

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

**Estudo do processo de produção de ácido clavulânico por
Streptomyces clavuligerus em cultivos contínuos com alta
concentração celular**

Álvaro de Baptista Neto

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. Carlos Osamu Hokka

Co-Orientador:

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Júnior

São Carlos-SP

2004

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

B222ep

Baptista Neto, Álvaro de.

Estudo do processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos contínuos com alta concentração celular / Álvaro de Baptista Neto. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

206 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Bioquímica. 2. Ácido clavulânico. 3. *Streptomyces clavuligerus*. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

À minha Família

AGRADECIMENTOS

À minha família e a Cyntia por me apoiarem e ajudarem.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka e Alberto Colli Badino Júnior pela orientação.

Aos companheiros de trabalho João Carlos Rosa, Daniela Battaglia Hirata, Uga (vulgo Luiz Cláudio Macedo Cassiano Filho) e Juliana Conceição Teodoro por ajudarem em todos os momentos deste trabalho.

Aos amigos Marlei e Amadeus pela amizade, ajuda e conselhos.

A todos os amigos que trabalharam ou ainda trabalham no laboratório de Bioquímica e em especialmente; Catarina, Miriam, Ester, Carolzinha, Gabriela, Renata, Joubert, Adriano, Ramirez, Kamilla, Vanessa, Luciana e Marcel.

Aos colegas do laboratório da Catalise pela amizade e em especialmente; Guaxupé, Joelmir, Natália, Bene, André e Kleper.

Ao técnico Oscar que sempre estava disposto a ajudar.

Aos integrantes da República Tudo Torto.

A Bunge alimentos pelo Samprosoy 90 NB.

A FAPESP pelo apoio financeiro (Proc 00/10054-0)

Ao IPT pela liofilização do microrganismo para armazenamento e manutenção da espécie produtora

Ao DEQ-UFSCar pela infra-estrutura fornecida.

Sumário

| | |
|---|-----|
| Resumo | 1 |
| Abstract..... | ii |
| Lista de Figuras | iii |
| Lista de Tabelas..... | xii |
| Nomenclatura..... | xiv |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 2. Revisão Bibliográfica | 3 |
| 2.1. Resistência aos Antibióticos β -lactâmicos | 3 |
| 2.2. Ácido Clavulânico | 7 |
| 2.3. <u>Streptomyces clavuligerus</u> | 12 |
| 2.4. Meios de Cultivos para a Produção de Metabólitos Secundários por <u>Streptomyces clavuligerus</u> | 13 |
| 2.5. Modos de Operação de Biorreatores | 17 |
| 2.5.1. Processo em Batelada | 18 |
| 2.5.2. Processo em Batelada Alimentada | 18 |
| 2.5.3. Processos Contínuos | 21 |
| 2.6. Modelagem Cinética..... | 37 |
| 2.7. Características Reológicas do Caldo de Cultivo | 45 |
| 2.8. Transferência de Oxigênio..... | 48 |
| 3. Materiais e Métodos | 52 |
| 3.1. Materiais | 52 |
| 3.1.1. Microrganismo | 52 |
| 3.1.2. Meios de Cultura Utilizados | 52 |
| 3.1.3. Equipamentos Utilizados..... | 55 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 3.2. | Metodologias | 61 |
| 3.2.1. | Metodologia Experimental | 61 |
| 3.2.2. | Metodologias Analíticas | 65 |
| 3.2.3. | Metodologia Numérica utilizada | 67 |
| 3.3. | Procedimento Experimental | 68 |
| 3.3.1. | Separação de Células | 68 |
| 3.3.2. | <i>Experimentos em Batelada</i> | 72 |
| 3.3.3. | Experimentos Contínuos | 76 |
| 3.4. | Tratamento Numérico dos Valores Experimentais..... | 83 |
| 3.4.1. | Cálculo das Produtividades em Ácido Clavulânico e das Produtividades Específicas do Microrganismo. | 83 |
| 3.4.2. | Modelagem Cinética..... | 85 |
| 3.4.3. | Estudo de Correlação dos Parâmetros Reológicos com a Concentração Celular | 92 |
| 3.4.4. | Determinação da Velocidade de Respiração Específica (R) | 93 |
| 3.4.5. | Correlação para a Determinação do Coeficiente Volumétrico de Transferência de Oxigênio (k_La) | 93 |
| 4. | Resultados e Discussões | 95 |
| 4.1. | Separação de Células | 95 |
| 4.2. | Experimentos em Batelada | 100 |
| 4.2.1. | Resultados dos Experimentos em Mesa Incubadora Rotativa; Avaliação da Influência de Sais no Meio de Cultivo na Produção de Ácido Clavulânico..... | 100 |
| 4.2.2. | Resultados dos Experimentos em Fermentador..... | 101 |
| 4.3. | Experimentos Contínuos | 123 |
| 4.4. | Tratamento Numérico dos Valores Experimentais..... | 152 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.4.1. | Resultado da Modelagem cinética..... | 152 |
| 4.4.2. | Correlação entre os Parâmetros Reológicos e Concentração Celular..... | 168 |
| 4.4.3. | Resultados de Velocidade de Respiração Específica (R)..... | 171 |
| 4.4.4. | Correlação para a Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$)..... | 173 |
| 5. | Conclusões..... | 175 |
| 6. | Sugestões..... | 179 |
| 7. | Referências Bibliográficas..... | 180 |
| | APÊNDICE A..... | 194 |
| | APÊNDICE B..... | 197 |
| | APÊNDICE C..... | 201 |
| | APÊNDICE D..... | 205 |

