.3 a seguir descreve o modelo proposto:

$$\frac{dC_x}{dt} = \left(\mu_{\max} \frac{C_s}{K_s + C_s} - f(C_{s_1}) \cdot k_d \right) \cdot C_x \quad (3.1)$$

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

$$\frac{dC_p}{dt} = f(C_{S_2}) \cdot \beta \cdot C_x - k_{dp} \cdot C_p \quad (3.3)$$

Onde: $f(C_{S_1})$ representa uma função degrau (0-1) que depende da concentração de glicerol (C_{S_1}) na qual se inicia a morte celular e $f(C_{S_2})$ representa uma função degrau que depende de uma concentração crítica de glicerol (C_{S_2}) na qual inicia-se a biossíntese de AC. Tem-se que $f(C_{S_2})$ é inicialmente igual a zero durante o período de repressão catabólica. Quando $C_S \leq C_{S_2}$, $f(C_{S_2})$ assume valor igual a 1.

Os valores dos parâmetros cinéticos estimados relacionados com o crescimento celular foram obtidos por Baptista-Neto *et al.* (2000) para um cultivo em batelada utilizando meio sintético solúvel, quais sejam, velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{max}=0,207 \text{ h}^{-1}$), constante de saturação ($K_s=6,0 \text{ g.L}^{-1}$), velocidade específica de produção de AC ($\beta=3,0 \text{ mg}_p \cdot \text{g}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), constante de degradação do produto ($k_{dp}=0,02 \text{ h}^{-1}$), concentração crítica de glicerol quando inicia a morte celular ($C_{S_1}=0,5 \text{ g.L}^{-1}$), concentração crítica de glicerol quando se inicia a produção de ácido ($C_{S_2}=9,4 \text{ g.L}^{-1}$), constante de morte celular ($k_d=0,030 \text{ h}^{-1}$) e coeficiente de rendimento de substrato a células ($Y_{X/S}=0,574 \text{ g}_x \cdot \text{g}_s^{-1}$).

Os demais parâmetros foram estimados ajustando-se o modelo proposto aos resultados experimentais dos cultivos em batelada (B1) e em batelada alimentada utilizando o como ferramenta de ajuste visual fornecido pelo software AnaBio 2.0 (Silva *et al.*, 2005). Os cultivos utilizados foram: FB1 ($F=0,08 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{S_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$), FB2 ($F=0,08 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{S_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$), FB3 ($F=0,04 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{S_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$), FB4 ($F=0,02 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{S_e}=60 \text{ g.L}^{-1}$) e BA1 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{S_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$), sendo os ensaios FB1, FB2, FB3 e FB4 fazem parte da dissertação de mestrado de Teodoro (2004) e foram utilizados nesse trabalho como ponto de partida para definição das condições experimentais desta tese de doutorado. O ajuste foi realizado também para os cultivos em batelada alimentada com $C_{S_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$ e $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$, porém com adição de ornitina ao meio de cultura suplementar: BA1 ($\text{Corn}_e=0,0 \text{ g.L}^{-1}$), BA2 ($\text{Corn}_e=7,4 \text{ g.L}^{-1}$), BA3 ($\text{Corn}_e=11,1 \text{ g.L}^{-1}$) e BA4 ($\text{Corn}_e=3,7 \text{ g.L}^{-1}$), para avaliação da influência desse aminoácido na produção de AC.

Nos cultivos em batelada alimentada a Equação 3.4 foi utilizada para prever a concentração de AC ao longo dos cultivos, onde $F = dV/dt$.

$$\frac{dC_p}{dt} = f(C_{S_2}) \cdot \beta \cdot C_x - \left(\frac{F}{V} + k_{dp}\right) \cdot C_p \quad (3.4)$$

3.7.3. Estudo da influência da composição do meio suplementar na produção de AC em batelada alimentada

Definida qual a concentração de ornitina que seria utilizada nos cultivos em batelada alimentada ($C_{orn_e}=3,7 \text{ g.L}^{-1}$), foram realizados 2 cultivos nas mesmas condições de vazão de alimentação, $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$ e concentração de glicerol $C_{s_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$, porém com diferentes composições do meio de cultura suplementar. O cultivo BA4b, réplica do cultivo BA4a, foi suplementado com meio de cultura denominado completo e o cultivo BA5 foi suplementado com meio denominado simples, composto somente de glicerol, ornitina e água destilada. O intuito desses experimentos foi avaliar a influência da composição do meio suplementar, principalmente da fonte de nitrogênio adicionada ao longo do cultivo, na biossíntese de AC.

3.7.4. Avaliação da produção de AC em batelada alimentada em diferentes condições de alimentação

A influência da alimentação de glicerol foi investigada em quatro cultivos em batelada alimentada realizados com $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$ e $C_{orn_e}=3,7 \text{ g.L}^{-1}$, porém com concentrações distintas de glicerol no meio de cultura suplementar (C_{s_e}), quais sejam; BA5 ($C_{s_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$), BA6 ($C_{s_e}=150 \text{ g.L}^{-1}$), BA7 ($C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$) e BA8 ($C_{s_e}=240 \text{ g.L}^{-1}$). Todos os cultivos foram alimentados com meio de cultura simples, contendo apenas glicerol, ornitina e água destilada em sua composição. Cabe ressaltar que o cultivo BA5 foi o mesmo do item 3.7.3.

Para se avaliar a influência da vazão volumétrica de alimentação do meio suplementar (F) em cultivos com altas concentrações de glicerol no meio suplementar, foram realizados dois cultivos com as mesmas concentrações de glicerol e ornitina no meio de cultura suplementar ($C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$ e $C_{orn_e}=3,7 \text{ g.L}^{-1}$), porém com diferentes vazões volumétricas de alimentação, quais sejam, BA7 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$) e BA9 ($F=0,005 \text{ L.h}^{-1}$), ressaltando que o cultivo BA7 foi o realizado anteriormente.

3.7.5. Variação de escala do biorreator - avaliação da produção de AC em batelada alimentada em biorreatores convencionais de 5 e 10 L

Após os vários estudos com finalidade de aumentar a produção de AC, foram realizados dois cultivos em biorreator convencional de 10 L, com o intuito de se comprovar os resultados obtidos em maior escala de trabalho, nos oferecendo assim uma experiência no “*scale-up*” do processo e conhecimento das dificuldades que seriam encontradas na aplicação da metodologia desenvolvida no processo em escalas superiores.

Os cultivos foram realizados em biorreatores convencionais de bancada, modelos Bioflo III e 310. As condições de operação utilizadas nos cultivos foram baseadas nos resultados dos itens anteriores para biorreator de 5 L. Os dois experimentos foram realizados com a mesma concentração de glicerol no meio suplementar ($C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$) e a mesma vazão de alimentação ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$), porém com diferentes concentrações de ornitina: BA10 ($C_{o_n_e}=3,7 \text{ g.L}^{-1}$) e BA11 ($C_{o_n_e}=5,55 \text{ g.L}^{-1}$). Apesar da diferença na concentração de ornitina desses cultivos a relação mássica entre a ornitina e o glicerol no meio suplementar, utilizada no início deste trabalho, foi mantida ($120/3,7 = 180/5,55$).

A Tabela 3.1 apresenta uma síntese dos experimentos realizados no presente trabalho.

Tabela 3.1: Ensaios realizados no presente trabalho para cultivos em Batelada e Batelada Alimentada (B: batelada, BA: batelada alimentada)

Cultivo	Meio suplementar	Escala (L)	F (L.h⁻¹)	Cs_e (g.L⁻¹)	Corn_e (g.L⁻¹)
B1	-	5	-	-	-
B2	-	5	-	-	0,66
B3	-	5	-	-	0,99
B4	-	5	-	-	1,32
B5	-	5	-	-	-
B6	-	5	-	-	-
BA1	completo	5	0,01	120	-
BA2	completo	5	0,01	120	7,4
BA3	completo	5	0,01	120	11,1
BA4a	completo	5	0,01	120	3,7
BA4b (réplica)	completo	5	0,01	120	3,7
BA5	simples	5	0,01	120	3,7
BA6	simples	5	0,01	150	3,7
BA7	simples	5	0,01	180	3,7
BA8	simples	5	0,01	240	3,7
BA9	simples	5	0,005	180	3,7
BA10	simples	10	0,01	180	3,7
BA11	simples	10	0,01	180	5,55

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo da influência da ornitina na produção de AC em cultivos em batelada e em batelada alimentada

4.1.1. Cultivos em batelada

Nas pesquisas em que se utiliza *Streptomyces clavuligerus*, na produção de bioprodutos, os cultivos em batelada são amplamente empregados. São caracterizados pelo crescimento do microrganismo sem a suplementação adicional de substrato após a inoculação, e por este motivo são utilizados como padrão (ou controle) para as demais formas de cultivo. No presente trabalho o cultivo padrão (B1), operado a 800 rpm, 0,5 vvm e 28°C, serviu de comparação aos cultivos em batelada com adição de ornitina e os resultados estão ilustrados no gráfico da Figura 4.1.

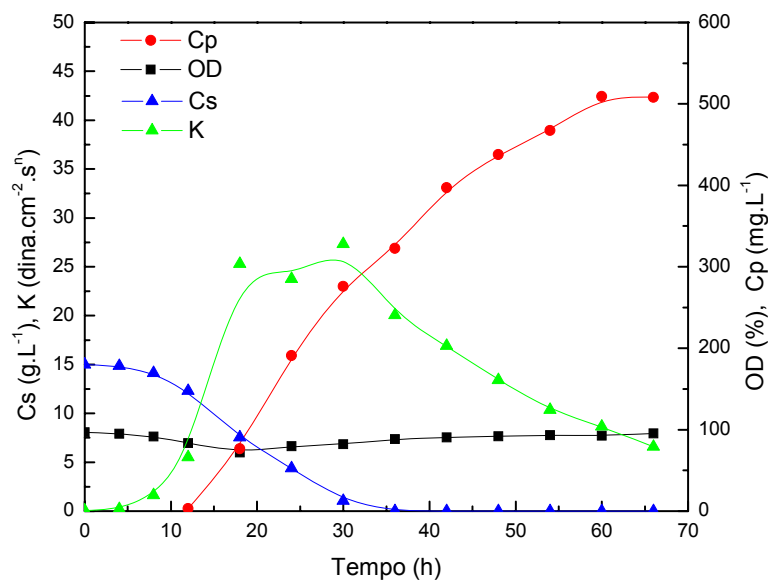


Figura 4.1: Perfis de concentração relativos ao “cultivo padrão” (B1) em batelada para a produção de AC, sem adição de ornitina.

Os resultados mostram que as características de cultivos com *Streptomyces clavuligerus*, como o início da produção de AC concomitante ao consumo de glicerol, foram mantidas (Lebrini *et al.* 1987; Mayer e Deckwer, 1996). Pode-se observar o decréscimo da concentração do substrato glicerol (Cs) com o tempo, chegando a zero em 36 horas. O índice de consistência (K) apresentou um alto crescimento no início do cultivo, mas após a exaustão do glicerol o mesmo decresceu, mostrando que o glicerol tem papel importante na saúde estrutural do micélio. O oxigênio dissolvido (OD) manteve-se num patamar constante durante quase todo o cultivo, apresentando uma pequena queda quando houve aumento exponencial de K, indicando crescimento acelerado do microrganismo. A produção de AC (Cp) alcançou um valor máximo em torno de 0,50 g.L⁻¹, o que é considerado um bom resultado para cultivos em batelada com o meio de cultura utilizado. Esse excelente resultado mostra que neste lote de criotubos preparado em 24/11/2004, o microrganismo está bem adaptado, com grande viabilidade celular e produtividade em AC.

Com base nos trabalhos de Chen *et al.* (2003), Wang *et al.* (2005) e Bushell *et al.* (2006), três cultivos em batelada com adição de ornitina foram realizados: B2 (C_{orn}=0,66 g.L⁻¹), B3 (C_{orn}=0,99 g.L⁻¹) e B4 (C_{orn}=1,32 g.L⁻¹).

A Figura 4.2 mostra os resultados do cultivo B2 (C_{orn}=0,66 g.L⁻¹). Nota-se que o consumo de glicerol (Cs) foi ligeiramente mais rápido; o índice de consistência (K) cresceu exponencialmente nas 20 horas iniciais do cultivo, atingindo altos valores, a concentração de AC foi superior ao do cultivo padrão sem ornitina, cerca de 0,59 g.L⁻¹, comprovando os resultados observados nos trabalhos publicados na literatura e citados anteriormente. As concentrações de ornitina adicionadas ao meio e de arginina presente na proteína isolada de soja foram analisadas com intuito de se conhecer melhor o mecanismo de produção e principalmente o papel desses aminoácidos na biossíntese de AC. Observa-se que a ornitina foi totalmente consumida ainda na etapa de crescimento e que a arginina acumulou na fase inicial, devido à hidrólise da proteína de soja ou dos peptídeos presentes nesta, sendo consumida após a exaustão da ornitina livre no caldo, promovendo um aumento na biossíntese de AC.

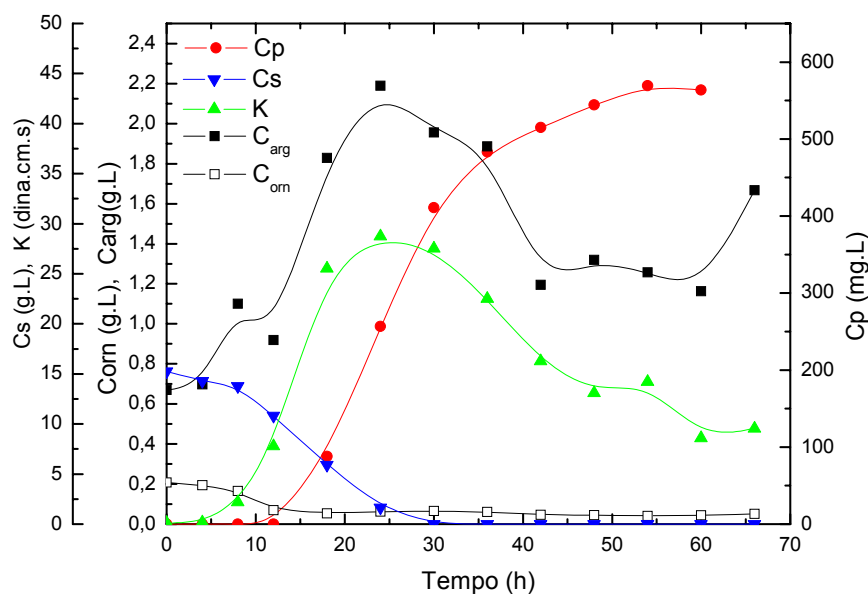


Figura 4.2: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada com ornitina B2 ($C_{om}=0,66 \text{ g.L}^{-1}$).

A Figura 4.3 ilustra os resultados do cultivo B3 realizado com $C_{om}=0,99 \text{ g.L}^{-1}$. Neste cultivo pode-se observar que o consumo de glicerol (C_s) foi similar ao dos cultivos anteriores, porém o índice de consistência (K) alcançou valores menores, próximos aos do cultivo padrão. A concentração máxima de AC atingida foi um pouco inferior que a do cultivo padrão, ficando em torno de $0,45 \text{ g.L}^{-1}$.

As concentrações de arginina e ornitina apresentaram perfis similares aos observados no cultivo B2 ($C_{om}=0,66 \text{ g.L}^{-1}$), podendo-se notar que o acúmulo de arginina foi menor, mantendo-se praticamente constante por quase todo o cultivo.

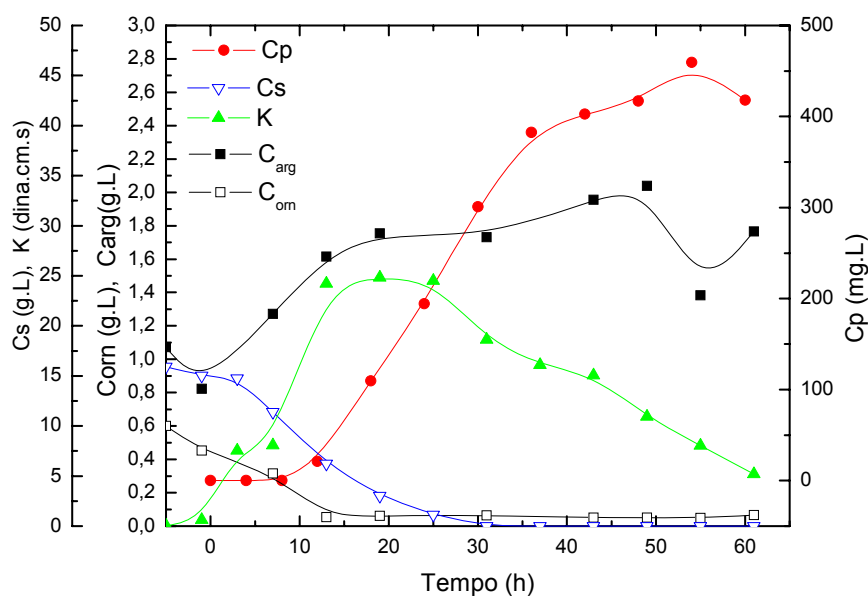


Figura 4.3: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada com ornitina B3 ($C_{om}=0,99 \text{ g.L}^{-1}$).

Na Figura 4.4 estão apresentados os resultados obtidos no cultivo B4 realizado com $C_{om}=1,32 \text{ g.L}^{-1}$. Pode-se observar que a concentração de glicerol (C_s) apresentou perfil similar ao do cultivo padrão e que o índice de consistência (K) manteve o mesmo perfil dos cultivos anteriores, com valor máximo obtido quando a concentração de glicerol atingiu o valor zero. A concentração máxima de AC foi próxima a obtida no cultivo padrão, em torno de $0,49 \text{ g.L}^{-1}$. A concentração de ornitina decresceu, alcançando valores próximos de zero ainda na fase de crescimento e a concentração de arginina aumentou no início até um patamar onde permaneceu até o final do cultivo.

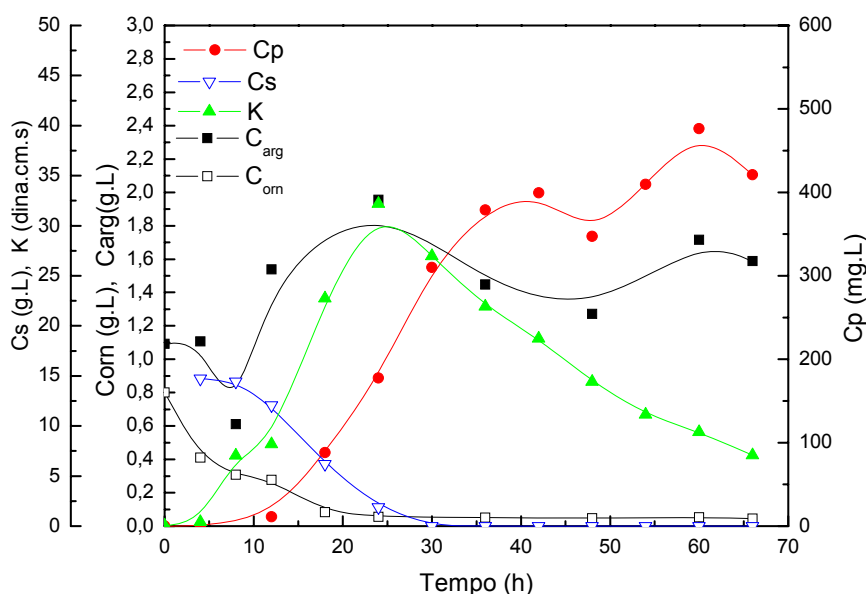


Figura 4.4: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada com ornitina B4 ($C_{orn}=1,32 \text{ g.L}^{-1}$).

Pode-se notar em todos os cultivos em batelada que o consumo de glicerol (Cs) e o índice de consistência (K) apresentaram perfis muito similares em todos os cultivos, o que indica que a presença da ornitina não afetou o crescimento celular e nem o consumo da fonte de carbono, mostrando também que o microrganismo não metabolizou esse aminoácido como fonte de carbono.

A Figura 4.5 ilustra a comparação dos cultivos operados em batelada B2 ($C_{orn}=0,66 \text{ g.L}^{-1}$), B3 ($C_{orn}=0,99 \text{ g.L}^{-1}$) e B4 ($C_{orn}=1,32 \text{ g.L}^{-1}$) quanto às concentrações de ornitina e AC (Fig. 4.5a) e quanto às concentrações de ornitina e arginina (Fig. 4.5b). As concentrações de ornitina são referentes às quantidades adicionadas aos cultivos e mostram o consumo deste aminoácido ao longo da fermentação. Já as concentrações de arginina são referente à quantidade deste aminoácido livre presente no caldo oriundo ou da proteína isolada de soja ou da hidrólise desta fonte de nitrogênio por proteases produzidas pelo microrganismo.

Nota-se que o consumo da ornitina, um aminoácido não protéico, adiantou a biossíntese do ácido clavulânico modificando a cinética de formação do produto. Toda a ornitina adicionada foi consumida pelo microrganismo simultaneamente com o glicerol, sendo convertida em arginina, um aminoácido protéico, para síntese de AC. A arginina acumulou no

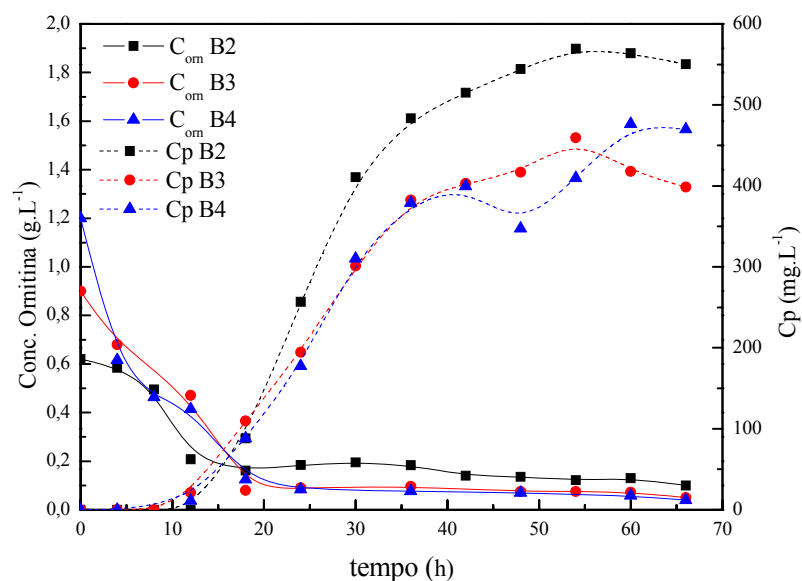
caldo devido à conversão de ornitina em arginina e também pela possível hidrólise do isolado protéico de soja (IPS) que contém aproximadamente 8% de arginina.

Após a exaustão da ornitina, observa-se uma mudança de comportamento no perfil de concentração de arginina, com o microrganismo utilizando esse aminoácido para a síntese de AC. Na idiofase, a variação na concentração de arginina é função da hidrólise da proteína isolada de soja e por ser este aminoácido um precursor do AC. No final dos cultivos ocorre a hidrólise das proteínas da soja pelas proteases liberadas no meio. Observa-se nessa etapa do cultivo uma diminuição na velocidade de produção de AC.

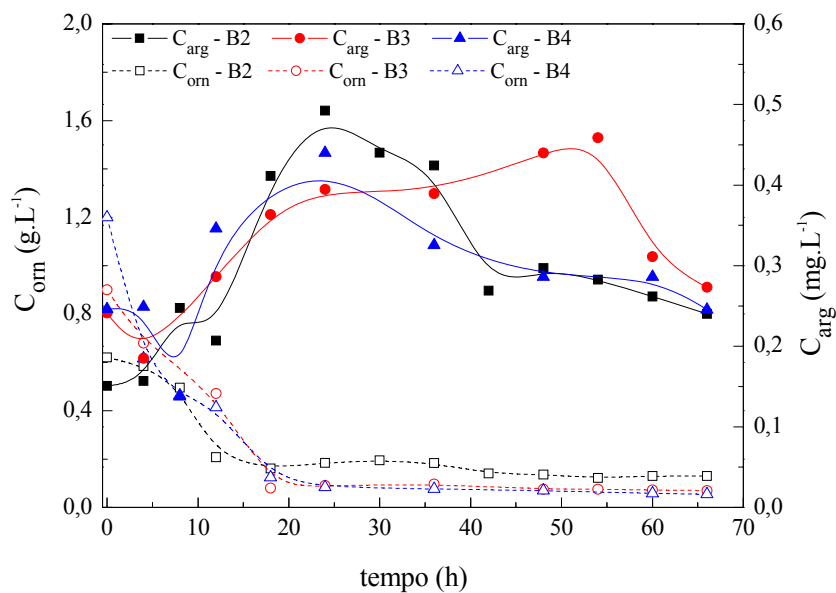
Chen *et al.* (2003) reportam que a ornitina tem sido considerado um precursor do AC. Os autores observaram que adicionando arginina inicial ou intermitentemente, não houve aumento na produção de AC mesmo em cultivos com presença de glicerol no meio. Ainda, a presença de arginina no caldo não melhorou a produção de AC. Em contraste, a adição de ornitina, tanto no início quanto intermitentemente, revelou um aumento substancial em AC.