Resumo

O ácido clavulânico é um potente inibidor de β -lactamase, sendo utilizado em associação com antibióticos β -lactâmicos para combater bactérias patogênicas resistentes a ação de antibióticos.

É um produto oriundo do metabolismo secundário do *Streptomyces clavuligerus* produzido à maior velocidade após a fase de crescimento célula. Assim, cultivos com concentrações maiores de células podem resultar em maiores produtividades do processo. Por essa razão o objetivo principal do trabalho foi o estudar o processo contínuo de produção de ácido clavulânico obtida através de reciclo de células.

Inicialmente, foram realizados testes preliminares para determinar o melhor valor de pH bem como a melhor composição de meio de cultivo. Também, foram realizados experimentos para verificar efeitos de inibição de glicerol na produção de ácido clavulânico.

Após essa etapa, foram realizados experimentos contínuos sem reciclo celular para determinar os parâmetros cinéticos do modelo, descrevendo o processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Para a modelagem matemática, foi proposto um modelo cinético de crescimento celular que considerava o consumo simultâneo do glicerol e da fonte de nitrogênio.

Com o objetivo de obter altas concentrações celulares, foram realizados cultivos contínuos com reciclo celular. O processo de microfiltração foi escolhido devido a sua facilidade de operação e por apresentar separação celular de 100%, fato importante, pois elimina a separação celular na etapa de purificação do ácido clavulânico.

Problemas relativos à transferência de massa e aumento da viscosidade também foram investigados, verificando-se que limitações decorrentes destes fenômenos são contornáveis através de modificações de condições operacionais.

O presente trabalho mostra que a produtividade obtida nos cultivos contínuos com reciclo (25,2mg.L⁻¹.h⁻¹) celular é maior que aquela em batelada (11,7mg.L⁻¹.h⁻¹) e em processos contínuos sem reciclo celular (18,3 mg.L⁻¹.h⁻¹), sugerindo a utilização do sistema com reciclo celular para a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.

Studies of clavulanic acid process production by *Streptomyces clavuligerus* in continuous culture with high cell density.

Abstract

The use of β -lactamase inhibitor in conjunction with β -lactam antibiotics was proposed to improve the efficiency of these antibiotics. The clavulanic acid is an important inhibitor of β -lactamase due its ability to inhibit several classes of β -lactamases.

The clavulanic acid is a product from the secondary metabolism of *Streptomyces clavuligerus* and its production rate is higher after the fast growing phase. Higher productivities can be achieved in cultivations with high cell density. Therefore, the objective of this work was to study the continuous clavulanic acid production process with high cell density, possible with the recycle of cells.