No esquema da rota de biossíntese do AC representada na Figura 2.5, observa-se que a arginina é o último intermediário da molécula de AC. Quando a ornitina é adicionada, a presença não usual do ciclo da uréia em procariontes, mas existente nos *Streptomyces* providencia a suplementação de arginina, precursor da fração de cinco carbonos (C₅) da molécula de AC (Valentine *et al.*, 1993). A uréia excedente é decomposta em CO₂ e NH₄⁺, tóxicos ao microrganismo, ou é preferencialmente convertida a ornitina pelo “ciclo da uréia” e, para ser convertida novamente a arginina, acaba por aumentar o fluxo anaplerótico para a síntese do aminoácido responsável pela fração de cinco carbonos (C₅), reduzindo o fluxo para a síntese do precursor da fração de três carbonos (C₃).

Nota-se que a concentração de ornitina quantificada em todos os cultivos foi menor que a adicionada inicialmente. Esta diferença se deu porque o aminoácido detectado foi o livre e após a adição deste no meio de cultura, reações químicas ocorrem transformando o aminoácido livre em outros compostos bioativos. Parte desta diminuição na concentração do aminoácido se deve à degradação térmica que ocorre na autoclavagem do meio de cultura, e parte é causada pela adsorção deste ao isolado protéico de soja, que por conter muitos sólidos insolúveis acaba por mascarar a quantidade de aminoácido livre.



(a)



(b)

Figura 4.5: Perfis de concentração relativos aos cultivos B2 ($C_{om} = 0,66 \text{ g.L}^{-1}$), B3 ($C_{om} = 0,99 \text{ g.L}^{-1}$) e B4 ($C_{om} = 1,32 \text{ g.L}^{-1}$): (a) concentrações de ornitina e AC; (b) concentrações de ornitina e arginina.

A Figura 4.6 ilustra os perfis de concentração de AC (C_p) e de produtividade volumétrica em AC (P_p) ao longo dos cultivos em batelada. A produção máxima de AC varia na estreita faixa de 0,46 a 0,56 g.L^{-1} , com desvio em torno de 17%, tal como observado na indústria (Menezes, J. C., Comunicação pessoal), que não comprova a influência positiva da adição de ornitina na produção de AC. Porém, os perfis de produtividade volumétrica ($P_p=C_p/t$) mostram o efeito significativo deste aminoácido. Em todos os cultivos com adição de ornitina a P_p é muito maior que no cultivo padrão sem ornitina (B1). O valor máximo da produtividade volumétrica foi o encontrado no cultivo B2, com uma concentração de ornitina de 0,66 g.L^{-1} ($P_p=13,7 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), cerca de 40% superior a P_p obtida no cultivo padrão.

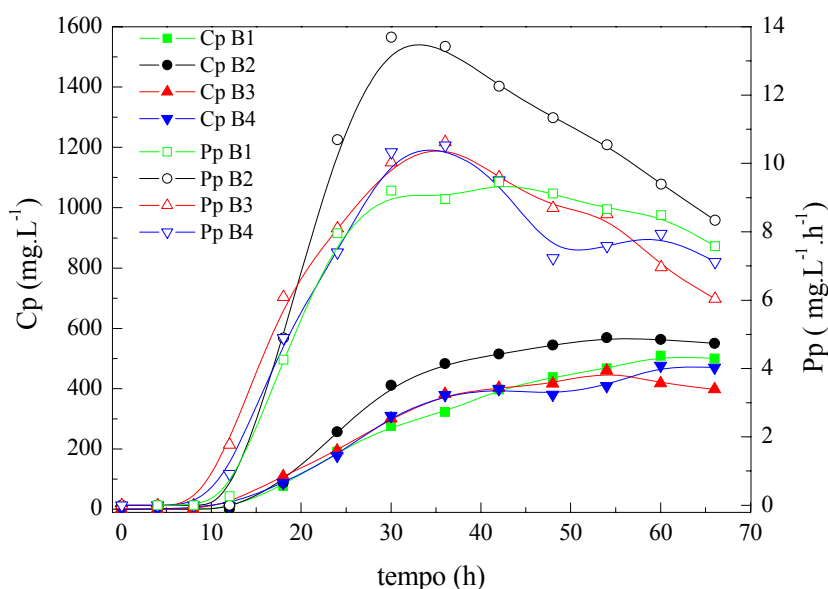


Figura 4.6: Perfis de concentração de AC (C_p) e de produtividade volumétrica (P_p) relativas aos cultivos com diferentes concentrações de ornitina: B1 ($C_{orn}=0,00 \text{ g.L}^{-1}$), B2 ($C_{orn}=0,66 \text{ g.L}^{-1}$), B3 ($C_{orn}=0,99 \text{ g.L}^{-1}$), e B4 ($C_{orn}=1,32 \text{ g.L}^{-1}$).

Pode-se observar que a maior produção ocorre quando há exaustão de glicerol no meio de produção. Esses resultados são diferentes dos obtidos por Chen *et al.* (2003), em cultivos em batelada em mesa incubadora rotativa com meio de cultura solúvel contendo glicerol, peptona e farinha de soja ou extrato solúvel de farinha de soja. Esses autores observaram que a produção de AC foi aproximadamente duas vezes superior a obtida no cultivo sem adição de ornitina (200 contra 115 mg.L^{-1}). Provavelmente a diferença na

produção de AC encontrada no presente trabalho, em relação à obtida por Chen *et al.* (2003), foi devido ao fato dos cultivos serem realizados em diferentes condições de transferência de massa, já que os experimentos no presente trabalho foram realizados em biorreator, não ocorrendo limitação por falta de oxigênio durante o processo.

4.1.2. Cultivos em batelada alimentada

Na continuidade do trabalho, um novo lote de criotubos foi confeccionado e com isso um novo cultivo padrão em batelada (B5) foi realizado. A Figura 4.7 mostra os resultados do cultivo B5, novo cultivo padrão, para os cultivos subsequentes.

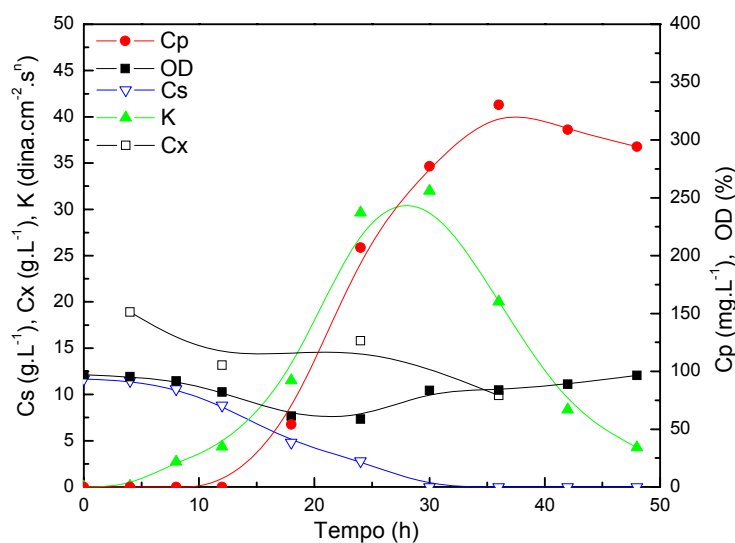


Figura 4.7: Perfis de concentração relativos ao cultivo padrão (B5) em batelada para a produção de AC, sem adição de ornitina.

Observou-se que a concentração do substrato glicerol decresceu com o tempo, esgotando-se em 30 horas de cultivo. O pequeno decréscimo nos valores de oxigênio dissolvido (OD) se deu justamente quando o índice de consistência (K) atingiu valores mais elevados, indicando um alto crescimento do microrganismo e alto consumo de oxigênio. A concentração de AC máxima ($C_{p_{max}}$) foi cerca de $0,33 \text{ g.L}^{-1}$, que embora seja menor que a

atingida no B1 ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) garante a reprodutibilidade, mesmo com a variação do novo lote de criotubos.

Na seqüência do trabalho foi avaliada a influência da ornitina na produção de AC em cultivos em batelada alimentada. A principal característica desse tipo de cultivo é minimizar os efeitos inibitórios e de repressão catabólica no meio de produção. Desta forma, nos experimentos a suplementação foi realizada de maneira contínua, com uma vazão volumétrica de alimentação (F) de $0,01 \text{ L.h}^{-1}$ e uma concentração de glicerol no meio suplementar (C_{s_e}) de 120 g.L^{-1} , baseando-se na dissertação de mestrado de Teodoro (2004). O tempo de cultivo foi adotado como critério de parada do experimento, sendo que o tempo final em todos os cultivos foi 120 horas. Apenas nos casos onde após três análises consecutivas a concentração de AC continuou decrescendo, o cultivo teve seu final antecipado. Esta quantidade de horas foi a que melhor se adaptou à rotina do laboratório visto que os experimentos exigiam presença contínua de um observador.

A Figura 4.8 mostra os resultados do cultivo em batelada alimentada (BA1) sem adição de ornitina e com meio suplementar similar ao de produção, que foi definido como padrão para os cultivos em batelada alimentada subseqüentes.

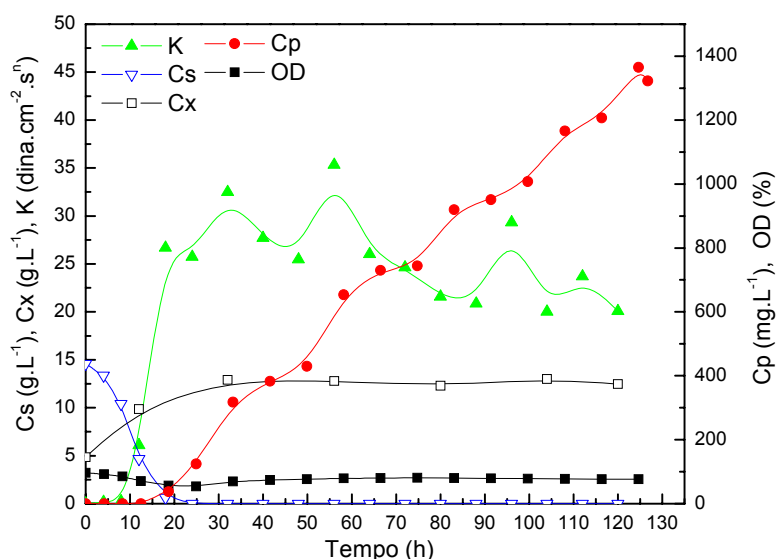


Figura 4.8: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada alimentada BA1 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$; $C_{s_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$) sem adição de ornitina.

Quanto aos cultivos em batelada alimentada, o cultivo BA1 apresentou uma excelente produção em AC de aproximadamente $1,4 \text{ g.L}^{-1}$, quando comparado ao cultivo operado em batelada B5 ($0,33 \text{ g.L}^{-1}$), mostrando que este novo modo de operação gerou resultados muito superiores em termos de produção de AC. A concentração celular (Cx) e a concentração de oxigênio dissolvido no meio permaneceram praticamente constantes ao longo do cultivo. Após o início da alimentação, a concentração de glicerol (Cs) apresentou um perfil como dos demais e o índice de consistência (K) sofreu algumas variações permanecendo numa faixa entre 20 e $35 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ durante quase todo o cultivo. Esse comportamento foi muito diferente daqueles observados nos cultivos em batelada, onde as maiores concentrações de AC estavam associadas ao decréscimo de K após o término do glicerol. Uma possível explicação para tal fato foi a adaptabilidade deste novo lote de criotubos ao meio de cultivo e principalmente à nova forma de operação utilizada, o que será comprovado nos cultivos a seguir.

Os resultados obtidos nesse cultivo em batelada alimentada e os dados obtidos durante a dissertação de mestrado de Teodoro (2004) geraram um trabalho sobre a influência das condições de alimentação, publicado no *Applied Journal of Microbiology and Biotechnology* (em anexo).

Com base nos resultados reportados por Teodoro *et al.* (2006a), dos resultados dos cultivos preliminares em batelada com adição de ornitina e daqueles obtidos por Chen *et al.* (2003), como foi descrito no item 3.7.1.2, realizou-se três cultivos com a mesma composição do meio suplementar, vazão volumétrica de alimentação (F) e concentração de glicerol no meio de cultura suplementar (C_{s_e}). Entretanto a concentração de ornitina no meio de cultura suplementar foi variada da seguinte forma: BA2 ($C_{orn_e} = 11,10 \text{ g.L}^{-1}$), BA3 ($C_{orn_e} = 7,40 \text{ g.L}^{-1}$), e BA4 ($C_{orn_e} = 3,40 \text{ g.L}^{-1}$). Na Figura 4.9 são apresentados os resultados para o cultivo em batelada alimentada BA2 ($C_{orn_e} = 11,10 \text{ g.L}^{-1}$).

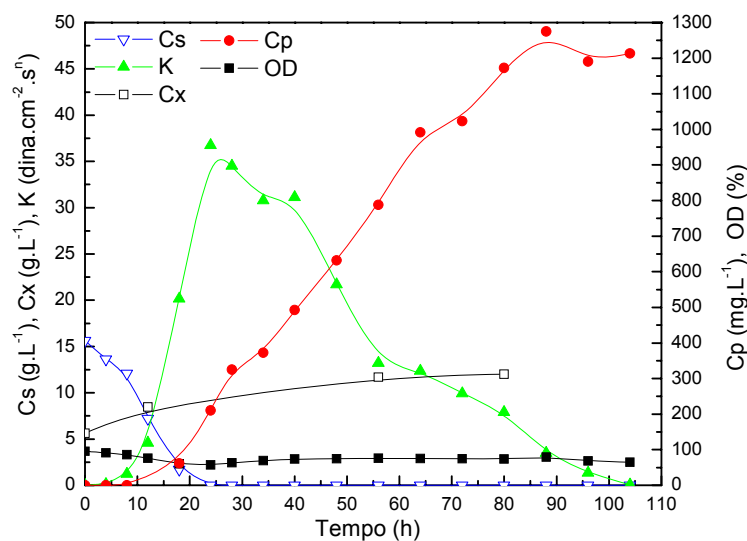


Figura 4.9: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada alimentada BA2 ($Corn_e=11,10 \text{ g.L}^{-1}$)

Nota-se que as concentrações de Cx, Cs e OD obedeceram aos perfis anteriores dos cultivos em batelada alimentada. O índice de consistência (K) atingiu valores próximos a $40 \text{ dina.cm}^{-2}.s^n$ em 18 horas, o que indica um rápido aumento da concentração celular na fase de crescimento. Após 24 horas, houve uma queda acentuada de K, mais uma vez diferindo neste aspecto do cultivo BA1. A concentração de AC (Cp) foi em torno de $1,25 \text{ g.L}^{-1}$, indicando que talvez a concentração superior de ornitina tenha sido o limitador da concentração de AC.

A Figura 4.10 mostra os resultados obtidos no cultivo em batelada alimentada BA3 ($Corn_e=7,40 \text{ g.L}^{-1}$). Pode-se observar que a concentração de glicerol (Cs) permaneceu com valores próximos a zero mesmo após a alimentação, a concentração celular (Cx) aumentou durante o consumo de glicerol e a partir daí permaneceu num patamar durante quase todo o cultivo, assim como a concentração de oxigênio dissolvido (OD). O índice de consistência (K) decresceu após a etapa de crescimento, diferentemente do observado no cultivo padrão BA1, mostrando que houve uma diminuição na quantidade de células viáveis no caldo. Nas condições desse cultivo, a concentração de AC (Cp) alcançou um valor máximo de aproximadamente $1,4 \text{ g.L}^{-1}$.

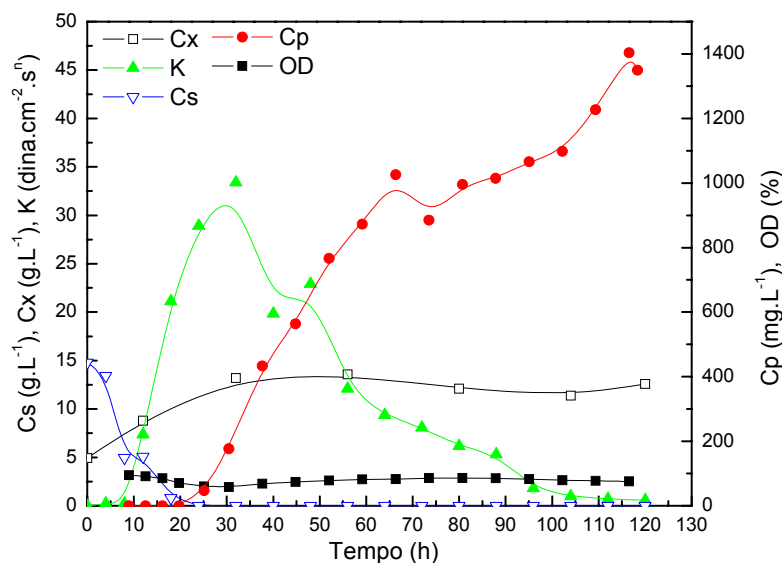


Figura 4.10: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada alimentada BA3 ($Corn_e=7,40 \text{ g.L}^{-1}$).

A Figura 4.11 mostra os resultados obtidos no cultivo BA4 ($Corn_e=3,40 \text{ g.L}^{-1}$). Observa-se que novamente as concentrações de Cx, Cs e OD tiveram os perfis esperados, diferindo apenas de certo aumento da concentração celular (Cx) nas horas finais de cultivo, o que pode ser notado pelo perfil do índice de consistência (K) que, embora tenha decrescido com o tempo, demorou a atingir valores mais baixos. O perfil de K deste cultivo foi o que mais se assemelhou ao do cultivo BA1, indicando com isso que a manutenção da concentração celular ao longo dos cultivos favorece a produção de AC e que a velocidade líquida de produção ($\sim dCp/dT$) está diretamente relacionada com a “saúde estrutural” do micélio expressa em termos do índice de consistência do caldo.

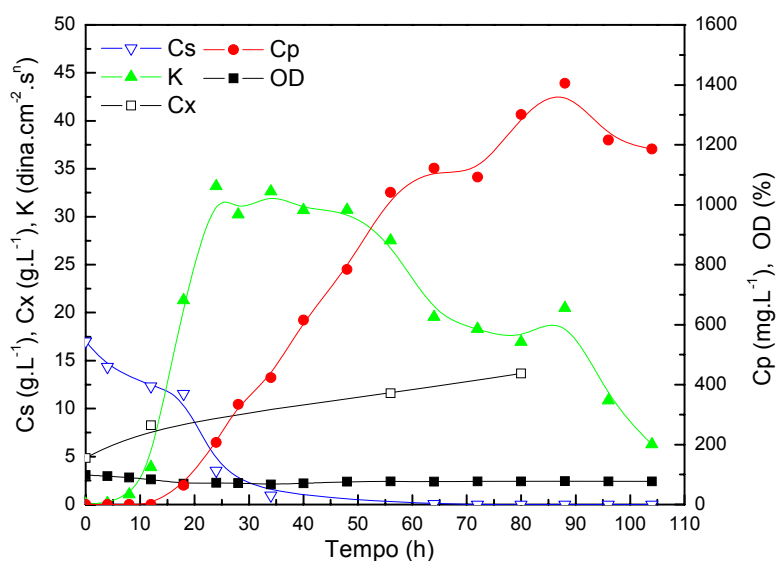


Figura 4.11: Perfis de concentração relativos ao cultivo em batelada alimentada BA4 ($Corn_e=3,70 \text{ g.L}^{-1}$).

A concentração máxima de produto (Cp_{max}) foi de $1,405 \text{ g.L}^{-1}$, ligeiramente superior ao máximo obtido no cultivo BA3. Porém, cabe ressaltar que o decréscimo na velocidade de produção após 60 horas, provavelmente devido ao acúmulo de substâncias indesejáveis no caldo de fermentação, diminuiu a produção e/ou aumentou degradação do AC.

Na seqüência são apresentados os gráficos comparativos dos perfis de concentração e de produtividade volumétrica de AC, ilustrados na Figura 4.12.

Observa-se na Figura 4.12 que as produções máximas de AC foram similares nos cultivos em batelada alimentada e muito superior à obtida no cultivo em batelada B5. As maiores produtividades de AC foram obtidas nos cultivos em batelada alimentada com alimentação de ornitina (BA2, BA3 e BA4). Esse adiantamento na produção indica que a adição de ornitina favoreceu um aumento na velocidade de produção do AC.

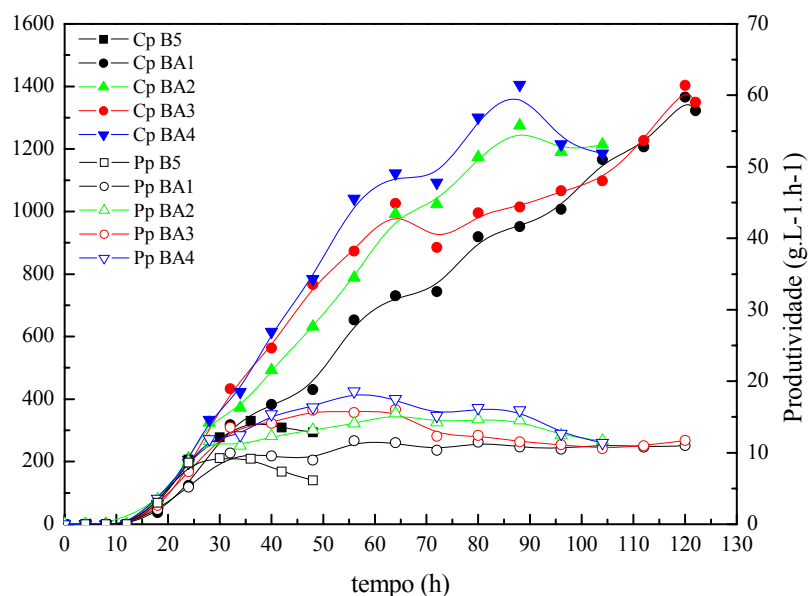


Figura 4.12: Perfis de concentração de AC (Cp) e de produtividade volumétrica (Pp) ao longo do cultivo em batelada (B5) e dos cultivos em batelada alimentada: BA1 ($Corn_e=0,00$ g.L⁻¹) BA2 ($Corn_e=11,10$ g.L⁻¹), BA3 ($Corn_e=7,40$ g.L⁻¹) e BA4 ($Corn_e=3,70$ g.L⁻¹)

No experimento BA4 a maior produção de AC, cerca de 1,405 g.L⁻¹ foi obtida em 90 horas de cultivo, atingindo uma produtividade volumétrica em AC (Pp) de 18,6 mg.L⁻¹.h⁻¹. Entretanto, a concentração máxima de AC obtida nos experimentos em batelada alimentada foi independente da concentração de ornitina no meio suplementar, diferindo do reportado na literatura. Chen *et al.* (2003) realizaram experimentos em batelada alimentada com suplementação de ornitina em mesa incubadora rotativa, e observaram um aumento de 270% na produção de AC, quando comparado com cultivos não suplementados. A diferença entre os resultados desses autores e o do presente trabalho pode ser explicada pelas diferentes condições de transferência de oxigênio dos cultivos, uma vez que Chen *et al.* (2003) realizaram experimentos em frascos agitados. A concentração máxima e a produtividade em AC do presente trabalho é a maior encontrada na literatura até o presente momento, em trabalhos que utilizam linhagem selvagem de *S. clavuligerus* e meio de produção complexo contendo derivados de soja e glicerol como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente (Mayer e Deckwer, 1996; Chen *et al.*, 2002, 2003; Baptista-Neto *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Teodoro *et al.*, 2006a).

Recentemente, Saudagar e Singhal (2007) reportaram uma produção de AC em torno de $1,8 \text{ g.L}^{-1}$, em frascos agitados utilizando *S. clavuligerus* MTCC 1142, indicado como linhagem selvagem, cultivada com meio sintético com composição similar ao meio de cultura GSPG (glicerol, sacarose, prolina e ácido glutâmico) suplementado com L-treonina. As condições de cultivo propostas neste trabalho foram reproduzidas em mesa incubadora rotativa e em biorreator convencional de bancada. Os resultados obtidos, em termos de AC, diferiram do reportado por esses autores sendo muito menores, em torno de 20 e 50 mg.L^{-1} , respectivamente. Gouveia *et al.* (1999) cultivaram *S. clavuligerus* ATCC 27064 e obtiveram uma concentração máxima de AC de 25 mg.L^{-1} em meio GSPG e por volta de 90 mg.L^{-1} em meio GSPA (glicerol, sacarose, prolina e arginina). Tais diferenças nos levaram a crer que o microrganismo, *S. clavuligerus* MTCC 1142, pode ser uma linhagem mutante, ou que possa ter havido problemas analíticos na detecção de AC.

A Figura 4.13 ilustra a concentração de ornitina ao longo dos cultivos em batelada alimentada.