Initially, experiments to determine the proper pH and medium compositions to improve clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* were performed. Experiments to examine the effect of inhibition and/or repression by glycerol were also carried out.

Continuous culture without cell recycling was performed to develop a kinetic model, including parameter determination, to simulate the process of clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. Classic models failed to describe the process and a kinetic model which takes into account the simultaneous consumption of glycerol and nitrogen source, as energy sources, was proposed.

To obtain high cell density, continuous cultivation with cell recycling was carried out. Among the methods examine to concentrate the cell mass, microfiltration was chosen because it is easily operated and allows the obtention of a limp broth, as it is able to separate the totality of the cells from cultivation broth. This process eliminates the separation of cells in downstream processes.

Concerning the problems such as oxygen transfer limitation and increase in the viscosity of culture broth, it has been observed that it does not hinder the applicability of continuous culture with cell recycling.

The present work shows that continuous culture with cell recycling maximizes the productivity, suggesting its utilization for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*.

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 2-1: Formula estrutural de uma penicilina | 4 |
| Figura 2-2: Subgrupos do grupo dos β -lactâmico | 4 |
| Figura 2-3: Fórmula estrutural do ácido clavulânico..... | 7 |
| Figura 2-4: Esquema da rota biossintética proposta para produção de ácido clavulânico, ilustrando os maiores fluxos de carbono (Ives e Bushell, 1997)..... | 10 |
| Figura 2-5: Rota biossintética para a produção de ácido clavulânico de acordo com McGowan <i>et al.</i> (1998)..... | 11 |
| Figura 2-6: Esquema de um cultivo contínuo com reciclo de células..... | 28 |
| Figura 2-7: Camadas de membrana proposto por Ishizaki <i>et al.</i> (1993) para reciclo celular com aeração | 32 |
| Figura 2-8: Esquema do Filtro de vórtex utilizado Ishizaki <i>et al.</i> (1993) para reciclo celular com aeração | 33 |
| Figura 3-1: Esquema do sedimentador, projetado por Hojo (1990), utilizado para avaliar a viabilidade da utilização do processo de sedimentação na separação celular. | 55 |
| Figura 3-2: Desenho do “filtro-centrifuga” utilizado para separação celular..... | 56 |
| Figura 3-3: Corte transversal do módulo de microfiltração utilizado nos experimentos contínuos com reciclo celular..... | 57 |
| Figura 3-4: Desenho da vista lateral do módulo de microfiltração. | 58 |
| Figura 3-5: Fotografia do módulo de microfiltração utilizado nos cultivos contínuos com reciclo celular..... | 58 |
| Figura 3-6: Procedimento adotado para cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> em mesa incubadora rotativa | 62 |
| Figura 3-7: Procedimento adotado para cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> em biorreator de bancada..... | 64 |

| | |
|--|-----|
| Figura 3-8: Aparato experimental para teste do sedimentados utilizado por Hojo (1990) | 69 |
| Figura 3-9: Esquema da separação de células pela força centrífuga | 70 |
| Figura 3-10: Esquema do aparato experimental utilizado para avaliar o processo de microfiltração | 71 |
| Figura 3-11: Esquema do procedimento adotado para a realização dos experimentos contínuos sem reciclo celular | 77 |
| Figura 3-12: Esquema do procedimento utilizado nos cultivos contínuos com reciclo celular | 81 |
| Figura 3-13: Fotografia de um experimento contínuo com reciclo celular | 83 |
| Figura 4-1: Variação da altura de sedimentado com o tempo para concentração inicial de células de $3,78 \text{ g.L}^{-1}$ | 95 |
| Figura 4-2: Variação da altura de sedimentado com o tempo para concentração inicial de células igual de $7,56 \text{ g.L}^{-1}$ | 96 |
| Figura 4-3: Fotografia do caldo de cultivo permeado | 99 |
| Figura 4-4: Perfil do Valor de K (índice de consistência de escoamento) | 100 |
| Figura 4-5: Perfil do Valor de n (índice de comportamento de escoamento)..... | 100 |
| Figura 4-6: Perfis de pH dos experimentos | 100 |
| Figura 4-7: Produção de ácido clavulânico | 100 |
| Figura 4-8: Produtividade dos meios de cultura após 72 horas de cultivo | 101 |
| Figura 4-9: Variação das velocidades de respiração (RCx), velocidade de formação de CO ₂ (CER), quociente respiratório (RQ) e porcentagem de oxigênio dissolvido (%OD) com o tempo de cultivo de <i>S. clavuligerus</i> no experimento Fsoy10 | 102 |

- Figura 4-10: Variação dos parâmetros reológicos (K e n) e das concentrações de células (Cx), glicerol (Cg) e produto (Cp) com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* do experimento Fsoy10 103
- Figura 4-11: Variação dos parâmetros reológicos (K e n) e das concentrações de células (Cx), glicerol (Cg), maltose (Cm) e de produto Cp com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* do experimento Fsoy30..... 103
- Figura 4-12: Regressão linear realizada para o calculo de $Y_{x/s}$ utilizando os valores experimentais de concentração celular (Cx) e concentração de glicerol (Cg) do ensaio Fsoy10 104
- Figura 4-13: Comparação entre os valores experimentais de Cx e o simulado pela equação (4-1) para o ensaio Fsoy10 105
- Figura 4-14: Regressão linear dos valores experimentais de Cx e formação de CO₂ do ensaio Fsoy10 para o calculo de $Y_{CO_2/CX}$ 106
- Figura 4-15: Variação das velocidades de respiração (RCx), velocidade de formação de CO₂ (CER), quociente respiratório (RQ) e porcentagem de oxigênio dissolvido (%OD) com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* no experimento F1, pH=6,2. 107
- Figura 4-16: Variação dos parâmetros reológicos (K e n), concentração de glicerol (Cg) e de produto (Cp) com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* no experimento F1, pH = 6,2..... 107
- Figura 4-17: Variação dos parâmetros reológicos (n e K), das concentrações celulares, de glicerol e produto, Cx, Cg e Cp, com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* no experimento F2, pH = 6,8..... 108
- Figura 4-18: Variação das velocidades de respiração (RCx), velocidade de formação de CO₂ (CER), quociente respiratório (RQ) e porcentagem de oxigênio dissolvido (%OD) com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* no experimento F3, pH=7,4. 109

| | |
|---|-----|
| Figura 4-19: Variação dos parâmetros reológicos (K e n) e das concentrações de células (Cx), glicerol (Cg) e produto (Cp) com o tempo de cultivo de <i>S. clavuligerus</i> no experimento F3, pH = 7,4..... | 109 |
| Figura 4-20: Valores da concentração de glicerol (a), velocidade de produção (b) e da concentração de produto (c) dos experimentos F1, F2 e F3 no decorrer do tempo de cultivo | 111 |
| Figura 4-21: Variação dos parâmetros reológicos, concentração celular (Cx), concentração de glicerol (Cg), concentração de maltose (Cm) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com o tempo no cultivo de <i>S. clavuligerus</i> do experimento FS301..... | 113 |
| Figura 4-22: Variação dos parâmetros reológicos, concentração celular (Cx), concentração de glicerol (Cg) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com o tempo no cultivo de <i>S. clavuligerus</i> do experimento FS302..... | 113 |
| Figura 4-23: Variação dos parâmetros reológicos, concentração celular (Cx), concentração de glicerol (Cg) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com o tempo no cultivo de <i>S. clavuligerus</i> do experimento FS202 | 114 |
| Figura 4-24: Variação dos parâmetros reológicos, concentração de células (Cx), concentração de glicerol (Cg) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com o tempo no cultivo de <i>S. clavuligerus</i> do experimento FS102..... | 114 |
| Figura 4-25: Valores de (a) concentração de ácido clavulânico, (b) velocidade global de produção e (c) concentração de glicerol dos experimentos FS301, FS302, FS202 e FS102 no decorrer do cultivo | 115 |
| Figura 4-26: Perfis de concentração de glicerol (Cg) e de ácido clavulânico (Cp) com o tempo de cultivo para testar o produtividade do segundo lote de microrganismos logo após sua confecção (T1)..... | 118 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4-27: Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp) com o tempo de cultivo para testar o produtividade do segundo lote de microrganismos após 6 meses da sua confecção (T2)..... | 119 |
| Figura 4-28: Perfis de concentração de glicerol (Cg) e de ácido clavulânico (Cp) com o tempo de cultivo para testar o produtividade do terceiro lote de microrganismos logo após sua confecção (T3) | 120 |
| Figura 4-29: Comparação dos perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp) dos três lotes de microrganismos (FS202, T1 e T3) | 120 |
| Figura 4-30: Perfil de concentração de glicerol (Cg) e de ácido clavulânico (Cp) durante o experimento P1 | 121 |
| Figura 4-31: Comparação entre os perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp) com o tempo de cultivo nos experimentos P1 e T3..... | 122 |
| Figura 4-32: Variação da velocidade de produção de ácido clavulânico (V_{ac}) com o tempo de cultivo nos experimentos P1 e T3..... | 122 |
| Figura 4-33: Variação das velocidades de respiração (RCx), velocidade de formação de CO ₂ (CER) e quociente respiratório (RQ) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C1 (MP1)..... | 124 |
| Figura 4-34: Variação dos parâmetros reológicos (K e n), concentração celular (Cx), concentração de glicerol (Cg), concentração de maltose (Cm) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C1 (MP1)..... | 124 |
| Figura 4-35: Variação das velocidades de respiração (RCx), velocidade de formação de CO ₂ (CER) e quociente respiratório (RQ) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C2 (MP2)..... | 127 |