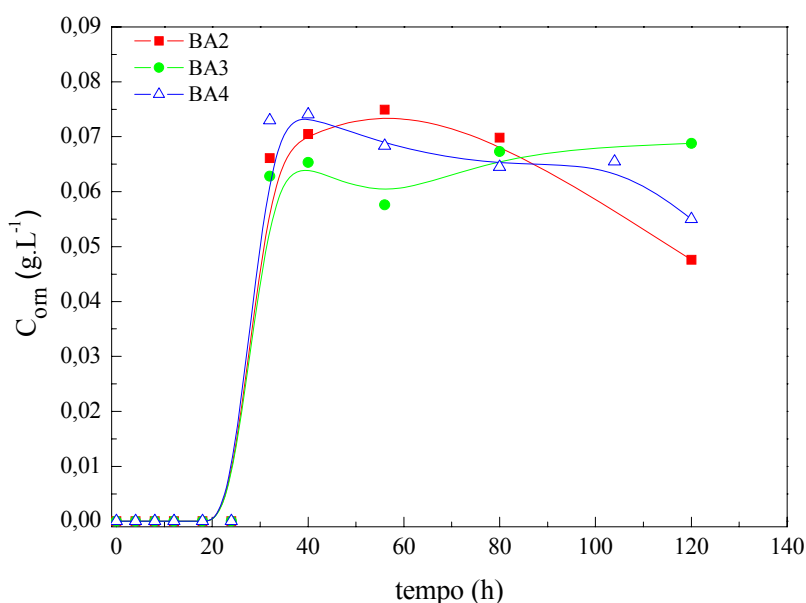


Figura 4.13: Perfil de concentração de ornitina (C_{orn_e}) dos cultivos em batelada alimentada: BA2 ($C_{orn_e}=11,10 \text{ g.L}^{-1}$), BA3 ($C_{orn_e}=7,40 \text{ g.L}^{-1}$), e BA4 ($C_{orn_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$)

Pode ser observado que ocorre um acúmulo de ornitina, entre 50 e 70 mg.L^{-1} , 4 horas após o início da alimentação. Em outras palavras, indiferente da quantidade de ornitina

alimentada, a concentração deste aminoácido permanece constante, indicando uma condição de estado estacionário ($dC_{orn}/dt \cong 0$) para a ornitina onde a velocidade de consumo é igual à de alimentação. Isto mostra que a conversão de ornitina em arginina é controlada pelo fluxo mássico com o qual a ornitina é adicionada. Como a velocidade de produção de AC é afetada pela adição de ornitina ao meio e a produção de AC é praticamente a mesma em todos os cultivos, isto sugere que a produção de AC seria influenciada ou inibida por outros nutrientes ou subprodutos acumulados no caldo durante o processo, incluindo o próprio AC (inibição pelo produto).

4.2. Modelagem cinética da produção de AC em cultivos em batelada e em batelada alimentada

A modelagem cinética do processo teve a estratégia de inicialmente ajustar o modelo proposto aos resultados do cultivo tradicional em batelada (B) com o intuito de se prever os resultados e definir as condições de alimentação empregadas nos cultivos em batelada alimentada (BA) subsequentes.

O modelo foi inicialmente ajustado aos valores experimentais obtidos no primeiro cultivo em batelada padrão (B1). 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 ocorrência de degradação de produto (k_{dp}), representado pelas Equações 3.1 a 3.4, do item 3.7.2, que seguem:

$$\frac{dCx}{dt} = \left(\mu_{\max} \frac{Cs}{K_S + Cs} - f(C_{S_1}) \cdot k_d \right) \cdot Cx \quad (3.1)$$

$$\frac{dCs}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu_{\max} \frac{Cs}{K_S + Cs} \cdot Cx \quad (3.2)$$

$$\frac{dCp}{dt} = f(C_{S_2}) \cdot \beta \cdot Cx - k_{dp} \cdot Cp \quad (3.3)$$

A Figura 4.14 ilustra o bom ajuste do modelo, representado pelas Equações 3.1 a 3.3, aos valores experimentais do cultivo em batelada.

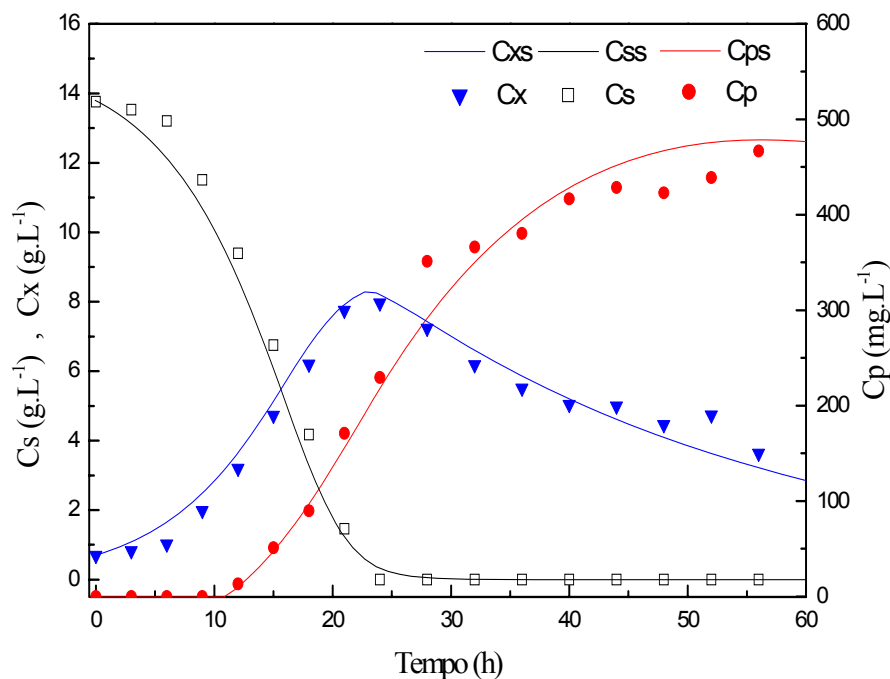


Figura 4.14: Ajuste do modelo cinético aos valores experimentais do cultivo em batelada (B1)

A produção de AC teve início quando a concentração de glicerol (C_s) alcançou o valor de 10 g.L^{-1} , em consonância com os resultados obtidos por Baptista-Neto *et al.* (2000) para meio solúvel. Após o consumo total 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 (dC_p/dt) em paralelo com um decréscimo da concentração celular (C_x) em virtude do início do período de morte celular. O conhecimento do papel do glicerol na produção de AC, que 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 subsequentes.

Para simular a produção de AC nos cultivos em batelada alimentada subsequentes foram utilizados os valores das constantes estimadas utilizando o programa AnaBio 2.0 (Silva *et al.*, 2005) a partir do ajuste visual do modelo aos resultados

experimentais do cultivo em batelada (B1), quais sejam: $\mu_{\max}=0,207 \text{ h}^{-1}$, $K_s=6,0 \text{ g.L}^{-1}$, $k_{dp}=0,017 \text{ h}^{-1}$, $\beta=3,0 \text{ mg}_{CA} \cdot \text{g}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, concentração crítica de glicerol quando inicia a morte celular $C_{s1}=1,0 \text{ g.L}^{-1}$, concentração crítica de glicerol quando se inicia a produção de AC $C_{s2}=11,65 \text{ g.L}^{-1}$, constante de morte celular ($k_d=0,03 \text{ h}^{-1}$) e coeficiente de rendimento de substrato a células ($Y_{X/S}=0,574 \text{ g}_x \cdot \text{g}_s^{-1}$).

A Equação 3.4 foi utilizada inicialmente para prever a concentração de AC ao longo dos cultivos em batelada alimentada realizados por Teodoro (2004) em sua dissertação de mestrado, que serviram de ponto de partida para a definição das condições experimentais dos cultivos desta tese de doutorado.

A nomenclatura empregada para os cultivos realizados por Teodoro (2004), FB (“*fed-batch*”) foi assim mantida para diferir da nomenclatura BA (batelada alimentada) do presente trabalho.

A Figura 4.15 ilustra os dados simulados pelo modelo e os dados experimentais relativos ao cultivo FB1 realizado com $F=0,08 \text{ L.h}^{-1}$ e $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$.

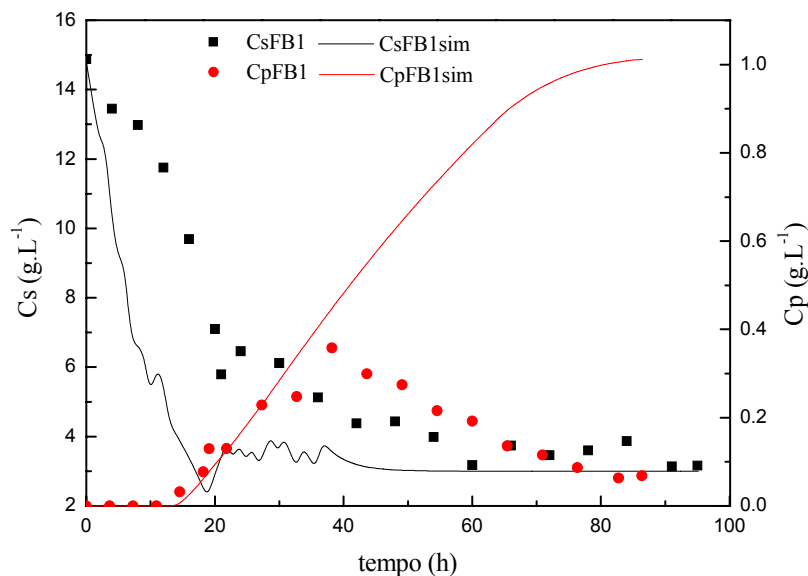


Figura 4.15: Resultados experimentais e simulados da concentração de AC relativos (C_p) e concentração de glicerol (C_s) ao cultivo FB1 realizado com $F=0,08 \text{ L.h}^{-1}$ e $C_{s_e}=30 \text{ g.L}^{-1}$

Pode-se notar pelos resultados que o cultivo FB1 além de apresentar o valor máximo de C_p inferior ao esperado pelo modelo, cerca de $0,358 \text{ g.L}^{-1}$, teve um decréscimo

acentuado na concentração de AC após 40 horas de cultivo. Observa-se que após esse tempo, fatores como a diluição do caldo, causada pela alta vazão de alimentação ($0,08 \text{ L.h}^{-1}$) e, principalmente fenômenos de inibição e/ou repressão pelo substrato decorrente da alta vazão mássica de alimentação de glicerol ($F \cdot C_{s_e} = 2,4 \text{ g.h}^{-1}$), condição não prevista pelo modelo proposto, contribuíram para que os resultados esperados tenham se afastado demais dos dados experimentais após o início da alimentação. Após diagnosticar esses problemas e recorrendo a trabalhos da literatura como o proposto por Chen *et al.* (2002), novas estratégias de alimentação foram empregadas, sempre utilizando altas concentrações de glicerol no meio de alimentação e baixas vazões de alimentação e diminuindo o produto $F \cdot C_{s_e}$ para evitar problemas associados com inibição e/ou repressão pelo substrato.

A Figura 4.16 ilustra os resultados experimentais e simulados dos cultivos em batelada alimentada com mesmo $F \cdot C_{s_e}$ ($=1,2 \text{ g.h}^{-1}$): FB2 ($F=0,08 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$), FB3 ($F=0,04 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$), FB4 ($F=0,02 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{s_e}=60 \text{ g.L}^{-1}$) e BA1 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{s_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$).

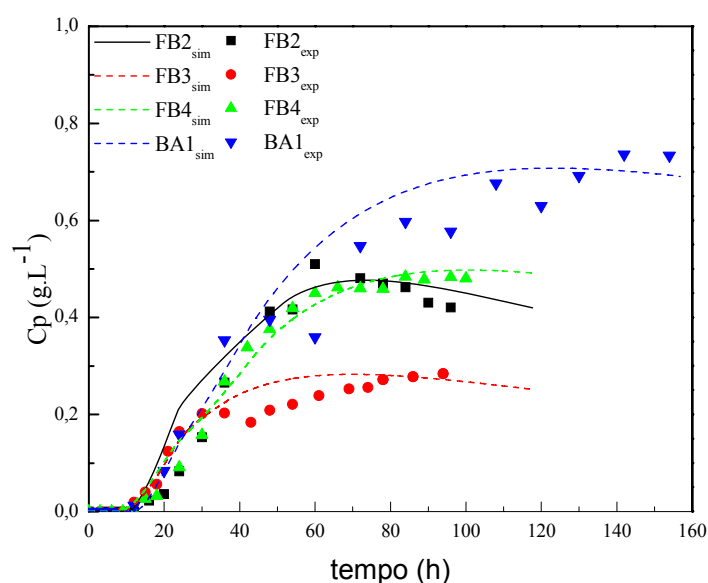
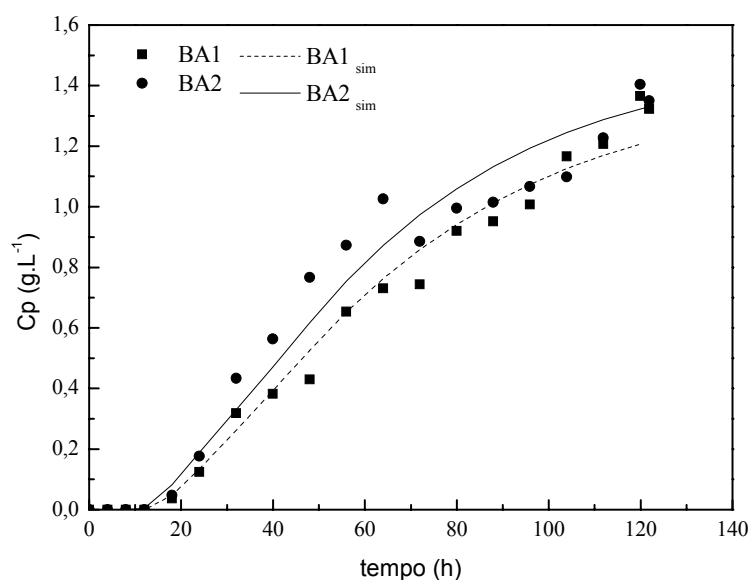


Figura 4.16: Resultados experimentais e simulados de C_p relativos aos cultivos FB2 ($F=0,08 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$), FB3 ($F=0,04 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{s_e}=15 \text{ g.L}^{-1}$), FB4 ($F=0,02 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{s_e}=60 \text{ g.L}^{-1}$) e BA1 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{s_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$).

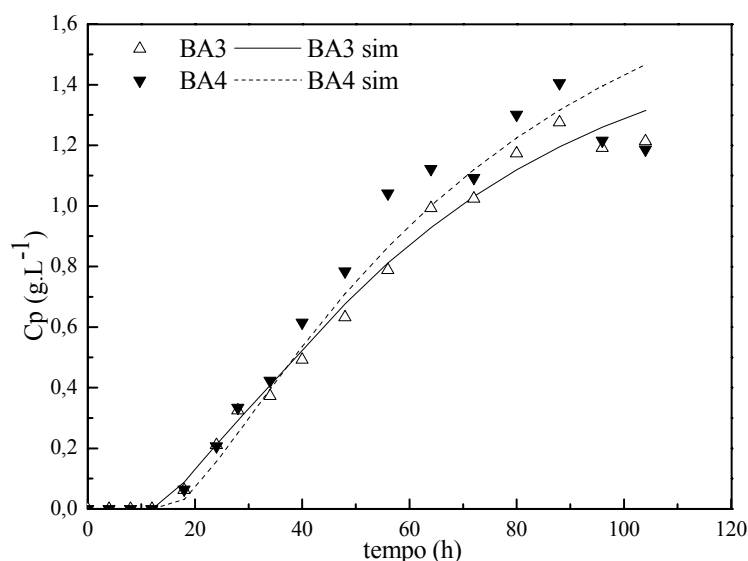
Pode-se observar que, de modo geral os dados simulados concordam muito bem com os experimentais para todos os cultivos analisados. No caso dos cultivos FB3 e BA1, alguns dados simulados apresentaram um desvio maior em relação aos experimentais na fase intermediária do cultivo, no entanto, isso não influencia na validade do modelo. Nos cultivos FB2 e FB4 as linhas simuladas acompanham muito bem os dados experimentais, mostrando que o modelo se adequou melhor aos resultados dos cultivos com baixa vazão de alimentação.

Constata-se, portanto, que o modelo proposto pode prever com razoável precisão a produção de AC em cultivos em batelada alimentada desde que os cultivos sejam realizados em condições que evitem a inibição e/ou repressão pelo substrato, no caso o glicerol. No entanto, modelos cinéticos mais complexos que tentam inferir o papel do glicerol e de outros precursores como a ornitina devem ser estudados de forma a explicar a produção de AC em diferentes condições de cultivo.

A Figura 4.17 ilustra os dados experimentais e simulados pelo modelo em relação à concentração de AC dos cultivos em batelada alimentada com mesmo F ($0,01 \text{ l.h}^{-1}$) e C_{S_e} (120 g.L^{-1}), porém com diferentes concentrações de ornitina no meio suplementar: BA1 ($\text{Corn}_e=0,00 \text{ g.L}^{-1}$), BA2 ($\text{Corn}_e=11,10 \text{ g.L}^{-1}$), BA3 ($\text{Corn}_e=7,40 \text{ g.L}^{-1}$) e BA4 ($\text{Corn}_e=3,70 \text{ g.L}^{-1}$).



(a)



(b)

Figura 4.17: Comparação dos perfis de concentração de AC (C_p) simulados e experimentais relativos aos cultivos em batelada alimentada: BA1 ($C_{orn_e}=0,00 \text{ g.L}^{-1}$) BA2 ($C_{orn_e}=11,10 \text{ g.L}^{-1}$), BA3 ($C_{orn_e}=7,40 \text{ g.L}^{-1}$) e BA4 ($C_{orn_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$).

Pode ser observado na Figura 4.17 que o modelo utilizado se ajustou adequadamente aos com os resultados experimentais, o que significa que os valores de β estimados podem ser utilizados como parâmetro para se determinar o melhor modo de operação.

Baptista-Neto *et al.* (2000) propõem que o valor estimado da velocidade específica de produção de AC (β) é maior quando se utiliza como fonte de N o isolado protéico de soja em comparação com a peptona, mostrando que essa fonte de N é melhor para produção de AC por *S. clavuligerus*.

Depois da fase de produção, os parâmetros (β e k_d) foram estimados por regressão não-linear utilizando os valores experimentais de C_x , C_s e C_p , ao longos do cultivos em batelada alimentada com diferentes concentrações de ornitina realizado no presente trabalho (BA1, BA2, BA3 e BA4). Os valores de C_p simulados foram obtidos através do modelo proposto. A Tabela 4.1 apresenta os valores otimizados da constante de formação de produto (β) e da constante de degradação do produto k_{dp} , juntamente com o desvio, calculados pelo modelo de rotina proposta por Baptista-Neto (2000), considerando os cultivos em

batelada alimentada com adição de ornitina. O valor de R^2 apresentados na Tabela 4.1, bem como as Figuras 4.17 (a e b) ilustra os bons ajustes obtidos.

Salienta-se que esta etapa do trabalho não teve a finalidade de discriminar modelos cinéticos, nem tampouco comparar valores dos parâmetros cinéticos obtidos com outros apresentados na literatura. O objetivo foi utilizar um modelo cinético simples e um programa de simulação (AnaBio 2.0) como ferramentas para prever condições experimentais que indicasse para maiores produções de AC.

Tabela 4.1: Valores otimizados de β e k_d (graus de confiança de 95%)

Cultivos	$Corn_e$ ($g.L^{-1}$)	β ($mg_{CA}.g_x^{-1}.h^{-1}$)	k_d (h^{-1})	R^2 (-)
BA1	0,00	0,00217 \pm 0,0012	0,0104 \pm 0,0008	0,997
BA2	11,10	0,00257 \pm 0,0009	0,0109 \pm 0,0011	0,978
BA3	7,40	0,00243 \pm 0,0016	0,0114 \pm 0,0016	0,989
BA4	3,70	0,00274 \pm 0,0023	0,0094 \pm 0,0009	0,986

De acordo com os valores de β e k_d otimizados a partir dos dados experimentais, o cultivo que apresentou maior valor de β e conseqüentemente menor de k_d foi o cultivo BA4, com suplementação de ornitina de 3,7 $g.L^{-1}$, que também mostrou a mais alta concentração de AC do conjunto de experimentos mostrado na Figura 4.17.

Os resultados da modelagem do processo de produção de AC foram publicados no decorrer do trabalho em anais de congressos internacionais, a saber, no *9th International Chemical Engineering Conference* (Coimbra, Portugal) (Teodoro *et al.*, 2005) e no *XXII Congreso Interamericano de Ingeniería Química* (Buenos Aires, Argentina) (Teodoro *et al.*, 2006b).

4.3. Estudo da influência da composição do meio suplementar na produção de AC em batelada alimentada

Nesta etapa do trabalho foram avaliadas as influências da composição do meio de cultura suplementar *completo*, similar ao meio de produção, e *simplex*, com água destilada

e antiespumante, na produção de AC para cultivos com mesmas condições de alimentação com $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$, $\text{Corn}_e=3,70 \text{ g.L}^{-1}$ e $\text{Cs}_e=120 \text{ g.L}^{-1}$. Os resultados da produção de AC ao longo dos cultivos em batelada alimentada com meios de cultura *completo* e *simples* estão ilustrados na Figura 4.18.

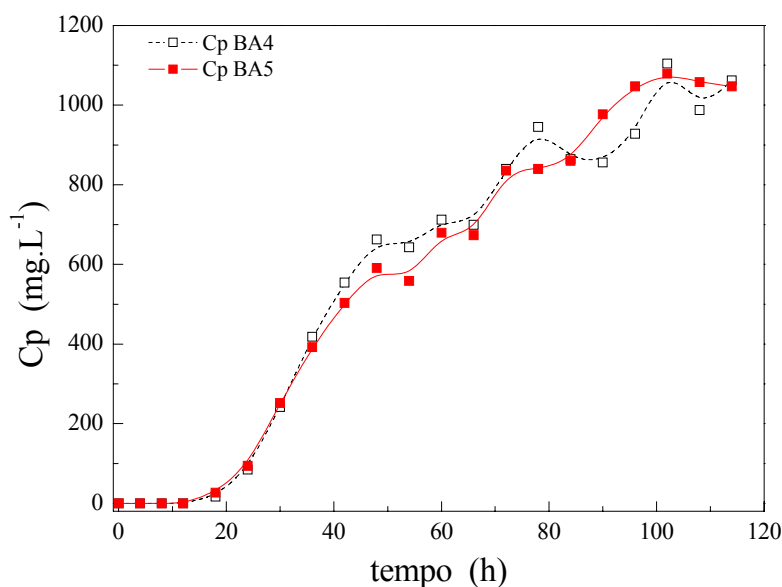


Figura 4.18: Perfis de concentração de AC (C_p) ao longo dos cultivos BA4b (meio completo) e BA5 (meio simples) com $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$, $\text{Corn}_e=3,70 \text{ g.L}^{-1}$ e $\text{Cs}_e=120 \text{ g.L}^{-1}$

O cultivo BA4 realizado com meio de cultura *completo* é uma réplica do utilizado na etapa anterior deste trabalho. Já o cultivo BA5 com meio de cultura *simples* foi realizado com a finalidade de se observar o comportamento do perfil de AC com este novo meio de cultura suplementar. Pode se observar que em termos de produção do AC não foram encontradas diferenças na concentração máxima, em torno de $1,1 \text{ g.L}^{-1}$ em 102 horas, o que mostra que a composição do meio suplementar, na condição apresentada, não influenciou a produção de AC. Em consequência disto, o meio com suplementação mais simples contendo apenas água destilada, antiespumante, glicerol e ornitina, nas condições antes definidas, foi utilizado nos experimentos seguintes para os outros casos estudados. Garantiu-se assim uma alimentação mais simples do ponto de vista experimental, economicamente mais barata e adequada a este tipo de operação e às condições do processo.

4.4. Avaliação da produção de AC em batelada alimentada em diferentes condições de alimentação

O efeito das diferentes concentrações de glicerol na biossíntese do AC é mostrado na Figura 4.19. Na dissertação de Teodoro (2004) a condição de $F=0,01 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, $C_{s_e}=120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e o produto ($F\cdot C_{s_e}=1,2 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$) foi definida como a melhor condição experimental para produção de AC sem a presença de ornitina no meio suplementar. No presente trabalho estas condições foram modificadas e testadas com a adição de ornitina ao meio suplementar. As quantidades de glicerol adicionadas ao meio suplementar foram modificadas de modo que tivéssemos uma faixa de concentração matematicamente definida, partindo de 120 até 240 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e passando por valores intermediários de 150 e 180 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Os cultivos foram realizados com $F=0,01 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ e $C_{orn_e}=3,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, e as seguintes condições de vazões de glicerol (C_{s_e}) foram testadas: BA5 ($C_{s_e}=120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), BA6 ($C_{s_e}=150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), BA7 ($C_{s_e}=180 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e BA8 ($C_{s_e}=240 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Todos os cultivos foram suplementados com meio de cultura simples.

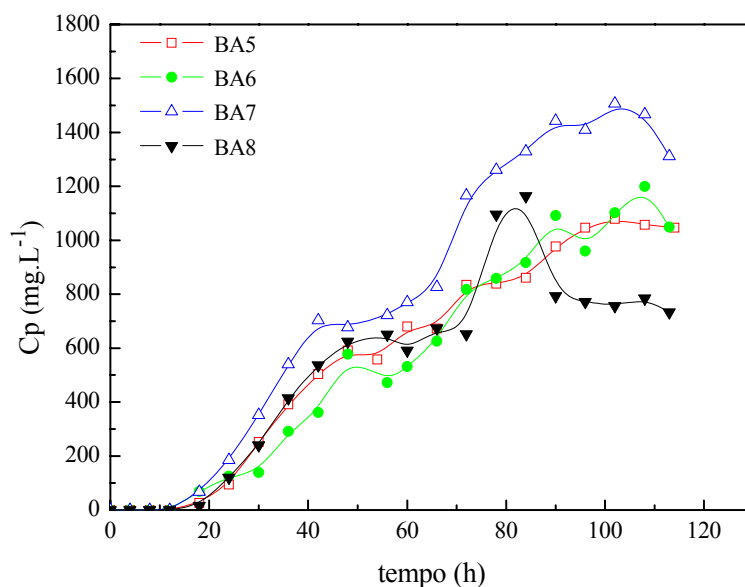


Figura 4.19: Perfis de concentração de AC (C_p) ao longo dos cultivos em batelada alimentada com $F=0,01 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ e $C_{orn_e}=3,70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$: BA5 ($C_{s_e}=120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), BA6 ($C_{s_e}=150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), BA7 ($C_{s_e}=180 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e BA8 ($C_{s_e}=240 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Os perfis de concentração de AC mostram uma similaridade até 48 horas de cultivo. Após este período a concentração de AC decresce ligeiramente, mostrando uma mudança na velocidade de formação do AC. Esse “degrau” pode ter sido ocasionado por uma exaustão dos aminoácidos livres presentes no caldo de fermentação. A retomada da produção de AC pode estar associada ao início da hidrólise das proteínas da soja disponibilizando novamente os aminoácidos consumidos pelo microrganismo. Tal como observado por Mayer e Deckwer (1996) e Ortiz *et al.* (2007), “é possível que a presença de farinha de soja no meio de cultivo induza a formação de hidrolases por *S. clavuligerus*, em particular proteases extracelulares, que degradam continuamente a farinha de soja durante a fase de crescimento e dê o suprimento necessário de nutrientes ao microrganismo”. No caso do presente trabalho, o substrato (fonte de N) é um isolado protéico de soja, no entanto nota-se que o microrganismo também produz essas hidrolases, nos levando a afirmar que essas enzimas podem ser produzidas por *S. clavuligerus* com várias fontes de N provenientes da soja.

A melhor condição experimental para a produção de AC foi a apresentada no cultivo BA7 com $C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$ e o produto $F \cdot C_{s_e}=1,8 \text{ g.h}^{-1}$. A concentração máxima de AC foi de $1,506 \text{ g.L}^{-1}$, a maior atingida até o presente momento em trabalhos reportados na literatura, mostrando que a presença de ornitina na alimentação juntamente com o glicerol mostrou-se uma combinação positiva na biossíntese de AC.

Os perfis de concentração de glicerol (Cs) e do índice de consistência (K) são mostrados na Figura 4.20. Em termos de concentração de glicerol (Cs) pode-se notar que todos os cultivos tiveram perfil de consumo parecido, com o consumo total do glicerol em 30 horas. Somente no cultivo BA8 ($C_{s_e}=240 \text{ g.L}^{-1}$) observa-se acúmulo do glicerol no caldo (Figura 4.20), o que pode ter ocasionado a queda na produção de AC vista na Figura 4.19 após 80 horas de cultivo.

Mayer e Deckwer (1996) já ressaltaram que o glicerol em altas concentrações perde o seu papel de precursor e passa a ser inibidor na biossíntese da molécula de AC. O índice de consistência (K) atingiu para esse novo conjunto de experimentos valores muito acima dos observados anteriormente, indicando que em condições de batelada alimentada, o crescimento do microrganismo é favorecido. Nota-se que nos cultivos BA6 e BA8, os valores de K se mantêm altos por mais tempo, diferindo dos cultivos BA5 e BA7, e que essa condição não garante altas produções de AC. Aliás, no presente trabalho pode-se observar que a produção de AC atinge altos valores nos cultivos logo após o decréscimo dos valores de K, mostrando assim que o microrganismo necessita de substâncias metabolizadas ao longo do

tempo para a formação do AC e/ou que haja concentração intracelular de AC, sendo o produto liberado no caldo após lise celular.

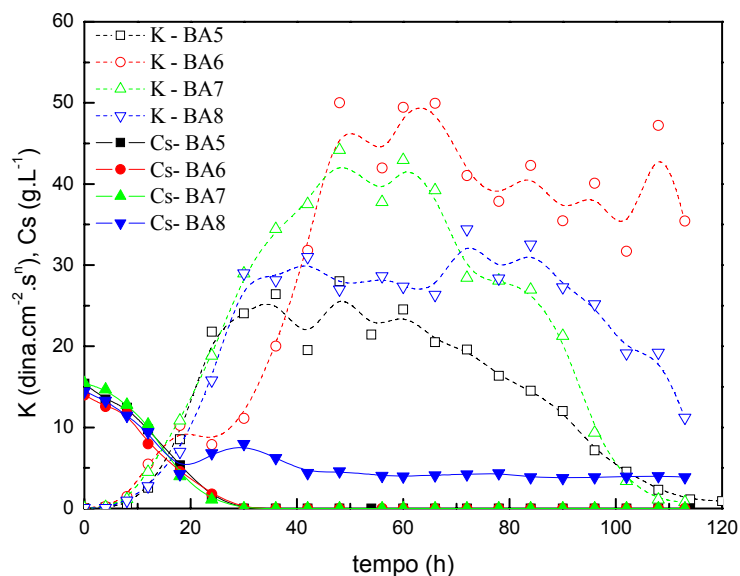


Figura 4.20: Perfis de concentração de glicerol (Cs) e do índice de consistência (K) ao longo dos cultivos em batelada alimentada com $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$ e $\text{Corn}_e=3,70 \text{ g.L}^{-1}$: BA5 ($C_{s_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$), BA6 ($C_{s_e}=150 \text{ g.L}^{-1}$), BA7 ($C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$) e BA8 ($C_{s_e}=240 \text{ g.L}^{-1}$)

A Tabela 4.2 apresenta valores de taxa de diluição, produção e produtividade em AC obtidos na literatura e no presente trabalho. Nota-se que a produção máxima de AC obtida no presente trabalho é maior que o dobro da relatada por Teodoro *et al.* (2006a), que é a condição de partida dos cultivos em batelada alimentada, isso devido ao uso de um menor valor da taxa de diluição (D), já que o volume inicial é maior ($V_i = 3,6 \text{ L}$), somado à otimização pela presença de ornitina no meio de cultura.

Tabela 4.2: Resultados de produção de AC obtidos na literatura e no presente trabalho

Referência	D (h ⁻¹)	F.Cs _e /V (g.h ⁻¹ .L ⁻¹)	Cp _{max} (g.L ⁻¹)	Pp _{max} (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)
Mayer e Deckwer (1996)	0,0055	-	0,50	5,6
Laat e Krabben (2000)	0,0052	-	0,50	6,4
Nabais et al. (2000)	0,0040	-	1,6	7,4
Chen <i>et al.</i> (2002)	0,0040	0,40	0,28	2,8
Chen <i>et al.</i> (2003)*	0,0020	0,17	0,31	2,0
Teodoro <i>et al.</i> (2006)	0,0025	0,30	0,70	6,7
Presente Trabalho (2008)	0,0025	0,45	1,50	14,7

*cultivo em mesa incubadora rotativa

A variável (F.Cs_e/V) apresentada na Tabela 4.2 é a velocidade de alimentação de substrato limitante, no caso o glicerol, que em condições de pseudo-estado estacionário, se iguala à velocidade de consumo de substrato pelas células, que está diretamente relacionada com a produção de AC. Comparando as informações da Tabela 4.2, observa-se que a condição que levou à maior produção de AC no presente trabalho aliou uma baixa taxa de diluição (D) com uma comparativamente alta velocidade de alimentação e, portanto, de consumo de glicerol, que assegurou um dado nível de concentração celular na fase estacionária com total consumo de glicerol. Esta condição assegurou uma quantidade suficiente de substrato às células, porém não levando à condição de inibição da produção de AC.

Quanto à influência da taxa de diluição (D), comparando os resultados obtidos por Mayer e Deckwer (1996) e Laat e Krabben (2000) que utilizaram meios de cultura similares, porém com farinha de soja substituindo a proteína isolada de soja utilizada no presente trabalho, observa-se que altos valores de diluição acabaram por definir menores concentrações máximas de produto.

Para avaliar se a influência da vazão volumétrica de alimentação (F) e, portanto, da vazão mássica de alimentação de glicerol (F.Cs_e) na produção de AC, um experimento com uma diferente vazão de alimentação, BA9 com F=0,005 L.h⁻¹, foi realizado e seus resultados comparados aqueles do cultivo BA7. Ambos os cultivos tiveram na

composição do meio de cultura suplementar, $C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$ e $C_{o_{n_e}}=3,7 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

A Figura 4.21 ilustra a comparação entre as produções de AC obtidos nos cultivos BA7 e BA9. Nota-se que até o instante de se iniciar a alimentação, em 24 horas, as curvas de produção de AC são idênticas. Para tempos de cultivo maiores que 30 horas observa-se que o experimento BA7 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$) mantém a superioridade na produção de AC em relação ao experimento BA9 ($F=0,005 \text{ L.h}^{-1}$) até o final do cultivo. Esse resultado sugere que a quantidade de substrato é a variável chave na produção de AC pela bactéria *Streptomyces clavuligerus*. Dependendo da quantidade de substrato requerido pelo microrganismo, que neste caso foi influenciado pela vazão de alimentação na produção de AC a quantidade adicionada pode estimular ou inibir a síntese do produto.

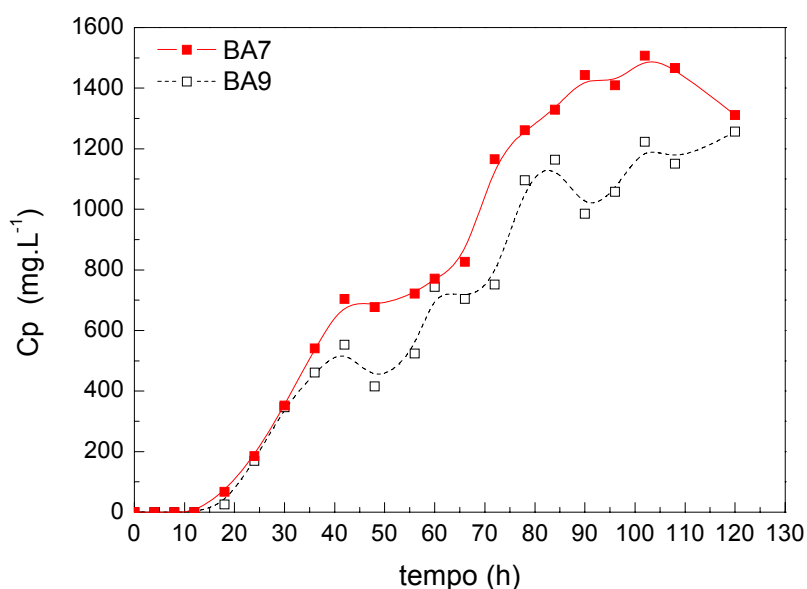


Figura 4.21: Perfis de concentração de AC (C_p) ao longo dos cultivos BA7 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$) e BA9 ($F=0,005 \text{ L.h}^{-1}$)

No presente caso pode-se notar que no cultivo BA7 a estratégia utilizada foi mais eficiente do que a utilizada no cultivo BA9, pois manteve a produção em níveis superiores por todo o cultivo. Possivelmente, no cultivo BA9 a quantidade de substrato requerido pelo microrganismo foi maior que a oferecida na alimentação.

A Figura 4.22 mostra a concentração de glicerol (C_s) e o índice de consistência (K) ao longo dos cultivos. Como a vazão de glicerol adicionada ao cultivo BA7 foi o dobro da

adicionada ao cultivo BA9, esta diferença foi sentida tanto na produção de AC, quanto no crescimento do microrganismo.

Observa-se que a concentração de glicerol (Cs) teve o mesmo perfil nos dois cultivos, atingindo valores próximos a zero após 30 horas e os valores de K foram bem maiores no cultivo BA7 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$) que no cultivo BA9 ($F=0,005 \text{ L.h}^{-1}$). Cabe aqui ressaltar que a manutenção dos valores de K no cultivo BA9 não favoreceu a produção de AC, assim como observado em cultivos anteriores, indicando mais uma vez que a produção de AC não está associada à manutenção da concentração celular na fase de suplementação.

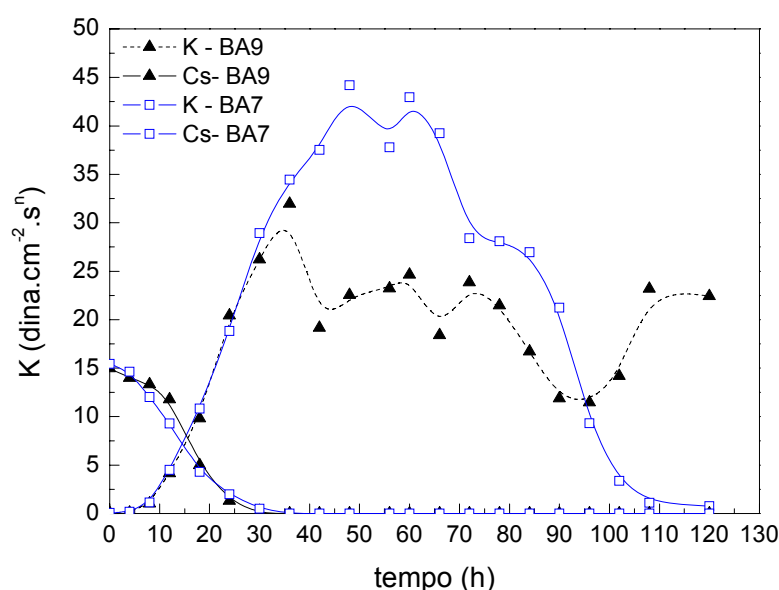


Figura 4.22: Perfis de concentração de glicerol (Cs) e do índice de consistência (K) ao longo dos cultivos em batelada alimentada com $C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$ e $C_{o_n_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$: BA7 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$) e BA9 ($F=0,005 \text{ L.h}^{-1}$)

Assim, podemos concluir que em cultivos em batelada alimentada a utilização de baixa vazão de alimentação do meio de cultura suplementar favorece a produção de AC por *S. clavuligerus*, coincidindo com os resultados obtidos por Teodoro *et al.* (2006a). Porém, deve-se garantir que a quantidade adicionada supra às necessidades nutricionais do microrganismo tanto para a manutenção celular quanto para a produção do metabólito requerido.

A Tabela 4.3 apresenta os resultados obtidos para os cultivos em batelada e batelada alimentada realizados nas diferentes condições experimentais do presente trabalho. Com a respeito à concentração máxima de AC ($C_{p_{max}}$), em todos os cultivos em batelada alimentada, os valores de $C_{p_{max}}$ foram maiores que nos cultivos em batelada. O cultivo BA7 ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{orn_e}=3,7 \text{ g.L}^{-1}$ e $C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$) apresentou a máxima concentração em AC de $1,506 \text{ g.L}^{-1}$, produção cerca de 5 vezes a concentração do cultivo controle em batelada (B5). No cultivo BA4, alimentado com meio completo ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$, $C_{orn_e}=3,7 \text{ g.L}^{-1}$ e $C_{s_e}=120 \text{ g.L}^{-1}$), a maior produtividade volumétrica em AC ($P_{p_{max}}$) foi alcançada, $18,6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, isto associada a uma alta produção de AC ($1,405 \text{ g.L}^{-1}$). A alta produtividade alcançada no presente trabalho é um ponto que merece destaque, pois se trata da mais alta comparada com trabalhos publicados na literatura utilizando linhagem selvagem de *S. clavuligerus*. Em trabalho recente, Baptista-Neto *et al.* (2005) reportaram uma alta produtividade para a produção de AC, $22,2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, porém este valor foi obtido em cultivo contínuo com reciclo celular, com concentração de C_p em torno de 550 mg.L^{-1} .

Com a massa de glicerol e ornitina consumidas e a massa de AC produzido foi possível calcular o coeficiente de rendimento que relaciona a formação do produto (AC) ao consumo de glicerol ($Y_{P/S}$) e ao consumo de ornitina ($Y_{P/Om}$). Esses valores são apresentados na Tabela 4.3. Baseado na estequiometria proposta por Bushell *et al.* (2006) e no fato da ornitina ser convertida a arginina e incorporada na molécula de AC, onde 2 moles de ornitina originam 3 moles de AC, logo o coeficiente de rendimento estequiométrico ($Y_{P/Om}_{est}$), é igual a 1,5 moles AC/ 1 mol ornitina ou 2,26 g AC/ 1 g ornitina em base mássica.

Neste trabalho, Bushell *et al.* (2006) obtiveram um coeficiente de rendimento de AC em relação ao glicerol de $0,40 \cdot 10^{-4} \text{ gp.gs}^{-1}$ operado com $D=0,1 \text{ h}^{-1}$ até $5,8 \cdot 10^{-4} \text{ gp.gs}^{-1}$ operado com $D=0,03 \text{ h}^{-1}$. No presente trabalho, os valores de $Y_{P/S}$ para cultivos em batelada e batelada alimentada variaram entre 0,025 e 0,039 gp.gs^{-1} , com uma taxa de diluição (D) muito menor, entre 0,0028 e 0,0025 h^{-1} . Entretanto, fica claro que $Y_{P/S}$ é fortemente afetado pela composição do meio de cultura e pelas condições de alimentação de glicerol. Com respeito ao coeficiente de rendimento de AC em relação à ornitina ($Y_{P/Om}$), os valores de eficiência (η_p) com base no valor estequiométrico estão apresentados também na Tabela 4.3. Altos valores de η_p , maiores que 50%, foram obtidos em cultivos em batelada alimentada realizados com baixas concentrações de ornitina no meio suplementar ($3,70 \text{ g.L}^{-1}$). O maior valor (109,4%) foi obtido no cultivo BA4. A porcentagem maior que 100% pode ser explicada pela conversão da arginina adicional presente inicialmente no meio de produção em AC. Podemos observar

que as também altas eficiências de AC em relação à ornitina estão associadas com altas produções de AC (BA4 e BA7).

Tabela 4.3: Coeficientes de rendimento e concentração de AC obtida nos Cultivos em batelada e batelada alimentada

Cultivos	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/Orn}$ (g/g)	η_P (%)	$C_{P_{max}}$ (g.L⁻¹)	$P_{P_{max}}$ (mg.L⁻¹.h⁻¹)
B1 (padrão)	0,032	-	-	0,509	9,5
B2	0,035	1,056	46,7	0,569	13,7
B3	0,027	0,523	23,1	0,459	10,6
B4	0,025	0,337	14,9	0,399	10,5
B5 (padrão)	0,022	-	-	0,330	9,2
B6 (padrão)	0,033	-	-	0,550	8,3
BA1	0,033	-	-	1,365	11,7
BA2	0,034	0,807	35,7	1,403	16,0
BA3	0,037	0,696	30,8	1,274	15,5
BA4a	0,039	2,472	109,4	1,405	18,6
BA4b	0,029	1,467	64,9	1,104	13,8
BA5	0,028	1,431	63,3	1,078	12,3
BA6	0,025	1,616	71,5	1,199	12,0
BA7	0,029	1,993	88,2	1,506	16,8
BA8	0,025	1,003	44,4	1,163	14,0
BA9	0,032	0,724	35,2	1,305	11,5
BA10	0,033	2,010	92,3	1,577	16,5
BA11	0,029	1,998	88,7	1,513	13,1

4.5. Variação de escala do biorreator - avaliação da produção de AC em batelada alimentada em biorreatores convencionais de 5 e 10 L

Visto que uma das propostas deste trabalho era a validação dos resultados obtidos em biorreator convencional de bancada de 5L para a escala de 10L, experimentos finais foram realizados neste biorreator. Porém, problemas na preservação e conservação do microrganismo durante todo o trabalho acabaram impossibilitando, por uma questão de tempo, a realização de vários cultivos em biorreator de 10 L, nos levando a realizar somente dois cultivos nesta nova escala.

Como já relatado, os problemas com o estoque de trabalho foram constantes durante todo o período deste doutorado. Assim, para a parte final deste trabalho, um novo lote de criotubos foi confeccionado a partir do “*screening*” da linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 e com isso um novo cultivo padrão em batelada (B6) foi realizado. A Figura 4.23 mostra os resultados do cultivo em batelada (B6) que serviu de padrão para os cultivos subsequentes.

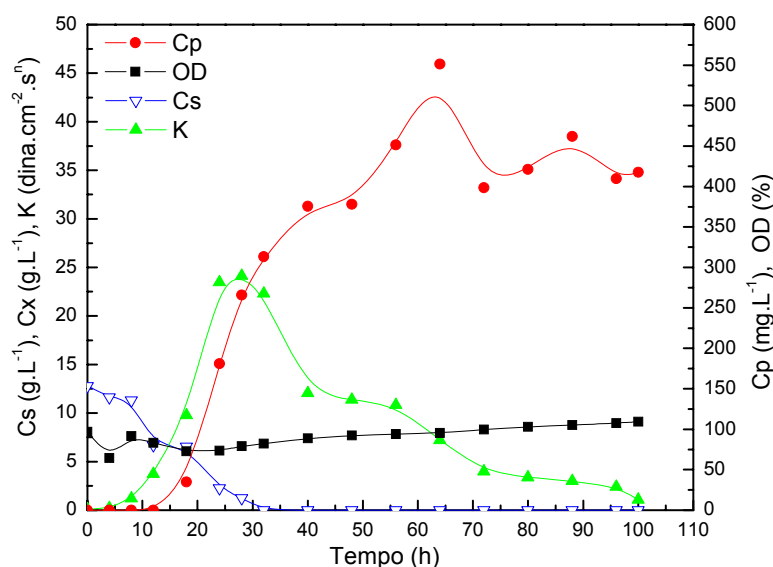


Figura 4.23: Perfis de concentração relativos ao cultivo padrão (B6) em batelada para a produção de AC, sem adição de ornitina.

Observou-se que a concentração do substrato glicerol decresceu com o tempo, esgotando-se em 30 horas de cultivo. O oxigênio dissolvido (OD) permaneceu num patamar durante todo o cultivo, e os valores acima de 100% se deram por falhas na calibração do eletrodo. O índice de consistência (K) atingiu valores em torno de 25 dina.cm⁻²sⁿ em 24 horas

de cultivo, indicando um crescimento exponencial do microrganismo nesta fase. A concentração celular (Cx) analisada por massa seca (não mostrada no gráfico) serviu apenas para acompanhamento da viabilidade celular durante o cultivo, já que o meio é composto de muitos sólidos em suspensão. A concentração de AC (Cp) máxima foi cerca de $0,55 \text{ g.L}^{-1}$, sendo esta a maior atingida neste trabalho para cultivos em batelada sem a adição de ornitina.

Embora o trabalho de variação de escala em biorreatores convencionais de bancada não seja um trabalho corriqueiro encontrado em literatura, em virtude do alto custo dos equipamentos e dos meios utilizados, seu estudo se faz de grande importância, principalmente quando tratamos de processos biotecnológicos de uso industrial, já que os passos seguintes ao aumento de escala no laboratório visam a produção em larga escala.

Assim, como finalização desta tese de doutorado optou-se para a realização de dois experimentos em escala de 10 L com as melhores condições levantadas até o presente momento. Os experimentos foram realizados com a melhor vazão de alimentação ($F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$), a melhor concentração de glicerol no meio suplementar $C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$, determinadas no item 4.2 deste trabalho. No cultivo BA10 utilizou-se a concentração de ornitina de $3,70 \text{ g.L}^{-1}$ e no cultivo BA11 a concentração de $5,55 \text{ g.L}^{-1}$. Esta segunda concentração de ornitina de $5,55 \text{ g.L}^{-1}$ foi definida de forma a se fixar para os cultivos com a concentração de 180 g.L^{-1} de glicerol, a relação de concentração de glicerol e ornitina (C_{s_e}/C_{orn_e}) de $120/3,7$ que gerou os melhores resultados em termos de produtividade em AC (cultivo BA5). A Figura 4.24 mostra a concentração de glicerol (Cs) e do índice de consistência (K) ao longo do tempo, para os cultivos em biorreator de 10L.

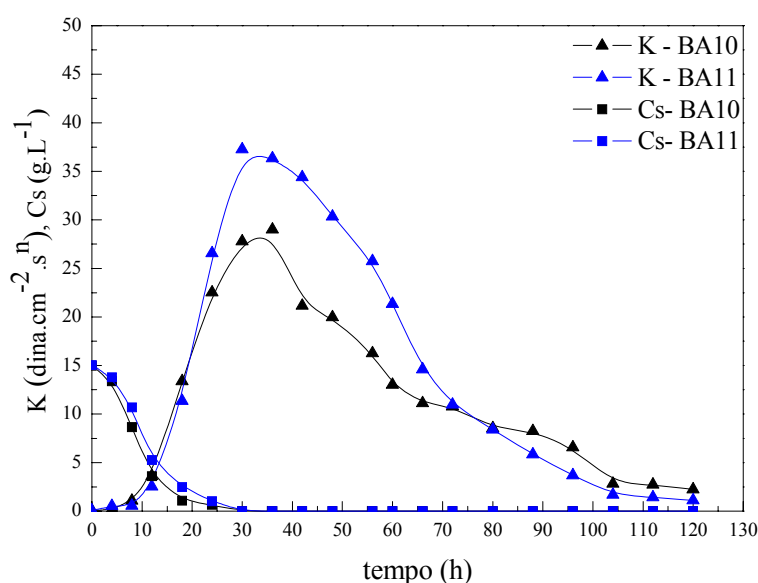


Figura 4.24: Perfis de concentração de glicerol (Cs) e do índice de consistência (K) ao longo dos cultivos em batelada alimentada com $C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$ e $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$: BA10 ($C_{om_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$) e BA11 ($C_{om_e}=5,55 \text{ g.L}^{-1}$)

Nota-se que a concentração de glicerol (Cs) nos dois cultivos atinge valores próximos à zero já em 24 horas e que depois desse tempo, quando se inicia a etapa de alimentação, não há acúmulo de glicerol no meio. O índice de consistência (K) cresceu exponencialmente até 24 horas, depois disso apresentou um decréscimo acentuado, terminando o cultivo em valores próximos a zero. O valor máximo de K foi um pouco superior no cultivo BA11 ($C_{om_e}=5,55 \text{ g.L}^{-1}$), cerca de $35 \text{ dina.cm}^{-2} \cdot \text{s}^n$. Contudo este acréscimo não se reverteu num aumento da concentração de AC. A Figura 4.25 apresenta os perfis de concentração de AC (Cp) e produtividade volumétrica (Pp) para os cultivos BA10 ($C_{om_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$) e BA11 ($C_{om_e}=5,55 \text{ g.L}^{-1}$).