- Figura 4-36: Variação dos parâmetros reológicos, concentração celular (C_x), concentração de glicerol (C_g) e concentração de ácido clavulânico (C_p) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C2 (MP2)..... 127
- Figura 4-37: Variação das velocidades de respiração (RC_x), velocidade de formação de CO_2 (CER) e quociente respiratório (RQ) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C3 (MP5)..... 130
- Figura 4-38: Variação dos parâmetros reológicos (K e n), concentração celular (C_x), concentração de glicerol (C_g) e concentração de ácido clavulânico (C_p) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C3 (MP5)..... 130
- Figura 4-39: Variação da Concentração de nitrogênio orgânico (C_n) e de nitrogênio na forma de amônia (C_{NH_3}) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C3 (MP5)..... 131
- Figura 4-40: Variação da velocidade de respiração (RC_x), velocidade de formação de CO_2 (CER) e quociente respiratório (RQ) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C4 (MP5)..... 134
- Figura 4-41: Variação dos parâmetros reológicos (K e n), concentração celular (C_x), concentração de glicerol (C_g) e concentração de ácido clavulânico (C_p) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C4 (MP5)..... 135
- Figura 4-42: Variação da Concentração de nitrogênio orgânico (C_n) e de nitrogênio na forma de amônia (C_{NH_3}) com com a taxa de diluição (D) durante o experimento C4 (MP5)..... 135
- Figura 4-43: Variação dos parâmetros reológicos (K e n), concentração celular (C_x), concentração de glicerol (C_g) e concentração de ácido clavulânico (C_p) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C7 (MP5)..... 138