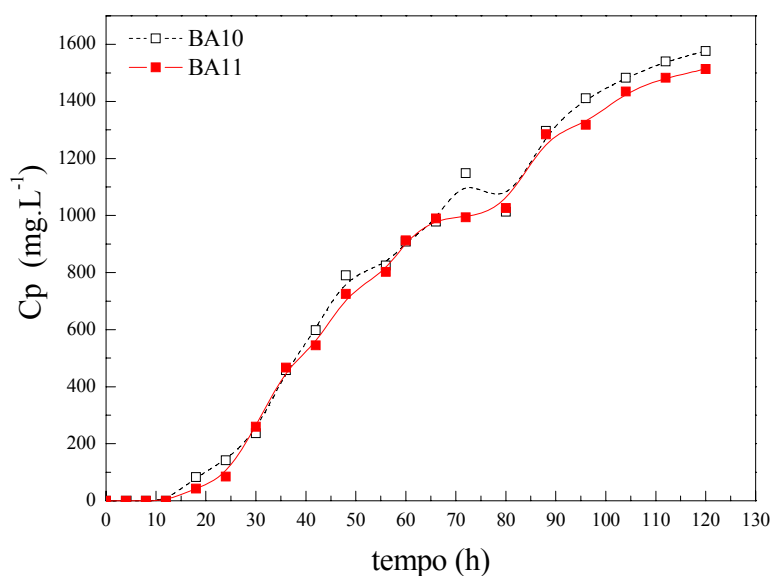


Figura 4.25: Perfis de concentração de AC (Cp) e de produtividade volumétrica (Pp) ao longo dos cultivos em batelada alimentada com $C_{s_e}=180 \text{ g.L}^{-1}$ e $F=0,01 \text{ L.h}^{-1}$: BA10 ($C_{om_e}=3,70 \text{ g.L}^{-1}$) e BA11 ($C_{om_e}=5,55 \text{ g.L}^{-1}$)

Podemos observar que os perfis de concentração de AC (Cp) e de produtividade volumétrica (Pp) para os cultivos BA10 ($Corn_e=3,70 \text{ g.L}^{-1}$) e BA11 ($Corn_e=5,55 \text{ g.L}^{-1}$) foram similares, mostrando uma ligeira superioridade do cultivo BA10. A concentração máxima de AC foi $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ com tendência de aumento após 120 horas, é a maior reportada em literatura para cultivos com *S. clavuligerus* selvagem. Salienta-se que Nabais *et al.* (2000) reportam em sua patente um mesmo valor de produção máxima, no entanto a produtividade obtida no presente trabalho de $16,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ é muito superior à obtida por esses autores. A produtividade máxima em torno de $16,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, também foi alta se comparando com a literatura. Mayer e Deckwer (1996) cultivaram o *Streptomyces clavuligerus* DMS 738, em biorreator de 10 L para o estudo da produção e decomposição simultânea do AC. A concentração máxima de AC atingida em cultivos em batelada alimentada foi de 520 mg.L^{-1} em 90 horas, utilizando o meio com farinha de soja. Esta produção resulta numa produtividade máxima de $5,55 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, cerca de 3 vezes menor que a alcançada no presente trabalho.

Cabe aqui ressaltar que este é o único trabalho na área onde se mostrou o aumento de escala do biorreator convencional de bancada, embora modesta, para cultivos com *S. clavuligerus* selvagem visando à produção de AC.

Conclui-se então que a presença de ornitina na alimentação na faixa de concentração de 3,7 a $5,55 \text{ g.L}^{-1}$ ($Corn_e$) mostrou-se uma combinação positiva do efeito da ornitina e do glicerol na biossíntese de AC, mesmo com mudança de escala, e que esta mudança favoreceu inclusive um aumento na produção máxima de AC.

4.6. Considerações Finais

Em virtude dos vários problemas enfrentados no que diz respeito à estabilidade da linhagem de *Streptomyces clavuligerus*, este trabalho sofreu um atraso de aproximadamente 1 ano em sua parte experimental. Este atraso não impediu que avanços no tema proposto fossem alcançados, porém contribuiu na quantidade limitada de experimentos realizados.

Sabemos que uma quantidade maior de experimentos ou até mesmo um planejamento experimental garantiria um estudo mais abrangente que contribuiria muito mais para elucidação de questões relacionadas com a produção de AC. Porém, durante toda esta

tese de doutorado o maior problema enfrentado foi justamente garantir que o lote de microrganismo utilizado numa etapa apresentasse resultados que pudessem ser comparados aos das etapas subseqüentes.

Após vários problemas na conservação e preservação do *Streptomyces clavuligerus*, e das inúmeras tentativas de se solucionar estes, podemos afirmar que a melhor alternativa para a confecção do estoque de trabalho se deu quando criotubo (3,5 mL) foi inoculado em 200 mL de meio sólido contido em um Erlenmeyer de 1 L. Após o tempo de pausa os esporos foram transferidos por raspagem para o meio de cultura de Reading e Cole (1977) modificado (45 mL) de modo que a suspensão de esporos tivesse pelo menos 10^8 esporos. Após 24 horas de incubação em mesa rotativa a 250 rpm e 30°C, a suspensão em forma de solução com 20% p/v de glicerol foi distribuída nos criotubos (3,5 mL) formando o novo estoque de trabalho.

A Tabela 4.4 apresenta os estoques de trabalho preparados e os problemas enfrentados com as freqüentes perdas de estabilidade da linhagem produtora ocorridas durante todo este trabalho.

Tabela 4.4: Cronograma resumido da conservação e preservação do microrganismo *S. clavuligerus* ATCC 27064 após a etapa de liofilização.

DATA		MODO DE PRESERVAÇÃO	PROBLEMAS ENFRENTADOS
Confecção dos criotubos	Deteção de problemas		
24/11/2004	27/02/2005	Criotubos (CV* - 2etapas**/20%gli***)	-Contaminações sucessivas - perda da produtividade
24/11/2004	30/04/2005	Criotubos (CV - 2etapas/20%gli)	- perda da produtividade
20/06/2005	20/08/2005	Criotubos (CV - 2etapas/20%gli)	-falta de viabilidade (não há crescimento)
18/10/2005	23/01/2006	Criotubos (CV - 1etapa/20%gli)	- perda da produtividade
19/10/2005	23/01/2006	Criotubos (CV- 2etapas/30%gli)	-falta de viabilidade (não há crescimento)
19/10/2005	23/01/2006	Criotubos (CV - 2etapas/10%gli)	- perda da produtividade
03/02/2006	12/02/2006	Criotubos (CV - 2etapas/20%gli)	- coloração diferente - adição de HCl (24hs)
03/03/2006	28/03/2006	Criotubos (CV e ES - 1etapa/20%gli)	-falta de viabilidade (não há crescimento)
24/03/2006	05/10/2006	Criotubos (CV - 1etapa/20%gli)	- perda da produtividade
20/12/2006	10/01/2007	Criotubos (CV - 1etapa/20%gli)	- perda da produtividade
31/01/2007	01/02/2007	Criotubos (CV - 1etapa/20%gli)	- perda da produtividade
14/03/2007	27/04/2007	Criotubos (CV - 1etapa/20%gli)	- perda da produtividade
28/04/2007	21/05/2007	Criotubos (CV- 1etapa/20%gli) Slants	-alta produtividade
21/05/2007	17/09/07	Criotubos (CV- 1etapa/20%gli) Screening: SC3, SC4 e SC6	- alta produtividade

*CV: célula vegetativa;
**1etapa/2etapa: etapas de reativação do liofilizado
*** %gli: % de glicerol na solução crioprotetora

5. CONCLUSÕES

Neste capítulo, estão apresentadas as conclusões pertinentes aos diferentes estudos desenvolvidos ao longo deste trabalho.

- A adição de ornitina ao meio de cultura gerou aumentos na produtividade volumétrica em AC, mas não na produção máxima de AC, tanto nos cultivos em batelada e como nos realizados em batelada alimentada;
- A ornitina mesmo adicionada em baixas concentrações influenciou positivamente a biossíntese do AC;
- Os experimentos realizados em batelada alimentada se mostraram como uma melhor opção de operação em relação aos realizados em batelada para cultivos com *S. clavuligerus* utilizando meio complexo, visando à produção de AC;
- O modelo cinético proposto se ajustou adequadamente aos resultados experimentais do ensaio padrão em batelada, bem como teve grande utilidade na definição da estratégia de alimentação nos cultivos em batelada alimentada, com baixos valores de F e altos de C_{Se} , que levaram ao pronunciado aumento na produção de AC;
- A adição de glicerol em altas concentrações não favoreceu a produção de AC, pois este causa efeitos inibitórios ou até repressivos na biossíntese do produto;
- A condição de operação ótima obtida neste trabalho para cultivos em batelada alimentada em biorreator de 5 L gerou os maiores resultados em termos de produção de AC em relação a trabalhos recentes de literatura;
- Os resultados de maior produção e produtividade alcançados em biorreator de 5 L foram validados em biorreator de 10 L;
- A estabilidade da linhagem utilizada no desenvolvimento de pesquisas científicas é de primordial importância para o adequado andamento do trabalho.

6. SUGESTÕES

Como continuidade desse trabalho, propõe-se:

- a validação em biorreator de 10 L de outras condições de cultivo em batelada alimentada;
- a implementação de técnicas mais apuradas para a preservação/conservação de linhagens comprovadamente produtoras;
- Cultivos em batelada alimentada com os meios ricos em lipídios propostos por Maranesi *et al* (2005) e Ortiz *et al.* (2007);
- Testar as condições ótimas obtidas no presente trabalho, em termos de concentração de ornitina, em cultivos em batelada alimentada substituindo glicerol por lipídio como substrato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badino, A.C., Facciotti, M.C.R., Schmidell, W., (1999); Estimation of the rheology of glucoamylase fermentation broth from the biomass concentration and shear conditions. *Biotechnology Tech.* 13, 723–726.
- Bailey, J. E.; Ollis, D. F. (1986); *Biochemical Engineering*, New York, MacGraw Hill, cap. 8.
- Bains, W. (1993); *Biotechnology from A to Z*, New York, Oxford University Press.
- Baggaley, K. H.; Brown, A. G.; Schofield, C. J. (1997); Chemistry and Biosynthesis of Clavulanic Acid and Other Clavams, *Nat. Prod. Rep.*, 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.
- Baptista-Neto, A., Teodoro, J.C., Cassiano Filho, L.C.M., Badino, A.C., Hokka, C.O., (2005). Comparison between continuous and batch processing to produce clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 97–104.
- Braña, A. F.; Hu, W-S; Demain, A.L. (1983); Involvement of Aeration in Carbon Source Regulation of Cephem Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, *Biotechnology Letters*, v.5, n.12, p. 791-794.
- Brown, A.G.; Butterworth, D.; Cole, M.; Hanscomb; G.; Hood, J.D.; Reading, C.; Rolinson, G.N. (1976); Naturally occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity, *Journal Antibiotic.*, v. 29, p. 668-669.
- Betlem, Ben H. L.; Mulder, Pieter; Roffel, Brian (2002); Optimal mode of operation for biomass production, *Chemical Engineering Science*, v. 57, p. 2799-2809.
- Bird, A. E.; Bellis, J. M.; Gasson, B. C. (1982); Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole, *Analyst*, v.107, p. 1241-1245.
- Bushell, M. E. (1988); *Actinomycetes in Biotechnology*, New York, ed. Academic Press, c. 5.
- Bushell, M. E.; Kirk, S.; Zhao, Hong-Juan, Avignone-Rossa, C. A. (2006); Manipulation of the physiology of clavulanic acid biosynthesis with the aid of metabolic flux analysis, *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p. 149-157.
- Butterworth, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, edited by E.J. Vandamme, New York, Marcel Decker, Inc., p.3-31, 1984.
- Buynak, J. D. (2006); Understanding the longevity of the β -lactam antibiotics and of antibiotic/ β -lactamase inhibitor combinations, *Biochemical Pharmacology*, v.71, p. 930-940.
- Cassiano, L. C.I. M.; Baptista Neto, A.; Badino, A.C. (2003). Avaliação do Desempenho de Biorreator Airlift para a Produção de Ácido Clavulânico. In: XIV Simpósio Nacional de

- Fermentações, Florianópolis - SC. Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações, p. 1-7.
- Calleri, E.; Temporini, C.; Massolini, G.; Cacciolanza, G., (2004); Penicillin G Acylase-Based Statinary Phases: Analytical Applications, *Journal of Pharmaceutival and Biomedical Analys*, v. 35, p. 243-258.
- Cerri, M. O.; Teodoro, J. C.; Ortiz, S. C. A.; Baptista Neto, A.; Cruz-Hernández, I. L.; Badino, A.C. (2005). Comparação entre biorreator convencional e biorreator airlift de circulação interna para cultivo de *Streptomyces clavuligerus* para produção de ácido clavulânico. In: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Recife. Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, v. T499. p. 1-7.
- Coleman, K.; Athalye, M.; Clancey, A.; Davison, M.; Payne, D.J.; Perry, C.R.; Chopra, I. Bacterial resistance mechanisms as therapeutic targets. *J. Antimicrob. Chemother.*, 33(6), 1091-1116, 1994.
- Chen, K.; Lin, Y.; Tsai, C.; Hsieh, C.; Houng, J. (2002), Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*, *Biotechnology Letters*, v. 24, p.455-458.
- Chen, K.; Lin, Y.; Tsai, C.; Hsieh, C.; Houng, J. (2003), Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding, *Enzyme and Microbial Technology*, v.32, p. 152-156.
- Demain, A.L., Elander, R.P. (1999); The β -lactam antibiotic: past, present and future, *Antonie van Leeuwenhoek*, v.75, p. 5-19.
- Elander, R.P. (2003); Industrial production of β -lactam antibiotics, *Appl. Microbiol Biotetechonol*, v.61, p. 385-392.
- Essack, S. Y. (2001); The development of β -lactam antibiotics in response to the evolution of β -lactamases, *Pharmaceutical Research*, vol. 18, n 10, 1391-1399.
- Foulstone, M., Reading, C. (1982). Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of Augmentin, in biological fluids with HPLC. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22, 753–762.
- Gouveia E. R., Baptista-Neto A., Azevedo A.G., Badino-Jr, A. C., Hokka, C. O.; Improvement of Calvulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus* in Medium Containing Soybean Derivates, *World Journal Microbial Biotechnology*, v.15, p.623-627, 1999.
- Gombert, A. K., Nielsen, J. (2000); Mathematical modeling of metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, p. 180-186.
- Gresser, U. (2001); Amoxicillin-Clavulanic Acid therapy maybe associated with severe side effects –Review of the literature, *Eur. J. Med. Res.*, v.4, p.139-149.
- Guteman, A.L.; Ribon, V. and Boltanski, A.(1985), Incorporation of hydroxypropionate into the beta-lactam residue of clavulanic acid, *Journal of the Chemical Socyiet, 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 β -lactam-Based Prodrugs, *Bioorganic & Medical Chemistry*, v.10, p. 3489-3498.
- Henrikson, R.L., Meredith, S.C. (1984). Amino acid analysis by reverse phase highperformance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylthiocyanate. *Analytical Biochemistry*, 13:65-72.
- Hirata, D. B.; Badino, A.C.; Hokka, C. O. (2005) . Utilization of PEG-phosphate aqueous two-phase system for clavulanic acid extraction from cultivation medium. In: 2nd Mercosul Congress of Chemical Engineering, Rio de Janeiro. Proceedings of 2nd Mercosul Congress of Chemical Engineering, v. T212. p. 1-6.
- Ives P. R., Bushell ME (1997). Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* *Microbiology* 143:3573-9.
- Jensen, S. E, Paradkar, A. S. (1999); Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid, *Antonie van Leeuwenhoek*, n. 75, p. 125-133.
- Jensen, S. E., Wong, A., Griffin, A., Barton, B. (2004); *Streptomyces clavuligerus* has a second copy of the proclavaminic amidinohydrolase gene, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 514-520.
- Kayene, K. S., Glold, H. S., Schwaber, M. J., et al. (2004); Variety of β -lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant *E. coli* isolated in northeastern U.S, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 1520-1525.
- 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.
- Kirk S., Avogmpme-Rossa CA, Bushell ME. (2000), Growth limiting substrates affects antibiotic production and associated metabolic fluxes in *Streptomyces clavuligerus* *Biotechnology Letters* 22:318-25.
- Kranjc S., Racman A. (1997) Process for the preparation of clavulanic acid. Patent Number WO09739137.
- Large, K. P.; Ison, A. P.; Williams, D. J. (1998), The effect of agitation rate on lipid utilization and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, *Journal of Biotechnology*, v. 63, p. 111-119.
- Lebrihi A.; Germain P.; Lefebvre G. (1987), Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* v.26, p.130-135.
- Liras, P.; Rodriguez-Garcia, A. (2000), Clavulanic acid, a β -lactam inhibitor: biosynthesis and molecular genetics, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.54, p. 467-475.

- MacGowan, S. J.; Bycroft, B. W.; Salmond, P. C. (1998); Bacterial production of carbapenems and clavans: evolution of beta-lactam antibiotic pathways, *Trends in Microbiology*, v.6, N.5, p.203-208.
- Maranesi, G. L.; Baptista Neto, A.; Hokka, C. O.; Badino, A.C. (2005); Utilisation of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Springer - The Netherlands, v. 21, n. 4, p. 509-514.
- 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, Patent Number WO0005397.
- Neves, A.A., Pereira, D.A., Vieira, L.M., Menezes, J.C. (2000). Real time monitoring biomass concentration in *Streptomyces clavuligerus* cultivations with industrial media using a capacitance probe. *J. Biotechnol.* 84, 45–52.
- Neu, Harold, Gootz, T. D. (1999); *Antimicrobial Chemotherapy*, chapter 11, p. 1-25. <http://129.109.136.65/microbook/ch011.htm>.
- Ortiz, S.C.A., Hokka, C.O., Badino, A.C. (2007); Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Enz. Microbiol. Technol.* 40, 1071-1077.
- Peréz-Redondo, R., Rodriguez-Garcia, A., Martin, J. F., Liras, P. (1999); Deletion of the *pyc* gene blocks clavulanic acid biosynthesis except in glycerol-containing medium: evidence for two different genes in formation of the C3 unit, *Journal Bacteriol.*, v. 181, p.6922-6928.
- Petzold, L. (1989); Differential algebraic system solver (DDASSL) subroutine. Computing and Mathematics Research Division, *Lawrence Livermore National Laboratory*, Livermore, California.
- Piret, J. M., Demain, A. L., (1988); *Actinomycetes in Biotechnology*, New York, ed. Academic Press, c. 11.
- Pitlik, J. and Townsend, C. A. (1997), The fate of [2,2,3-²H₃,1,2-¹³C₂]-D,L-glycerate in clavulanic acid biosynthesis, *Chemical Communication*, N.2, p.225-226.
- Pinto, J. C., Lage, P. L. C. (2001); Métodos numéricos em problemas de Engenharia Química, e-papers.
- 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. (1984); 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 O₂ na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, *Dissertação de Mestrado*, PPG-EQ-UFSCar, São Carlos-SP.
- Rosa, J. C.; Baptista Neto, A.; Hokka, C.O.; Badino, A.C. (2005), influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioprocess and Biosystems Eng.*, v. 27, p. 99-104.
- Roubos, J.A.; Krabben, P.;Luiten, R. G. M.; Verbruggen, H. B.; Heijnen, J. J. (2001), A Quantitative Approach to Characterizing Cell Lyses Caused by Agitation of *Streptomyces clavuligerus*, *Biotechnology Progress*, v.17, n 2, p. 336-347.
- Sánchez L.; Braña A.F., Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* 142 (1996) 1209-1220.
- Sanders, C.C., Sanders, W.E. (1979). Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin-inducible β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 792–797.
- Saudagar, P.S., Singhal, R.S. (2007). Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Biores. Technol.* 98, 2010-2017.
- Spratt, B.G. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science.* 264, 388-393.
- Silva, F. H. ; Jesus, C. D. F.; Cruz, A. J. G. ; Badino, A.C., (2005); AnaBio 2.0: um programa para estimativa de parâmetros cinéticos e análise de biorreatores. In: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Recife. *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, v. T364. p. 1-7.
- Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (2001), *Biotecnologia industrial*, Ed. Edgard Blücher Ltda, v. 2, p. 205-216.
- Teodoro, J. C. (2004); Influência das condições de alimentação do meio suplementar na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em batelada alimentada, *Dissertação de Mestrado*, PPG-EQ-UFSCar, São Carlos.
- Teodoro, J. C.; Baptista Neto, A.; Pasotto, M. B.; Hokka, C. O.; Badino, A.C. (2005). Modelagem e simulação do processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em batelada alimentada. In: 9th International Chemical Engineering Conference, Coimbra - Portugal. *Proceedings of 9th International Chemical Engineering Conference*, v. 1. p. 1-6.
- Teodoro, J. C.; Baptista-Neto, A., Cruz-Hernandez, I. L., Hokka, C. O., Badino, A. C. (2006a); Influence of feeding conditions on clavuanic acid production in fed-batch

- cultivation with medium contain glycerol, *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 72, n. 3, p. 450-455.
- Teodoro, J. C.; Baptista Neto, A.; Cerri, M. O.; Ortiz, S. C. A.; Hokka, C. O.; Badino, A.C. (2006b). Modeling of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in fed-batch cultivation with glycerol and ornithine feeding. In: XXII Congreso Interamericano de Ingeniería Química, Buenos Aires - Argentina. Proceedings of XXII Congreso Interamericano de Ingeniería Química, v. 13a236. p. 1-18.
- 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.
- Valentine, B. P.; Bailey, C. R.; Doherty, A., morris, J., Elson, S. W., Baggaley, K. H. (1993); Evidence that arginine is a later metabolic intermediate than ornithine in biosynthesis of clavunanic acid by *Streptomyces clavuligerus*, *Journal Chem. Soc. Chem. Commum*, v. 15, p. 1210-1.
- Wang, Yong-Hua; Yang, Bo; Ren, Jie; Dong, Mei-Ling; Liang, Dong; Xu, An-Long (2005); Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*, *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1161-1166.
- Yamaoka, K., Watanabe, K., Muto, Y., Katoh, N., Ueno, K, and Francis P. Tally, F.P., (1990); R-Plasmid mediated transfer of β -lactam resistance in *Bacteroides Fragilis*, *The Journal of Antibiotics*, V. 43, n. 10, p. 1302-1306.

ANEXO1: Características da proteína isolada de soja

A proteína isolada de soja é praticamente livre de carboidratos e gordura, tendo 92% de proteína em peso seco.

Tabela 1: Composição dos aminoácidos presentes na proteína isolada de soja

Aminoácidos	Quantidade (g/100 g_{proteína})*
Alanina	7,2
Arginina	8,0
Ácido Aspártico	12,1
Cistina	1,4
Ácido Glutâmico	20,4
Glicina	4,2
Histidina	2,7
Isoleucina	4,3
Leucina	7,8
Lisina	6,5
Metionina	1,4
Fenilalanina	5,4
Prolina	5,3
Serina	5,7
Treonina	3,6
Triptofano	1,0
Tirosina	4,1
Valina	4,7
**Obtidas em banco de dados (The Solae Company)	

ANEXO 2: Artigo submetido ao Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology em fevereiro de 2008.

The influence of glycerol and ornithine feeding on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*

J.C. Teodoro, A. Baptista Neto, C.O. Hokka and A.C. Badino*

Department of Chemical Engineering
Federal University of S. Carlos
P.O. Box 676
CEP 13565-905
S. Carlos, SP
Brazil

*Communicating author: badinojr@ufscar.br

Tel. + 55 16 33518001

Fax + 55 16 33518266

Abstract

This paper reports the influence of glycerol and ornithine feeding on the clavulanic acid (CA) production by *Streptomyces clavuligerus* in batch and fed-batch cultivations. In batch experiments under different concentrations of ornithine, the maximum concentration of CA was between 460 and 560 mg.L⁻¹. Nevertheless, the maximum value of volumetric productivity in CA ($P_{p_{max}}=13.7$ mg.L⁻¹.h⁻¹) was obtained in the experiment with ornithine concentration of 0.66 g.L⁻¹, a value that is 40% higher than the $P_{p_{max}}$ obtained in run control without ornithine. In fed-batch experiments, with different ornithine feeding conditions, the maximum concentration of CA varied within the limited range of 1.254 and 1.405 g.L⁻¹. Therefore, it can be concluded that the presence of ornithine increases the $P_{p_{max}}$ in CA but not its maximum concentration. With respect to the influence of glycerol in the presence of ornithine at the concentration of 3.7 g.L⁻¹ in feeding medium, the maximum CA concentration of 1.506 g.L⁻¹ was obtained in the run FB8 showing a positive effect of ornithine and glycerol in the biosynthesis of CA.

Keywords: clavulanic acid, *Streptomyces clavuligerus*, glycerol, ornithine, fed-batch.

1. Introduction

Over the past three decades, many potent β -lactam antibiotics other than penicillins, such as cepheems, monobactams, and carbapenems, have been developed and have currently been utilized to treat a wide range of bacterial infections. Although antibiotics have been effective in the treatment of infections, resistance is an inevitable consequence of selective pressures imposed by the widespread use and misuse of antibiotics [14,16]. One of the most important resistance mechanisms exhibited by a variety of gram-positive and gram-negative bacteria is their ability to produce β -lactamases, enzymes which deactivate penicillins and cephalosporins by hydrolyzing their β -lactam ring.

Clavulanic acid (CA) is a potent inhibitor of β -lactamases, and its combination with amoxicillin is the most successful example of the use of a β -lactam antibiotic sensitive to β -lactamase together with an inhibitor of these enzymes [9]. The amoxicillin/clavulanate combination represents a broad-spectrum antibacterial agent which has been widely used for over 20 years [4].

CA is traditionally produced by *Streptomyces clavuligerus* using a complex culture media containing soybean derivatives and glycerol as nitrogen, carbon and energy sources, respectively [5, 6, 9,

11, 17, 20].

Many authors have pointed out that glycerol plays an important role in the CA production as the C3 precursor of the molecule [5,12]. However, both authors observed, through shake flasks experiments, that the biosynthesis of CA in batch cultivations was inhibited by glycerol above 15 g.L^{-1} . Several studies regarding the effect of the glycerol feeding on the CA production have been reported in the literature. The influence of different feeding procedures on the CA production by *S. clavuligerus* in fed-batch cultures was investigated [9]. The highest production was obtained with a culture medium containing soy meal, peptone, and glycerol. The fed-batch operation startup occurred when the glycerol concentration decreased to 2.0 g.L^{-1} . The effect of the glycerol feeding on the CA production, in fed-batch culture, was also studied [5] in a 5-L stirred tank fermenter. Soy meal extract and peptone were utilized as soluble nitrogen sources. The Fed-batch operation started 24 h after inoculation by using a glycerol feeding solution continuously at 10.0 mL.h^{-1} flow rate for 108 h. The CA production reached 250 mg.L^{-1} (80 h) and continued to increase up to 280 mg.L^{-1} remaining at this level for up to 130 h. In a recent work [8] investigated the influences of the volumetric flow (F) rate and

glycerol concentration in the complex feed medium (C_{SF}) on the CA production in fed-batch cultivations. The best experimental conditions for the CA production found were $F=0.01 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ and $C_{SF}=120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Under these conditions the maximum CA production was practically twice higher than the obtained in batch cultivation.

When fermentation is involved in the formation of products, any substrate essential for production may be added to the medium to improve the yield of products. Fed-batch fermentation is an approach aimed at efficiently carrying out fermentation for the production of biomolecules. The fed-batch strategies have been considered as means of controlling the growth rate, prolonging the stationary phase, and overcoming substrate inhibition and metabolite repression. Industrial fermentation of most amino acids is accomplished with this method [15].

Amino acids have important regulatory roles in the nitrogen metabolism of *Streptomyces sp* and are also precursors of a number of antibiotics including clavulanic acid and cephamycin C by *S. clavuligerus*, in particular [3]. The influence of amino acids on the CA production was studied [18] and concluded that ornithine and arginine, amino acids in the urea cycle, were better utilized than other

amino acids. The CA production enhancement by *S. clavuligerus* with glycerol and ornithine feeding in shake flasks containing 100 mL of the production medium was reported [6]. Fed-batch cultivations were started 60 h after inoculation. Two mL of a solution of glycerol ($250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and ornithine ($16,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) was fed every 12 hours for over a period of 100 h. The maximum CA concentration of $311 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was obtained which means a 2.7-fold increase if compared to that obtained in batch cultivation. The optimization of the medium composition for CA production in shake flasks was studied [20]. Their optimal concentrations were (in $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): glycerol (15.0), soybean flour ($38.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), KH_2PO_4 (0.1), $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2), $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.395) and ornithine ($1.177 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), respectively. The production of CA achieved the concentration of $681 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ under optimal conditions, which means an increase of 50% if compared to the original medium. Recently, the effect of glycerol and amino acids feeding on the CA production in shake flask cultures was investigated [15]. Batch experiments were performed to find the optimized medium for the CA production. The maximum CA production of $878 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was obtained with a synthetic medium whose composition was similar to that designed by Gouveia et al [8]. Glycerol feeding was performed in fed-batch experiments starting at 60 h of cultivation

adding 2 mL of glycerol solution (100 g.L^{-1}) every 12 hours. The maximum CA production, about two folds higher than those obtained in batch, was reached when 2 mL of a solution of threonine (1.0 M) was added every 12h after 60 h of cultivation.

The literature reports several works emphasizing the important role of the glycerol and amino acids feeding on the CA production process, maintaining cellular growth and increasing the formation of CA in the idiophase whether in batch or fed-batch cultures. However, these studies were all performed in shake flasks under the condition of oxygen limitation and, furthermore, the consumption of amino acids during the process has not been evaluated. So far, there are no reports in the literature dealing with the effect of ornithine and glycerol on the CA production in bioreactors under proper oxygen supply.

Hence, the objective of the present study was to evaluate the simultaneous influence of glycerol and ornithine feeding conditions on the CA production in submerged culture of *S. clavuligerus* in both batch and fed-batch cultivations in a bench scale bioreactor under no oxygen limitation conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganism

Streptomyces clavuligerus ATCC 27064, used throughout this work, was stored as vegetative cells (5.0 g.L^{-1} dry weight) at -70°C in cryotubes utilizing glycerol 20% w/v.

2.2. Culture media and experimental conditions

The seed medium proposed [15] contained (in g.L^{-1} distilled water): glycerol, 15.0; bacto peptone, 10.0; malt extract, 10.0; yeast extract, 1.0; K_2HPO_4 , 2.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.75; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001; 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) buffer, 21 (100 mM) and pH 6.8.

The inoculum medium proposed [8] contained (in g.L^{-1} distilled water): glycerol, 15.0; isolate protein of soybean (containing about 15% w/v of total nitrogen), 20.0; K_2HPO_4 , 0.8; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.75; salt solution 1.0 g.L^{-1} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001; 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) buffer, 21 (100 mM) and pH 6.8. Under the conditions of the medium preparation, the isolate protein of soybean was not completely soluble.

The production medium had almost the same composition as the inoculum medium except that no MOPS buffer was used and

silicone antifoam (0.1 mL.L^{-1}) and soybean oil (1.0 g.L^{-1}) were added.

The influence of ornithine on the CA production was firstly evaluated in four batch cultivations with different ornithine concentrations, namely, B1=0.0, B2=0.66, B3=0.99 and B4=1.32 g.L^{-1} . The run performed without ornithine (B1) was considered as the control. The range of ornithine concentration utilized in the production culture media of batch cultivations was based on recent works that investigated the influence of ornithine on the CA production in shake flasks [6, 20]. The influence of ornithine on the CA production was also evaluated in fed-batch experiments. The range of ornithine concentration in the feed medium was defined based on the molar ratio between ornithine and glycerol, 1:21.7 as proposed by Chen et al [6] and based on the ratio between the molar uptake rates of ornithine and glycerol observed in the batch cultivations. Therefore, three molar ratios between ornithine and glycerol of 1:10, 1:20 and 1:30 were chosen to investigate the influence of the ornithine feeding on the CA production. The glycerol concentration (C_{S_F}) of 120.0 g.L^{-1} was fed at volumetric flow rate of (F) of 0.01 L.h^{-1} as proposed [8]. Concerning F, C_s , and molar ratios between ornithine and glycerol, the fed-batch experiments FB1, FB2,

FB3 and FB4, had the following feeding conditions: FB1 ($F=0.01 \text{ L.h}^{-1} - C_{S_F}=120 \text{ g.L}^{-1} - \text{Corn}_F=0.0 \text{ g.L}^{-1}$), FB2 ($F=0.01 \text{ L.h}^{-1} - C_{S_F}=120 \text{ g.L}^{-1} - \text{Corn}_F=11.1 \text{ g.L}^{-1}$), FB3 ($F=0.01 \text{ L.h}^{-1} - C_{S_F}=120 \text{ g.L}^{-1} - \text{Corn}_F=7.4 \text{ g.L}^{-1}$), and FB4 ($F=0.01 \text{ L.h}^{-1} - C_{S_F}=120 \text{ g.L}^{-1} - \text{Corn}_F=3.7 \text{ g.L}^{-1}$).

The influence of the global composition of the feed medium on the CA production was then evaluated by comparing the results obtained in two simultaneous fed-batch cultivations (FB5 and FB6) performed at $C_{S_F}=20.0 \text{ g.L}^{-1}$, $F=0.01 \text{ L.h}^{-1}$ and $\text{Corn}_F=3.7 \text{ g.L}^{-1}$. In the FB5 cultivation, the feed medium had the same composition as the production (main) medium used in the fed-batch FB4. In the FB6, the feed medium contained only glycerol, ornithine, and distilled water.

The influence of glycerol feeding was investigated in four fed-batch experiments carried out at $F=0.01 \text{ L.h}^{-1}$, $\text{Corn}_F=3.7 \text{ g.L}^{-1}$ and at different glycerol concentration (C_{S_F}) in the feeding medium, FB6 ($C_{S_F}=120 \text{ g.L}^{-1}$), FB7 ($C_{S_F}=150 \text{ g.L}^{-1}$), FB8 ($C_{S_F}=180 \text{ g.L}^{-1}$), and FB9 ($C_{S_F}=240 \text{ g.L}^{-1}$). The feeding media were complemented with distilled water.

The batch and fed-batch cultivations were performed in a Bioflo III fermentor (New Brunswick Sci. Co. Inc., USA) with a 5-L

total volume. All cultivations were conducted at 28°C, 800 rpm, 0.5 vvm, based on a 4-L working volume, and the pH was automatically controlled at 6.8±0.1 by adding a 1 M HCl and/or 2 M NaOH solutions. Cell suspensions from cryotubes (3.5 mL), with concentration of 5 g.L⁻¹ dry weight, were inoculated into 45 mL seed medium in a 500 mL Erlenmeyer flask and incubated in a rotary shaker (New Brunswick Scientific) at 28°C and 250 rpm for 24 hours. Erlenmeyer flasks (500 mL) with 45 mL inoculum medium were inoculated with 5 mL of the cultivated seed broth and incubated in a rotary shaker at 28°C, 250 rpm for 24 hours. The contents of either eight flasks (400 mL) or seven flasks (350 mL) were transferred to the fermentor resulting in initial fermentation volumes of 4.0 or 3.4 L for batch or fed-batch cultivation, respectively.

The fed-batch operation was started 24 hours after inoculation at a volumetric flow rate (F) of 0.01 L.h⁻¹ or dilution rate (D=F/V) varying within the range of 0.0025 and 0.0028 h⁻¹. Samples of 20 mL were withdrawn every 6 h approximately, and 10 mL aliquots were centrifuged at 3.720×g, 5°C for 20 min. Fed-batch cultivations were standardized in such a way that at the end of the process (120 h) the working volume completed 4 L.

2.3. Analytical methods

Cell growth was evaluated indirectly by measuring the broth rheological parameter K (consistency index) of the “power law” model using a Brookfield concentric-cylinder rheometer. The literature has shown that the consistency index (K) is the most appropriate parameter to infer cell growth in broth containing insoluble particles like the case with complex fermentation broths. It can also be related to the morphology of filamentous microorganisms [1,10]. As cultivation proceeded, the amount of insoluble particles in the broth became low and the cell growth could be evaluated as dry matter obtained after centrifugation at 3.720×g for 20 min and drying at 85°C for 12 h.

The glycerol concentration (Cs) was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) calibrated with 25, 50, and 75% (v/v) dilutions of 0.5 g.L⁻¹ glycerol solution. Milli-Q water was used as the mobile phase. The equipment was operated at 80°C with a 1mL.min⁻¹ flow rate. A Shodex KS 802 (Lonpak) column was utilized.

The CA concentration (Cp) was determined by HPLC as described [7]. The CA from the Pharmaceutical product Clavulin (Glaxo-SmithKline Farmacêutica, Rio de Janeiro, Brazil) was used as

the standard. The imidazole derivative of CA was injected into a HPLC unit. The C-18 μ -Bondapack (Waters) column was utilized as the stationary phase, and the mobile phase was composed of 94% KH_2PO_4 0.1 M (pH 3.2) and 6% methanol, v/v. The detection of the CA derivative occurred at 311 nm.

The amino acids ornithine and arginine were determined by HPLC. A Pico-tag (Waters) column was utilized. Standards of amino acids were kindly donated by Ajinomoto Interamericana Ltda (Brazil).

Figure 1 shows the time course of the glycerol (Cs) and consistency index (K) along the batch cultivations. It can be observed that the time course of the glycerol consumption (Cs) and consistency index (K) were similar and this indicates that the presence of ornithine had no effect on cellular growth and carbon source consumption. The consistency index (K), which is an indirect way to represent the cellular concentration, increased exponentially in the first 24h of cultivation but, after the glycerol exhaustion, the K values decreased showing that the microorganism did not make use of other carbon sources to grow.

3. Results and Discussion

3.1. Effect of ornithine concentration on batch cultures

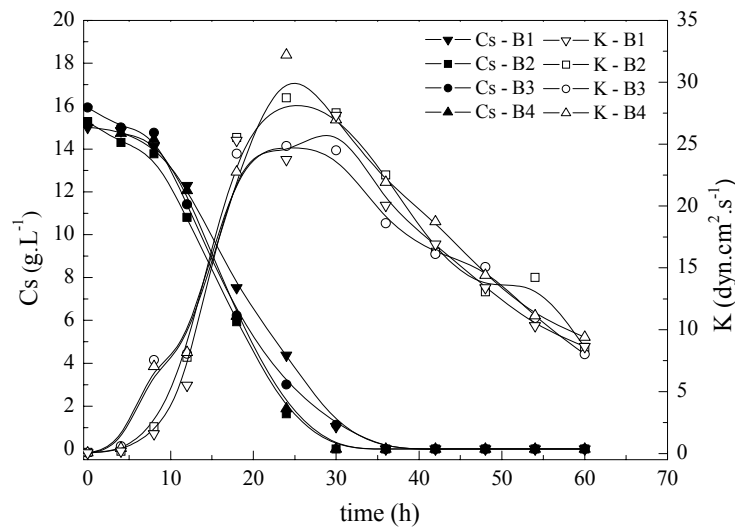


Figure 1. Time course of the glycerol concentration (C_s) and consistency index (K) in batch cultivations: B1 ($C_{orn}=0.00 \text{ g}_{orn} \cdot \text{L}^{-1}$), B2 ($C_{orn}=0.66 \text{ g}_{orn} \cdot \text{L}^{-1}$), B3 ($C_{orn}=0.99 \text{ g}_{orn} \cdot \text{L}^{-1}$), and B4 ($C_{orn} = 1.32 \text{ g}_{orn} \cdot \text{L}^{-1}$)

Figure 2 illustrates the CA concentration (C_p) and the volumetric productivity (P_p) along the batch cultivations. The CA maximum production varied within in a limited range of 460 to 560 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and it was not influenced by the presence of ornithine in the

culture medium. However, the course of the volumetric productivity (P_p) was significantly affected by ornithine concentration. In all cultivations with ornithine, the volumetric productivities were higher than those found in the run control without ornithine (B1). The maximum value of volumetric productivity found in batch B2, with ornithine concentration of $0.66 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P_p=13.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), was 40% higher than the P_p obtained in the control run. It can be observed that the highest production rate occurred when the glycerol was exhausted. These results were different from those obtained [6] in shake flasks. These authors observed that the CA production was nearly twice higher than that obtained without the addition of this amino acid ($115 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) after the addition of ornithine of $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Probably, the different CA productions found in the present work when compared with the work [6] are due to the fact that the cultivations were performed under different conditions of oxygen mass transfer. In other words, under conditions of no oxygen limitation, the presence of ornithine does affect the CA productivity but not the maximum CA production.

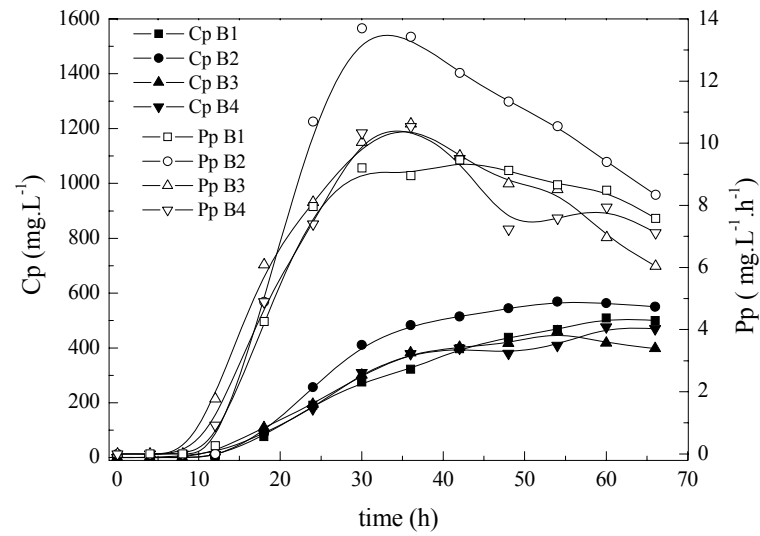


Figure 2. Time course of the CA concentration (Cp) and volumetric productivity (Pp) in batch cultivations with and without ornithine: B1 (Corn=0.00 g.L⁻¹), B2 (Corn=0.66 g.L⁻¹), B3 (Corn=0.99 g.L⁻¹), and B4 (Corn=1.32 g.L⁻¹)

Figure 3 shows the time course of the arginine and ornithine concentrations along the batch cultivations. In all cultivations, ornithine, a non-proteic amino acid, was completely converted into arginine in the first 20 h of cultivation through the urea cycle. On the

other hand, the time course of arginine concentration along the cultivations varied. Although arginine is a nitrogen source, during the ornithine consumption arginine was accumulated in the broth due to the ornithine metabolism during its consumption and by the hydrolysis of the soy protein isolates (SPI) containing about 8% arginine. After the ornithine exhaustion, a change in arginine behavior occurred. In the idiophase, the arginine concentration varied as a function of the hydrolysis of SPI and as the CA precursor. Towards the end of the cultivations, the hydrolysis of soybean protein occurs due to the protease liberation in the broth.

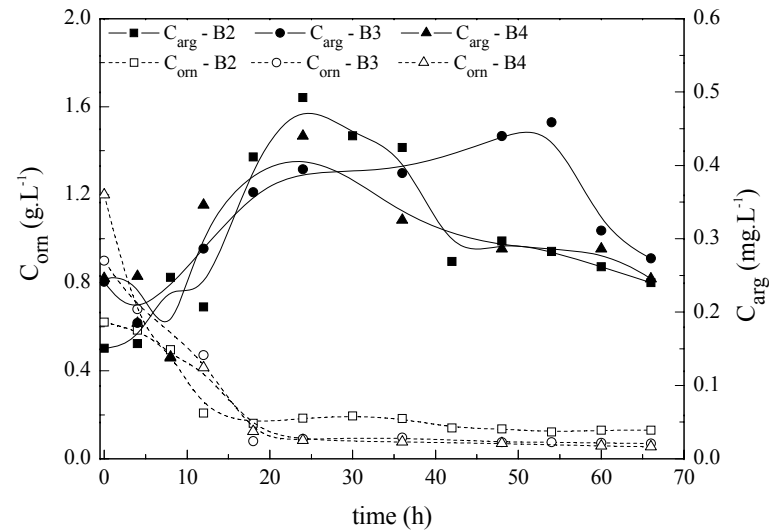


Figure 3. Time course of ornithine and arginine in B2 cultivation ($C_{orn}=0.66 \text{ g.L}^{-1}$), B3 ($C_{orn}=0.99 \text{ g.L}^{-1}$), and B4 ($C_{orn}=1.32 \text{ g.L}^{-1}$)

The authors [6] reported that ornithine and arginine have been considered to be the precursors of clavulanic acid. However, adding arginine initially or intermittently did not enhance the clavulanic acid production. In contrast, the addition of ornithine, either at the beginning or intermittently, revealed a substantial enhancing effect. When ornithine was added, the unusual presence of the urea cycle in

prokaryote provided an abundant supply of arginine, the C_5 precursor to clavulanic acid [19]. They observed that not only it reduced the anaplerotic carbon flux of C_3 to the synthesis of C_5 -amino acid, but also it was required for the removal of ammonia from the cells to avoid toxic intracellular concentration.

3.2. Effect of ornithine feeding on fed-batch cultures

The influence of ornithine on the CA production was evaluated in four fed-batch cultivations with volumetric flow rate of 0.01 L.h^{-1} of the supplementary medium containing 120 g.L^{-1} glycerol and variable ornithine concentration. Four fed-batch cultivations were carried out with the same volumetric flow rate (F), glycerol concentration (C_{sF}), and composition of supplementary medium of cultivation FB1, except for the ornithine concentration in supplementary medium, FB2 ($C_{ornF}=11.10 \text{ g.L}^{-1}$), FB3 ($C_{ornF}=7.40 \text{ g.L}^{-1}$) and FB4 ($C_{ornF}=3.70 \text{ g.L}^{-1}$).

For comparison, Figures 4 and 5 illustrate the values of the consistency index (K), the glycerol consumption (C_s), and the CA production (C_p) along the cultivations, respectively. In fed-batch experiments performed at high levels of ornithine concentration (FB2

and FB3), the K profiles displayed similar behavior with a rapid decrease until very low values were reached at the end of the cultivations. In the fed-batch experiments performed without ornithine (FB1) or with the lowest ornithine concentration (FB4), high levels of K values (above $20 \text{ dyn.cm}^{-2}.\text{s}^n$) were observed during most of the cultivations. However, the high cellular concentrations in FB1 and FB4 did not affect the CA production.

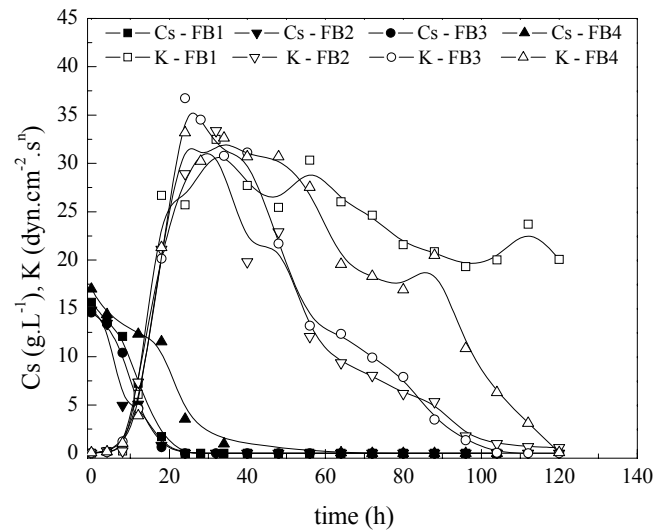


Figure 4. Time course of the consistency index (K) and glycerol concentration (Cs) in batch cultivation (B1) and fed-batch

cultivations FB1 ($\text{Corn}_F=0.00 \text{ g.L}^{-1}$), FB2 ($\text{Corn}_F=11.10 \text{ g.L}^{-1}$), FB3 ($\text{Corn}_F=7.40 \text{ g.L}^{-1}$), and FB4 ($\text{Corn}_F=3.70 \text{ g.L}^{-1}$)

It can be observed in Figure 5 that the maximum production of CA in fed-batch cultivations was nearly three times higher than that obtained in batch cultivation control. Higher CA productivity values were obtained in fed-batch cultivations with ornithine feeding (FB2, FB3 and FB4) than those obtained in the cultivation without the feeding of ornithine (F1).

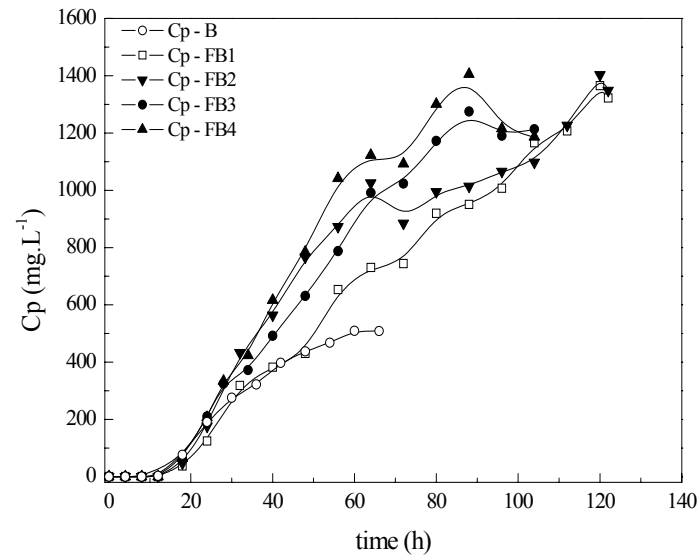


Figure 5. Time course of the CA concentration (C_p) in batch cultivation (B1) and fed-batch cultivations FB1 ($Corn_F=0.00 \text{ g.L}^{-1}$) FB2 ($Corn_F=11.10 \text{ g.L}^{-1}$), FB3 ($Corn_F=7.40 \text{ g.L}^{-1}$), and FB4 ($Corn_F=3.70 \text{ g.L}^{-1}$)

In the cultivation FB4, the highest CA concentration 1.4 g.L^{-1} was obtained at 90 hours also showing a high productivity in CA, $18.6 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. However, the maximum CA concentration in

fed-batch experiments was independent of the ornithine feeding in contrast with the results reported in the literature. Indeed [6] observed an increase of 270% in the CA production with ornithine feeding in shake flasks cultivations. The difference between those results is probably due to the difference between mixing and the oxygen transfer conditions in the shaker and the bench scale bioreactor. The maximum CA concentration and the CA productivity found in the present work are the highest values ever published in the literature utilizing a wild strain of *S. clavuligerus* in cultivations with similar complex media, i.e., with soybean derivatives and glycerol or soybean oil as nitrogen and carbon sources, respectively [2,5,6,9,17,20]. Recently, Saudagar et al [15] reported a high CA production (about 1.8 g.L^{-1}) in shake flasks utilizing *S. clavuligerus* MTCC 1142 cultivated in synthetic culture feeding L-threonine. The cultivation conditions proposed by these authors were assayed utilizing *S. clavuligerus* ATCC 27064 in shake flasks and in a bench scale bioreactor. Nevertheless, the results, in terms of the CA production, were much lower than those reported by those authors, about 50 mg.L^{-1} . Gouveia et al [8] cultivated *S. clavuligerus* NRRL 3585 and obtained the maximum CA production of 25 mg.L^{-1} in GSPG medium and around 90 mg.L^{-1} in GSPA medium, respectively.

Figure 6 illustrates the ornithine concentration along the fed-batch cultivations.

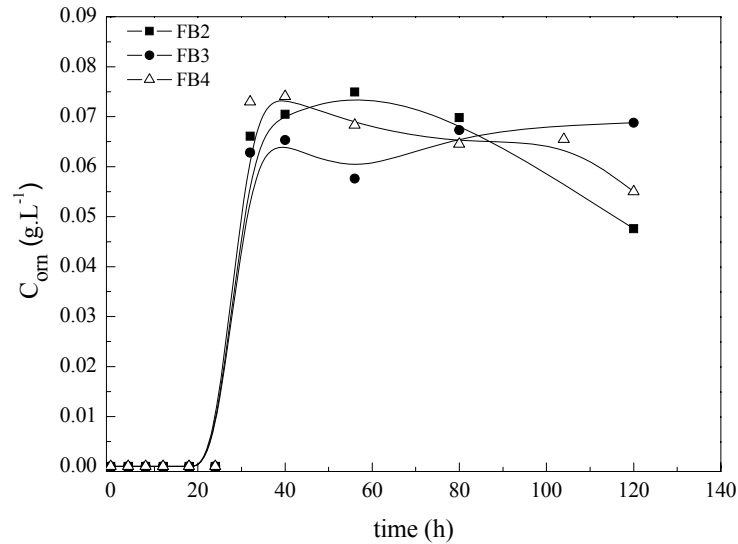


Figure 6. Time course of the ornithine concentration in fed-batch cultivations FB2 ($C_{om}=11.10 \text{ g.L}^{-1}$), FB3 ($C_{om}=7.40 \text{ g.L}^{-1}$), and FB4 ($C_{om}=3.70 \text{ g.L}^{-1}$)

It can be observed in Figure 6 that an accumulation of ornithine concentration occurs, between 50 and 70 mg.L^{-1} , 4 hours after the feeding start-up. In other words, no matter the quantity of

the ornithine fed, the ornithine concentration remains constant indicating a steady state condition ($dC_{om}/dt \approx 0$). This indicates that the conversion rate of ornithine into arginine is controlled by the mass flow rate of the ornithine added. Hence, the CA production rate is affected by the ornithine feeding conditions while the maximum CA production is not. This suggests that the CA production has been influenced by other limiting nutrients or inhibited by compounds accumulated in the broth, by-products, or even by the main product, clavulanic acid.

3.3. Effect of feed medium composition and glycerol feeding on fed-batch cultivations

The results of the CA concentration along fed-batch cultivations with complex and defined feeding media (FB5 and FB6) are illustrated in Figure 7. It can be noted that in terms of the CA production no differences were found with maximum CA productions of about 1.1 g.L^{-1} in 102 h. Therefore, the composition of the feeding medium (complex or defined) seems not to influence the CA production. Consequently, the less expensive defined feeding

medium containing ornithine, glycerol and distilled water was chosen for the other cultivations studied.

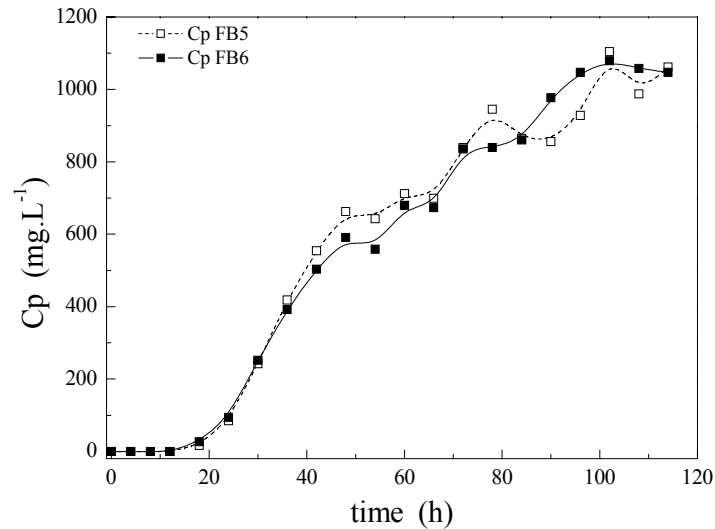


Figure 7. Time course of the CA concentration in FB5 (complex medium) and FB6 (defined medium) cultivations with $F=0.01 \text{ L.h}^{-1}$, Corn_F of 3.70 g.L^{-1} and $C_{S_F}=120 \text{ g.L}^{-1}$

The effect of the glycerol feeding on the biosynthesis of CA is shown in Figure 8. The consumption of glycerol and the cellular

growth in all cultivations displayed comparable behavior (data not shown).

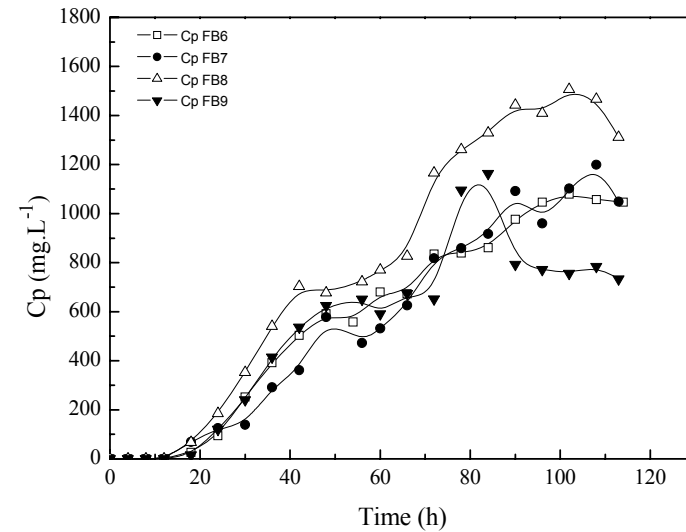


Figure 8. Time course of the CA concentration (C_p) in fed-batch cultivations with $F=0.01 \text{ L.h}^{-1}$ and $\text{Corn}_F=3.70 \text{ g.L}^{-1}$: FB6 ($C_{S_F}=120 \text{ g.L}^{-1}$), FB7 ($C_{S_F}=150 \text{ g.L}^{-1}$), FB8 ($C_{S_F}=180 \text{ g.L}^{-1}$) and FB9 ($C_{S_F}=240 \text{ g.L}^{-1}$)

The time course of the CA production showed similar behavior up to 42-48 h of cultivation. After this period, the CA production rate decreased probably due to the exhaustion of the free amino acids present in the broth. The retaking of the CA production can be associated to the beginning of the hydrolysis of soybean protein and to the consumption of the available free amino acids for the microorganisms as observed by Ortiz et al [11], characterizing a typical diauxie. Besides, quoting Mayer and Deckwer [9] “it is possible that in the presence of soybean flour particles in the cultivation medium, the formation of hydrolases, and particularly extracellular proteases by *S. clavuligerus*, is induced, which degrade continuously soybean flour during the growth phase and thus, provide a steady supply of essential nutrients to the microorganisms”. In a previous work Teodoro et al [17] defined $F=0.01 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, $C_{S_F}=120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, and the product ($F\cdot C_{S_F}=1.2 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$) as the best experimental conditions for the CA production in cultivations without the presence of ornithine in the culture medium. In the present work, the maximum CA concentration of $1.506 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the FB8 cultivation with $C_{S_F}=180 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $F\cdot C_{S_F}=1.8 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ was reached in the presence of ornithine in the feeding medium at the concentration of $3.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

(Corn_F) showing that there is a combined positive effect of ornithine and glycerol in the biosynthesis of CA.

Table 1 presents the main results obtained for both batch and fed-batch cultivations performed under different experimental conditions. With respect to the maximum CA concentration ($C_{p_{\max}}$), in all fed-batch cultivations, values of $C_{p_{\max}}$ that are twice higher than those found in the control run (B1) were obtained, and in FB8 ($F=0.01 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, $\text{Corn}_F=3.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $C_{S_F}=180 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) the highest CA concentration, $1.506 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ which is around three times higher than that of the control run, was achieved. In the cultivation FB4, fed with complex culture medium ($F=0.01 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, $\text{Corn}_F=3.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $C_{S_F}=120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), the maximum volumetric productivity in CA ($P_{p_{\max}}$) of $18.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ associated with a high CA production ($1.405 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) was observed. It is important to point out that the value of the maximum productivity obtained in the present work is very high if compared with the literature. In a recent work Baptista-Neto et al [2] reported that the highest productivity in clavulanic acid is of $22.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ in continuous cultivation with cell recycling.

From the mass of glycerol and ornithine consumed and the mass of the CA produced, it was possible to calculate the product

(CA) yield coefficients related to glycerol consumption ($Y_{P/S}$) and to the ornithine consumption ($Y_{P/Om}$); these values are presented in Table 1. Based on the stoichiometry proposed by Bushell et al [3] and on the fact that ornithine is converted to arginine and incorporated in the CA molecule, 2 moles of ornithine originates 3 moles of CA, so the stoichiometric coefficient ($Y_{P/Om}$)_{est}, is 1.5 moles CA/mol ornithine or 2.26 g CA/g ornithine in mass basis. In their work, Bushell et al [3] they obtained clavulanic acid yields in relation to glycerol from values of $0.40 \cdot 10^{-4} \text{ g}_P \cdot \text{g}_S^{-1}$ ($D=0.1 \text{ h}^{-1}$) to $5.8 \cdot 10^{-4} \text{ g}_P \cdot \text{g}_S^{-1}$ ($D=0.03 \text{ h}^{-1}$). In the present work, the values of $Y_{P/S}$ for batch and fed-batch cultivations varied within the limited range of 0.025 and $0.039 \text{ g}_P \cdot \text{g}_S^{-1}$ and, so for smaller dilution rates (D), the range was 0.0028 to 0.0025 h^{-1} . Therefore, it is clear that $Y_{P/S}$ is strongly affected by the culture medium composition and by glycerol feeding conditions. With respect to clavulanic acid yields in relation to ornithine ($Y_{P/Om}$), the efficiency (η_p) in relation to the stoichiometric value are presented in Table 1. High values of the η_p , above 50%, were obtained in fed-batch cultivations performed with low ornithine concentration in the feeding medium ($3.70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). The highest value (109.4%) was obtained in the FB4 run. The percentage above 100% can be explained by the additional conversion of arginine, initially

present in the complex medium, into clavulanic acid. It can also be observed that the highest CA efficiencies in relation to ornithine are associated with the highest CA productions (FB4 and FB8).

Table 1. Yield coefficients and CA production obtained in batch and fed-batch cultivations performed under different experimental conditions

Run	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/Om}$ (g/g)	η_p (%)	$C_{p_{max}}$ (g.L ⁻¹)	$P_{p_{max}}$ (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)
B1 (control)	0.032	-	-	0.509	9.5
B2	0.035	1.056	46.7	0.569	13.7
B3	0.027	0.523	23.1	0.459	10.6
B4	0.025	0.337	14.9	0.399	10.5
FB1	0.033	-	-	1.365	11.7
FB2	0.034	0.807	35.7	1.403	16.0
FB3	0.037	0.696	30.8	1.274	15.5
FB4	0.039	2.472	109.4	1.405	18.6
FB5	0.029	1.467	64.9	1.104	13.8
FB6	0.028	1.431	63.3	1.078	12.3

FB7	0.025	1.616	71.5	1.199	12.0
FB8	0.029	1.993	88.2	1.506	16.8
FB9	0.025	1.003	44.4	1.163	14.0

4. Conclusion

In batch cultivations performed in a bench scale bioreactor, the CA productivity increased in the presence of ornithine in the culture medium. However, the CA production was not affected by ornithine in contrast with the results found in the literature [6,20]. Unlike the CA productivity, the CA maximum production was again not affected by the presence of ornithine in fed-batch cultivations with ornithine feeding. No matter the quantity of ornithine fed, the ornithine concentration remained constant indicating a steady state condition ($dC_{\text{orn}}/dt \cong 0$) which means that the conversion rate of ornithine into arginine is controlled by the mass flow rate of the ornithine added.

In conclusion, it can be said that in batch and fed-batch cultivations the ornithine feeding conditions affects the CA production rate but it does not affect the maximum CA production suggesting that the CA production has been influenced by other

limiting nutrients or inhibited by compounds accumulated in the broth, by-products, or even by the clavulanic acid itself. Regarding the influence of the composition of the supplementary culture medium, no differences in terms of the CA production were found when complex or defined feeding media was utilized. Therefore, the less expensive defined feeding medium with ornithine, glycerol and distilled water was chosen as the most appropriated for the CA production. High values of yield coefficients $Y_{P/S}$ and Y_{P/O_m} were obtained in the present work. Particularly, values of η_P above 50% were obtained in fed-batch cultivations performed with low ornithine concentration in the feeding medium (3.70 g.L^{-1}). Lastly, the highest CA efficiencies in relation to ornithine are associated with the highest CA productions (FB4 and FB8).

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (Grant Proc. 03/11722-5 and Proc. 05/55079-4) and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*.

References

1. Badino AC, Facciotti MCR, Schmidell W (1999) Estimation of the rheology of glucoamylase fermentation broth from the biomass concentration and shear conditions. *Biotechnol Tech* 13:723–726.
2. Baptista-Neto A, Teodoro JC, Cassiano Filho LCM, Badino AC, Hokka CO (2005) Comparison between continuous and batch processing to produce clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Braz Arch Biol Technol* 48:97–104.
3. Bushell ME, Kirk S, Zhao HJ, Avignone-Rossa CA (2006). Manipulation of the physiology of clavulanic acid biosynthesis with the aid of metabolic flux analysis. *Enz Microbiol Technol* 39:149-157.
4. Buynak JD (2006) Understanding the longevity of the β -lactam antibiotics and of antibiotic β -lactamase inhibitor combinations. *Biochem Pharm* 71:930-940.
5. Chen K, Lin Y, Tsai C, Hsieh C, Houng J (2002) Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with glycerol feeding. *Biotechnol Lett* 24:455–458.
6. Chen K, Lin Y, Tsai C, Hsieh C, Houng J (2003) Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding. *Enz Microbiol Technol* 32:152–156.
7. Foulstone M, Reading C (1982) Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of Augmentin, in biological fluids with HPLC. *Antimicrob Agents Chemother* 22:753–762.
8. Gouveia ER, Baptista-Neto A, Azevedo AG, Badino AC, Hokka CO (1999) Improvement of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in medium containing soybean derivatives. *World J Microbiol Biotechnol* 15:623-627.
9. Mayer AF, Deckwer WD (1996) Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:41–46.
10. Neves AA, Pereira DA, Vieira LM, Menezes JC (2000) Real time monitoring biomass concentration in *Streptomyces clavuligerus* cultivations with industrial media using a capacitance probe. *J Biotechnol* 84:45–52.
11. Ortiz SCA, Hokka CO, Badino AC (2007) Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Enz Microbiol Technol* 40:1071-1077.
12. Romero J, Liras P, Martin JF (1984) Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 20:318–325.
13. Rosa JC, Baptista-Neto A, Hokka CO, Badino AC (2005) Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioproc Biosyst Eng* 27:99–104.
14. Sanders CC, Sanders WE (1979) Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin-inducible beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 15:792–797.
15. Saudagar PS, Singhal RS (2007) Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Biores Technol* 98:2010-2017.
16. Spratt BG (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264:388-393.
17. Teodoro JC, Baptista Neto A, Cruz-Hernandez IL, Hokka CO, Badino AC (2006) Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:450-455.
18. Townsend CA, Ho MF (1985) Biosynthesis of clavulanic acid: origin of C₃ unit. *J. Am Chem Soc* 107:1065–1066.
19. Valentine BP, Bailey CR, Doherty A, Morris J, Elson SW, Baggaley KH (1993) Evidence that arginine is a later metabolic intermediate than ornithine in biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *J Chem Soc Chem Commun* 15:1210-1211.
20. Wang YH, Yang B, Ren J, Dong ML, Liang D, Xu AL (2005) Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Proc Biochem* 40:1161–1166.

ANEXO 3: Artigo publicado no Applied Microbiology and Biotechnology (Teodoro *et. al.*, 2006)

Juliana C. Teodoro · Alvaro Baptista-Neto ·
Isara L. Cruz-Hernández · Carlos O. Hokka ·
Alberto C. Badino

Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol

Received: 16 August 2005 / Revised: 23 November 2005 / Accepted: 27 November 2005 / Published online: 5 January 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract First, the effect of different levels of nitrogen source on clavulanic acid (CA) production was evaluated in batch cultivations utilizing complex culture medium containing glycerol and three different levels of soy protein isolate (SPI). Cellular growth, evaluated in terms of the rheological parameter K , was highest with a SPI concentration of 30 g.L⁻¹ (4.42 g.L⁻¹ total N). However, the highest production of CA (380 mg.L⁻¹) was obtained when an intermediate concentration of 20 g.L⁻¹ of SPI (2.95 g.L⁻¹ total N) was used. To address this, the influences of volumetric flow rate (F) and glycerol concentration in the complex feed medium (C_{SF}) in fed-batch cultivations were investigated. The best experimental condition for CA production was $F=0.01$ L.h⁻¹ and $C_{SF}=120$ g.L⁻¹, and under these conditions maximum CA production was practically twice that obtained in the batch cultivation. A single empirical equation was proposed to relate maximum CA production with F and C_{SF} in fed-batch experiments.

Introduction

Since the advent of the antibiotic era in the 1930s, medical science has witnessed the successful therapeutic application of numerous classes of antibiotics, including penicillins, cephalosporins, and tetracyclines (Essack 2001). Today, the β -lactam antibiotics, particularly penicillins and cephalosporins, represent the world's major biotechnology products with worldwide dosage sales at around 65% of the total world market of antibiotics (Elander 2003).

Although antibiotics have been effective in the treatment of infections, resistance is an inevitable consequence of selective pressures imposed by the widespread use and misuse of antibiotics (Sanders and Sanders 1979; Spratt 1994). One of the most important resistance mechanisms exhibited by a variety of gram-positive and gram-negative bacteria is their ability to produce β -lactamases; enzymes which deactivate penicillins and cephalosporins by hydrolyzing their beta-lactam ring. Clavulanic acid (CA) is a potent inhibitor of β -lactamases, and its combination with amoxicillin is the most successful example of the use of a β -lactam antibiotic sensitive to β -lactamase together with an inhibitor of these enzymes (Mayer and Deckwer 1996).

CA is traditionally produced by *Streptomyces clavuligerus* using a complex culture media containing soybean derivatives and glycerol as nitrogen, carbon, and energy sources, respectively (Mayer and Deckwer 1996; Chen et al. 2002, 2003; Wang et al. 2005; Rosa et al. 2005). Soybean derivatives present advantages, related to CA biosynthesis, when compared with other sources (Spizek and Tichy 1995, Butterworth 1984). A standard commercial soy protein isolate (SPI), containing about 15% w/v of total nitrogen, has been used as the main N source in culture media to obtain high CA production (Rosa et al. 2005). This enhancement can probably be explained by the absence of carbohydrates in this nitrogen source when compared with soy meal, which contains about 20% w/w carbohydrate. The quantity of nitrogen in the culture medium may be sufficient to secure good cell growth. However, the presence of NH₄⁺ ions in excess can inhibit the CA biosynthesis (Romero et al. 1984).

Romero et al. (1984) studied the role of glycerol on the biosynthesis of CA by *S. clavuligerus*, suggesting that glycerol is a direct precursor of CA biosynthesis. Chen et al. (2002) also point out that glycerol plays an important role in this biosynthesis. However, both authors observed that the biosynthesis of CA was inhibited by glycerol above 15 g.L⁻¹. Indeed, high concentrations of glycerol (above 2% w/v) have been reported to suppress antibiotic production in *S. clavuligerus* (Rius and Demain 1997).

J. C. Teodoro · A. Baptista-Neto · I. L. Cruz-Hernández ·
C. O. Hokka · A. C. Badino (✉)
Department of Chemical Engineering,
Universidade Federal de São Carlos,
Cx. Postal 676, CEP 13565-905 São Carlos SP, Brazil
e-mail: badinojr@power.ufscar.br
Tel.: +55-16-33518001
Fax: +55-16-33518266

When fermentation is involved in the formation of products, any substrate essential for production may be added to the medium to improve the yield of products. The fed-batch strategies have been considered as a means of controlling the growth rate, prolonging the stationary phase, and overcoming substrate inhibition and metabolite repression. Chen et al. (2003) improved CA production in shake fed-batch cultivation by adding glycerol (converted to the C3 unit) and ornithine (C5 unit) on CA biosynthesis.

Studies regarding the effect of glycerol feeding on CA production have been reported in the literature. Mayer and Deckwer (1996) investigated the influence of different feeding procedures on CA production by *S. clavuligerus* in fed-batch cultures. The highest production was obtained with medium containing soy meal, peptone, and glycerol in the initial medium, and the fed-batch operation startup occurred when the glycerol concentration decreased to 2.0 g.L⁻¹. The effect of glycerol feeding on CA production, in fed-batch culture, was also studied by Chen et al. (2002) in a 5-L stirred tank fermenter. Soy meal extract and peptone were utilized as nitrogen sources so that biomass determinations were not affected by insoluble particles. Fed-batch operation started at 24 h after inoculation by feeding glycerol solution continuously at 10.0 mL.h⁻¹ for 108 h. CA production reached 250 mg.L⁻¹ (80 h) and continued to increase up to about 280 mg.L⁻¹, remaining at this level for up to 130 h. For comparison, in batch cultivations the CA production reached about 230 mg.L⁻¹ in 72 h. Recently, Chen et al. (2003) reported the enhancement of CA production by *S. clavuligerus* with ornithine feeding in shake cultivations. Fed-batch cultivations were started at 60 h after inoculation by feeding a solution of glycerol and ornithine with a flow rate of 17.0 mL.h⁻¹ over a period of 100 h. A CA concentration of 311 mg.L⁻¹ was obtained, meaning a 2.7-fold increase as compared to that given in batch cultivation.

Works found in the literature emphasize the importance of glycerol feeding on the CA production process, maintaining cellular growth and increasing the formation of CA in the fed-batch phase. However, the effect of the operational variables, viz, volumetric flow rate (F), limiting substrate concentration (glycerol) in the feeding culture medium (C_{SF}), and glycerol mass flow rate ($F.C_{SF}$), on CA production has not been evaluated so far.

In the present work, the effect of the above mentioned operational conditions, F , C_{SF} , and $F.C_{SF}$, as well as the effect of N source concentration on CA production by *S. clavuligerus* in a fed-batch fermentor, was investigated. Experiments were performed using three levels of SPI in the main culture medium, and the flow rate and the glycerol concentration were varied in the feed medium in each cultivation. Results in terms of CA production and volumetric productivity were compared with those in literature utilizing complex media containing soybean derivatives.

Materials and methods

Microorganism

Streptomyces clavuligerus ATCC 27064 used throughout this work was stored as vegetative cells (5.0 g.L⁻¹ dry weight) at -70°C in cryotubes utilizing glycerol 10% v/v.

Culture media and experimental conditions

The seed medium, based on the one used by Reading and Cole (1977), contained (in g.L⁻¹ distilled water): glycerol, 15.0; bacto peptone, 10.0; malt extract, 10.0; yeast extract, 1.0; K₂HPO₄, 2.5; MgSO₄.7H₂O, 0.75; MnCl₂.4H₂O, 0.001; FeSO₄.7H₂O, 0.001; ZnSO₄.7H₂O, 0.001; and 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) buffer, 21 (100 mM), pH 6.8.

The inoculum medium contained (in g.L⁻¹ distilled water): glycerol, 15.0; Samprosoy 90NB (SPI from Bunge Alimentos S/A, Esteio RS, Brazil, containing about 15% w/v of total nitrogen), 10.0; malt extract, 10.0; yeast extract, 1.0; K₂HPO₄, 2.5; MgSO₄.7H₂O, 0.75; MnCl₂.4H₂O, 0.001; FeSO₄.7H₂O, 0.001; ZnSO₄.7H₂O, 0.001; and MOPS buffer, 21 (100 mM); pH 6.8. Under the conditions of medium preparation, Samprosoy 90NB was not perfectly soluble.

The production medium had the same composition as the inoculum medium, except that no MOPS buffer was used and silicone antifoam (0.08 mL.L⁻¹) was added. In batch cultures, B1, B2, and B3, three different Samprosoy concentrations, 10.0, 20.0, and 30.0 g.L⁻¹, respectively, were utilized in the production medium to investigate the influence of total N concentrations on CA production. In fed-batch experiments, the feeding medium had the same composition as the production medium, except that the glycerol concentration was varied from 15.0 to 120 g.L⁻¹.

Batch and fed-batch cultivations were performed in a Bioflo III fermentor (New Brunswick Sci. Co. Inc., USA) with a 4-L total working volume. All cultivations were conducted at 28°C, 800 rpm, 0.5 vvm, based on a 4-L volume (2 L.min⁻¹), and the pH was automatically controlled to stay at 6.8±0.1 by adding a 4 M HCl or 2 M NaOH solution.

Cell suspensions from cryotubes (3.5 mL), having a concentration of 5 g.L⁻¹ dry weight, were inoculated into a 50-mL seed medium in a 500-mL Erlenmeyer flask and incubated in a rotary shaker (New Brunswick Scientific) at 28°C and 250 rpm for 24 h. Erlenmeyer flasks (500 mL) with 45 mL of inoculum medium were inoculated with 5 mL of the cultivated seed broth and incubated in a rotary shaker at 28°C, 250 rpm for 24 h. The contents of eight flasks (400 mL) or five flasks (250 mL) were transferred to the fermentor resulting in initial fermentation volumes of 4.0 or 2.5 L for batch or fed-batch cultivation, respectively.

The fed-batch operation was started at 24 h after inoculation by the feeding medium having a glycerol concentration (C_{SF}) varying from 15.0 to 120.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, at a volumetric flow rate (F) in the range from 0.01 to 0.08 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. When the broth volume reached 4 L, the feeding was switched off, then 1.5 L of broth was withdrawn and the fed-batch operation was restarted. The range of the fed-batch conditions, C_{SF} and F , were chosen considering the quasi-steady state condition ($r_s = F \cdot C_{SF}/V$) and based on the glycerol uptake rate at the end of the batch cultivations ($r_s = -dC_s/dt$). Six fed-batch experiments were carried out under the following experimental conditions: FB1 ($F=0.08\text{L}\cdot\text{h}^{-1} - C_{SF}=30.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), FB2 ($F=0.08\text{L}\cdot\text{h}^{-1} - C_{SF}=15.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), FB3 ($F=0.04\text{L}\cdot\text{h}^{-1} - C_{SF}=30.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), FB4 ($F=0.04\text{L}\cdot\text{h}^{-1} - C_{SF}=15.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), FB5 ($F=0.02\text{L}\cdot\text{h}^{-1} - C_{SF}=60.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), and FB6 ($F=0.01\text{L}\cdot\text{h}^{-1} - C_{SF}=120.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). The times when the volume reached 4 L were FB1 and FB2 (45, 64, and 82 h) and FB3 and FB4 (64 h), respectively. Samples of 20 mL were withdrawn approximately every 3 h, and 10-mL aliquots were centrifuged at 3,720 $\times g$ and at 5°C for 20 min.

Analytical methods

Cell growth was evaluated indirectly by measuring the broth rheological parameter K (consistency index) of the “power law” model, using a Brookfield concentric-cylinders rheometer. Literature has shown that the consistency index (K) is the most appropriate parameter to infer cell growth in broth containing insoluble particles, as is the case with complex fermentation broths. It can be related also to the morphology of filamentous microorganisms (Badino et al. 1999; Neves et al. 2000). As cultivation proceeded, the amount of insoluble particles in the broth became low and cell growth could be evaluated as dry matter obtained after centrifugation at 3,720 $\times g$ for 20 min and drying at 85°C for 6 h.

Glycerol concentration (C_s) was determined by high performance liquid chromatography (HPLC), calibrated with 25, 50, and 75% (v/v) dilutions of 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ glycerol solution. NaOH (1 mM) solution was used as the mobile phase. The equipment was operated at 80°C with a 1-mL $\cdot\text{min}^{-1}$ flow rate. A Shodex KS 802 (Lonpak) column was utilized.

CA concentration (C_p) was determined by HPLC, as described by Foulstone and Reading (1982). CA from the Pharmaceutical product Clavulin (Glaxo-SmithKline Farmacêutica, Rio de Janeiro, Brazil) was used as standard. The imidazole derivative of CA was injected into a HPLC unit with a C-18 μ -Bondapak (Waters) column. The mobile phase was composed of 94% KH_2PO_4 0.1 M (pH 3.2) and 6% methanol, v/v. The detection was at 311 nm.

Results

Three batch runs were carried out with complex medium containing 1.5, 3.0, and 4.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of initial nitrogen

concentration. Figure 1a shows the glycerol (C_s) and consistency index (K) time course. Glycerol consumption behaved similarly in all cultivations, and the substrate uptake rates at the end of the batches were around 0.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. The highest cellular growth was obtained for the highest nitrogen concentration (30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of Samprosoy, 4.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ total N). Figure 1b shows that the maximal production of CA, 380 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in 48 h, was obtained in the B2 run containing 3.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ total N.

In all fed-batch experiments, the CA production started after 10 h of cultivation. Growth and CA synthesis occurred simultaneously in the trophophase as also observed by Mayer and Deckwer (1996). After the start of the fed-batch operation (24 h), the CA production rate was always lower than that in the batch phase and decreased along the cultivation period until the CA concentration reached the maximum value.

The effect of glycerol feeding on the biosynthesis of CA is shown in Fig. 2. Values of relative CA concentration (C_{PR}) are related to the maximum CA concentration obtained in run B2 (380 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), considered to be the control run (horizontal line in Fig. 2). The run B2 (control run) was repeated three times during the work and similar

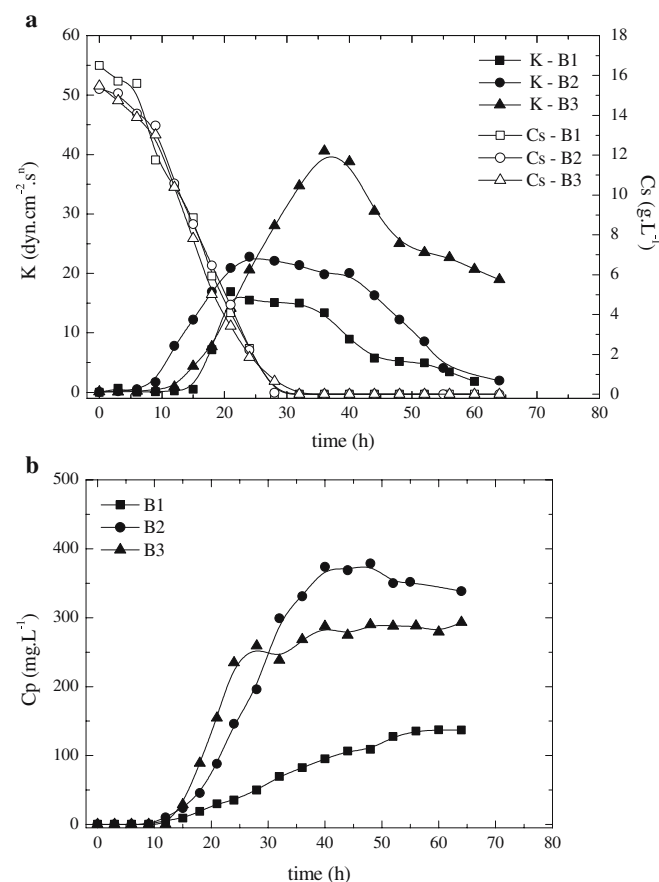


Fig. 1 Time course of **a** glycerol concentration (C_s) and rheological parameter consistency index (K) related to cell growth and **b** clavulanic acid concentration (C_p) from batch cultivations B1, B2 and B3

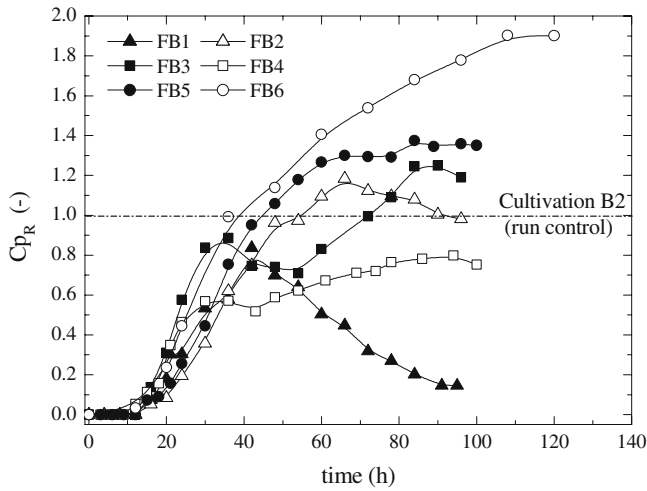


Fig. 2 Time course of relative CA concentration (C_{PR}) in fed-batch cultivations where: *FB1* ($F=0.08 \text{ L.h}^{-1} - C_{SF}=30.0 \text{ g.L}^{-1}$), *FB2* ($F=0.08 \text{ L.h}^{-1} - C_{SF}=15.0 \text{ g.L}^{-1}$), *FB3* ($F=0.04 \text{ L.h}^{-1} - C_{SF}=30.0 \text{ g.L}^{-1}$), *FB4* ($F=0.04 \text{ L.h}^{-1} - C_{SF}=15.0 \text{ g.L}^{-1}$), *FB5* ($F=0.02 \text{ L.h}^{-1} - C_{SF}=60.0 \text{ g.L}^{-1}$), and *FB6* ($F=0.01 \text{ L.h}^{-1} - C_{SF}=120.0 \text{ g.L}^{-1}$)

results were obtained. It can be observed that only in runs FB1 and FB4 was the CA maximal production lower than that in the control run.

Table 1 presents the maximum relative CA concentrations (C_{PRmax}) obtained under different experimental conditions in fed-batch cultivations, namely, volumetric flow rate (F), glycerol concentration in the feed medium (C_{SF}), and glycerol mass flow rate ($F.C_{SF}$). The best experimental condition for CA production was $F=0.01 \text{ L.h}^{-1}$ and $C_{SF}=120 \text{ g.L}^{-1}$ (run FB6).

Discussion

Effect of initial nitrogen concentration

In batch experiments, after glycerol exhaustion, the acid pump of the pH controller started in place of the alkali pump, indicating NH_4^+ release in the medium. The cellular growth in the B3 cultivation was much higher ($K_{max} \cong 40 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ in 36 h) than the B1 and B2 cultivations.

Table 1 Relative maximum production of CA at different feeding rates of supplementary medium in fed-batch experiments

Run	$F \text{ (L.h}^{-1}\text{)}$	$C_{SF} \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$	$F.C_{SF} \text{ (g.h}^{-1}\text{)}$	$C_{PRmax} \text{ (-)}$
FB1	0.08	30	2.4	0.84
FB2	0.08	15	1.2	1.18
FB3	0.04	30	1.2	1.25
FB4	0.04	15	0.6	0.80
FB5	0.02	60	1.2	1.38
FB6	0.01	120	1.2	1.90

F Volumetric flow rate, C_{SF} glycerol concentration in the feed medium, $F.C_{SF}$ glycerol mass flow rate, C_{PRmax} maximum relative CA concentration

However, Fig. 1b shows that, although the cellular growth was higher in the B3 cultivation, the production of CA was not higher. CA synthesis started at late stages of the trophophase and proceeded with a constant rate during the idiophase, as reported by Mayer and Deckwer (1996). These authors also report that growth and production occur simultaneously in the trophophase when a soluble nitrogen source is utilized. The higher the initial concentration of Samprosoy, the higher the consumption of protein as a carbon source for structural synthesis and the higher the liberation of ammonia into the broth, due to the catabolism of amino acids. High concentrations of NH_4^+ in the broth inhibit the production of CA, as reported by Romero et al. (1984). According to Ives and Bushell (1997), the CA biosynthetic pathway is subject to ammonia repression, and the detected presence of arginase activity indicates ammonia release from the urea cycle. Urea cycle in prokaryotes is unusual and is required to remove ammonia from cells in which toxic intracellular concentrations are likely to occur, such as those of species that carry out rapid amino acid catabolism (Mendz and Hazell 1996). Therefore, 20 g.L^{-1} of Samprosoy (run B2) was the concentration of nitrogen that resulted in good cellular growth and highest product biosynthesis combined with highest specific production of CA over the whole cultivation period.

Effect of feed medium glycerol concentration (C_{SF}) and volumetric flow rate (F) in fed-batch cultivations

In all cultivations, after the start of the fed-batch operation, the glycerol concentration (C_s) in the broth remained between 0 and 4.0 g.L^{-1} , randomly distributed, except for the FB6 run in which C_s increased up to 8.0 g.L^{-1} in 72 h and decreased to 2.0 g.L^{-1} in 120 h of cultivation (data not shown). With respect to cellular growth, the consistency index (K) reached values between 22.5 and $30.0 \text{ dyn.cm}^{-2}.\text{s}^n$ at the end of the batch phase (24 h). After the start of medium feeding, K decreased over the cultivation period. Only in the FB1 run, in which the glycerol mass flow rate was the highest (2.4 g.L^{-1}), did K remain practically constant around $25.0 \text{ dyn.cm}^{-2}.\text{s}^n$. The consistency index (K) is a variable dependent on the cellular concentration as well as on the microorganism morphology. In a fed-batch operation, decreases of K values can be related to the dilution rate ($D=F.V^{-1}$) but not to cell death. According to Sebastine et al. (1999), there seems to be no clear relationship between the CA production rate and viability or the amount of viable biomass. This is not unusual, as even the productivity of viable cells will be affected, more or less strongly, by other fermentation conditions, particularly the substrate concentration. In all cultivations, the cellular concentration varied between 12.5 and 14 g.L^{-1} . Literature mentions that soybean derivatives, such as soy meal flour and soybean protein hydrolysates, are the components of choice for CA production because these derivatives provide proper cellular growth and contain arginine, the precursor of the CA molecule (Mayer and Deckwer 1996; Chen et al. 2002).

In runs FB1 and FB4, the CA maximal concentrations were lower than those obtained in the batch cultivation, utilizing the same culture medium. In the FB1 run, the glycerol mass flow rate ($F.Cs_F$) was the highest (2.4 g.h^{-1}). According to Roubos et al. (2002), "CA degradation is an important aspect which cannot be neglected when optimizing the fed-batch production process. Medium components, in particular magnesium and ammonium, determine the degradation rate to a certain extent, while at high glycerol and ammonium concentrations, an enzyme probably is induced that increases the degradation rate constant". Besides, the dilution of the broth due to the high F contributed to the CA concentration decrease over the cultivation period. On the other hand, in run FB4, the lower glycerol mass flow rate, $F.Cs_F$ (0.6 g.h^{-1}), was insufficient to assure an adequate substrate uptake rate, and the glycerol concentration was completely exhausted during the fed-batch operation (data not shown). The results show that an adequate product $F.Cs_F$ for the present process, with this feed medium, lies between 0.6 and 2.4 g.h^{-1} . Four other cultivations were performed at $F.Cs_F=1.2 \text{ g.h}^{-1}$ with different values of F and Cs_F .

Results presented in Table 1 show that run FB6 is the best experimental condition for CA production. In a similar work, Cruz et al. (1999) found that the best conditions for cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium* in fed-batch cultivations were a glucose mass flow rate of 0.92 g.h^{-1} and a volumetric flow rate of 10.3 mL.h^{-1} in a 4-L working volume bioreactor. Higher or lower values of the glucose mass rate generated a lower production of cephalosporin C. In the present work, the maximum CA concentration of 719 mg.L^{-1} , obtained in run FB6, was practically twice that in the control run (B2). This was higher than any results published in literature, utilizing a wild strain of *S. clavuligerus* in fed-batch cultivations with similar complex media (Mayer and Deckwer 1996; Chen et al. 2002, 2003; Baptista-Neto et al. 2005). In a fed-batch cultivation under the same conditions as run FB6 (0.01 L.h^{-1} and 120 g.L^{-1}), but containing only glycerol in the feed medium, CA production was much lower than that seen in run FB6. The presence of arginine in the SPI fed during the experiment, together with the glycerol, may have been responsible for the high CA production in FB6 cultivation.

The influence of each operational condition, F , Cs_F , and $F.Cs_F$, is depicted in Fig. 3. It can be observed that the CA production increased with a decrease in F and an increase in Cs_F . In other words, the slower the dilution rate, the better the cultivation performance in terms of CA production. However, substrate feeding should assure sufficient glycerol uptake by the microorganism.

Experimental values of the maximum CA concentration (Cp_{Rmax}), obtained in six fed-batch cultivations, were correlated with F and Cs_F resulting in Eq. (1):

$$Cp_{Rmax} = 0.358 F^{-0.152} Cs_F^{0.201} (R^2 = 0.92) \quad (1)$$

Figure 4 illustrates the good fit of the proposed correlation. It can be observed that differences between

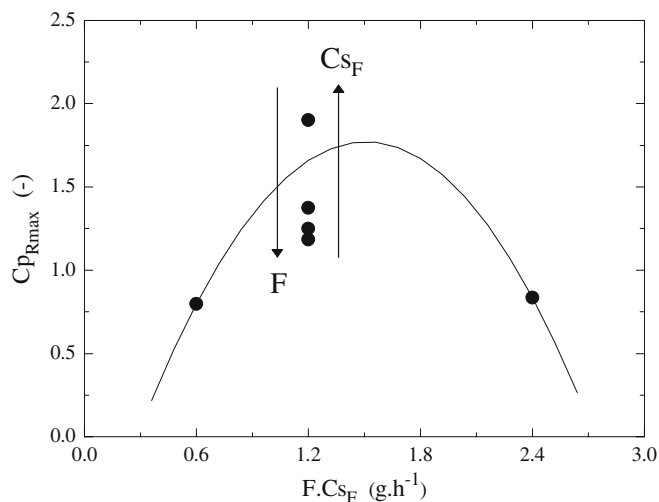


Fig. 3 Influence of glycerol mass flow rate ($F.Cs_F$) on maximum relative CA concentration (Cp_{Rmax}) at different volumetric flow rates (F) and glycerol concentrations in the feed medium (Cs_F)

experimental and calculated values of Cp_{Rmax} were lower than 20%. Confirming the experiments, the effect of the increase of F is negative, while the increase of Cs_F is positive, on the CA production as shown by the signs of the exponents. Using Eq. (1), the maximum production of CA under any other experimental condition can be calculated. For example, with a glycerol mass flow rate of 1.2 g.h^{-1} at $F=0.005 \text{ L.h}^{-1}$ and $Cs_F=240 \text{ g.L}^{-1}$, the Cp_{max} calculated by Eq. (1) would be approximately 913 mg.L^{-1} .

The results obtained so far suggest that the production of CA can be increased in fed-batch cultivations utilizing a low volumetric flow rate (F) and a high glycerol concentration in the feed medium (Cs_F). As glycerol is a liquid substrate at room temperature, runs with a highly concentrated feed medium can be performed, minimizing the diluting effect on the product concentration.

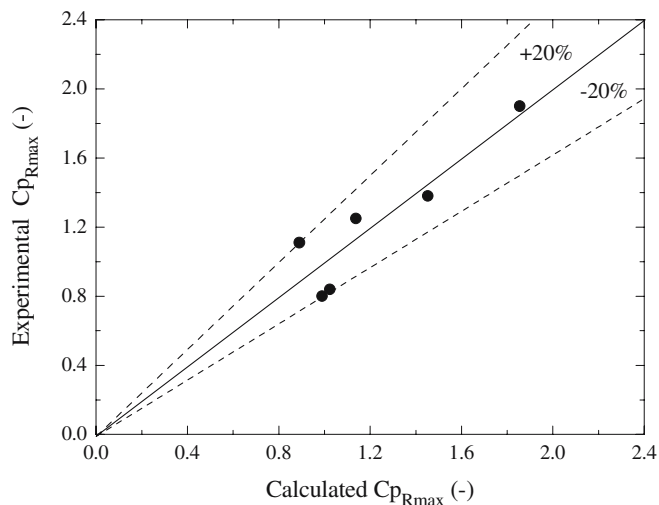


Fig. 4 Comparison between experimental values of Cp_{Rmax} and those calculated using Eq. (1)

Conclusions

In the batch experiments, run B2, with 20 g.L⁻¹ of SPI corresponding to 2.95 g.L⁻¹ total N, combined good cellular growth and high product biosynthesis giving the highest specific production of CA of all the cultivations tested.

In the fed-batch experiments, the best $F.Cs_F$ for CA production was 1.2 g.h⁻¹. It can be observed from the experimental results that the CA production increased with a decrease of F and an increase of Cs_F , i.e., the lower the dilution rate, the better the performance of the cultivation in terms of CA production. However, substrate feeding should assure adequate glycerol uptake by the microorganism.

An empirical relationship was proposed to related maximum CA concentration ($C_{P_{Rmax}}$) to the volumetric flow rate (F) and the glycerol concentration in the feed medium (Cs_F). The model explained the experimental data very well, allowing a prediction of CA production for other experimental conditions and further process optimization.

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge Bunge Alimentos S/A for providing the samples of Samprosoy 90NB and the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grant Proc. 03/11722-5 and PD Scholarship Proc.04/00224-7), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

References

- Badino AC, Facciotti MCR, Schmidell W (1999) Estimation of the rheology of glucoamylase fermentation broth from the biomass concentration and shear conditions. *Biotechnol Tech* 13:723–726
- Baptista-Neto A, Teodoro JC, Cassiano Filho LCM, Badino AC, Hokka CO (2005) Comparison between continuous and batch processing to produce clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Braz Arch Biol Technol* 48:97–104
- Butterworth D (1984) Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: Vandamme EJ (ed) *Biotechnology of industrial antibiotics*, vol 22. Marcel Dekker, New York, pp 225–235
- Chen K, Lin Y, Tsai C, Hsieh C, Houng J (2002) Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with glycerol feeding. *Biotechnol Lett* 24:455–458
- Chen K, Lin Y, Tsai C, Hsieh C, Houng J (2003) Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding. *Enzyme Microb Technol* 32:152–156
- Cruz AJG, Silva AS, Araujo MLGC, Giordano RC, Hokka CO (1999) Modelling and optimization of the cephalosporin C production bioprocess in a fed-batch bioreactor with invert sugar as substrate. *Chem Eng Sci* 54:3137–3142
- Elander RP (2003) Industrial production of β -lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:385–392
- Essack SY (2001) The development of β -lactam antibiotics in response to the evolution of β -lactamases. *Pharm Res* 18 (10):1391–1399
- Foulstone M, Reading C (1982) Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of Augmentin, in biological fluids with HPLC. *Antimicrob Agents Chemother* 22:753–762
- Ives PR, Bushell ME (1997) Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* 143:633–636
- Mayer AF, Deckwer WD (1996) Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:41–46
- Mendz GL, Hazell SL (1996) The urea cycle of *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 142:2959–2967
- Neves AA, Pereira DA, Vieira LM, Menezes JC (2000) Real time monitoring biomass concentration in *Streptomyces clavuligerus* cultivations with industrial media using a capacitance probe. *J Biotechnol* 84:45–52
- Reading C, Cole M (1977) Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 11:852–857
- Rius N, Demain AL (1997) Regulation of lysine ϵ -aminotransferase by carbon source and lack of control phosphate in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:735–737
- Romero J, Liras P, Martin JF (1984) Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *J Appl Microbiol Biotechnol* 20:318–325
- Rosa JC, Baptista Neto A, Hokka CO, Badino AC (2005) Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioprocess Biosyst Eng* 27:99–104
- Roubos JA, Krabben P, de Laat WTAM, Babuska R, Heijnen JJ (2002) Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations. *Biotechnol Prog* 18:451–457
- Sanders CC, Sanders WE (1979) Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin-inducible β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 15:792–797
- Sebastine IM, Stocks SM, Cox PW, Thomas CR (1999) Characterisation of percentage viability of *Streptomyces clavuligerus* using image analysis. *Biotechnol Tech* 13:419–423
- Spizek J, Tichy P (1995) Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Folia Microbiol* 40:43–50
- Spratt BG (1994) Resistance of antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264:388–394
- Wang Y-H, Yang B, Ren J, Dong M-L, Liang D, Xu A-L (2005) Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochem* 40:1161–1166