| | |
|--|-----|
| Figura 4-44: Variação da Concentração de nitrogênio orgânico (C_n) e de nitrogênio na forma de amônia (C_{NH_3}) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C7 (MP5)..... | 139 |
| Figura 4-45: Variação das velocidades de respiração ($R.C_x$) com a taxa de diluição (D) nos experimentos C1, C2, C3 e C4..... | 141 |
| Figura 4-46: Variação das velocidades de formação de dióxido de carbono (CER) com a taxa de diluição (D) nos experimentos C1, C2, C3 e C4..... | 141 |
| Figura 4-47: Variação da velocidade de consumo de glicerol com a taxa de diluição nos experimentos C1, C2, C3, C4 e C7 | 142 |
| Figura 4-48: Variação da concentração de produto (C_p) com os tempos de residência hidráulico (θ_h) e celular (θ_c) nos cultivos contínuos com reciclo celular | 148 |
| Figura 4-49: Variação da Produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) com os tempos de residência hidráulico (θ_h) e celular (θ_c) nos experimentos contínuos com reciclo celular | 148 |
| Figura 4-50: Ajuste de μ_{max} e K_s do modelo de Monod pela equação 3-17 utilizando os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7. | 152 |
| Figura 4-51: Ajuste de μ_{max} e K_s do modelo de Monod pela equação 3-17 para os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7 separadamente | 153 |
| Figura 4-52: Determinação de $Y_{X/G}$ para todos os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7 | 153 |
| Figura 4-53: determinação de $Y_{X/G}$ para os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7 separadamente..... | 154 |
| Figura 4-54: Comparação entre os valores experimentais do cultivo C4 com os valores simulados pelo modelo baseado na cinética de Monod..... | 156 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4-55: Comparação entre os valores experimentais do cultivo C3 com os valores simulados do modelo baseado na cinética de Contois..... | 157 |
| Figura 4-56: Comparação dos valores simulados pelo modelo de Contois com os valores experimentais de C4 e C7 | 158 |
| Figura 4-57 Comparação entres os valores obtidos de taxa de diluição (D) no experimento C4 e os simulados pelo modelo considerando a cinética de Contois para os dois substrato..... | 160 |
| Figura 4-58: Comparação entres os valores de taxa de diluição (D) obtidos no experimento C3 e os simulados pelo modelo considerando a cinética de Contois para os dois substratos..... | 161 |
| Figura 4-59: Comparação entre os valores experimentais do cultivo C4 com os valores simulados pelo modelo ajustado a esse cultivo | 161 |
| Figura 4-60: Comparação entre o os valores experimentais do experimento C3 e os valores simulados pelo modelo proposto..... | 162 |
| Figura 4-61: Comparação entre o os valores experimentais dos experimentos C4 e C7 e os valores simulados pelo modelo proposto | 163 |
| Figura 4-62: Variação da concentração de produto (C_p) com os tempos de residência hidráulico (θ_h) e celular (θ_c) simulados para os cultivos contínuos com reciclo celular | 166 |
| Figura 4-63: Variação da produtividade em ácido clavulanico (P_{ac}) com os tempos de residência hidráulico (θ_h) e celular (θ_c) simulados para os cultivos contínuos com reciclo celular | 167 |
| Figura 4-64: Valores do parâmetro reológico K com a concentração celular e o ajustes do modelo da lei da potência (eq. 2-21, ajuste 1) e da correlação proposta por Goudar <i>et al.</i> (1999) (eq. 2-22, ajuste 2) para todos os ensaios contínuos..... | 168 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4-65: Valores do parâmetro reológico (n) com a concentração celular (C_x) e o ajuste da equação da logística (eq. 2-23, ajuste 1) descrita por Goudar <i>et al.</i> (1999) para todos os ensaios contínuos..... | 169 |
| Figura 4-66: Valores experimentais da velocidade específica de consumo de oxigênio (R) com a taxa de diluição (D) para a determinação dos parâmetros de respiração do experimento C1 | 171 |
| Figura 4-67: Valores experimentais da velocidade específica de consumo de oxigênio (R) com a taxa de diluição (D) para a determinação dos parâmetros de respiração do experimento C2 | 171 |
| Figura 4-68: Valores experimentais da velocidade específica de consumo de oxigênio (R) com a taxa de diluição (D) para a determinação dos parâmetros de respiração do experimento C3 | 172 |
| Figura 4-69: Valores experimentais da velocidade específica de consumo de oxigênio (R) com a taxa de diluição (D) para a determinação dos parâmetros de respiração do experimento C4 | 172 |
| Figura 4-70: Valores de k_{La} em função da viscosidade aparente (μ_{ap}) para os cultivos realizados | 173 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|-----|
| Tabela 2-1: Esquema geral de classificação das β -lactamases proposta por Bush (1989, <i>apud</i> Moreira 1998)..... | 6 |
| Tabela 3-1: Meios de cultura utilizado para a reativação do microrganismo..... | 52 |
| Tabela 3-2: Meios de culturas utilizados para estudar a influência dos sais na produção de ácido clavulânico por <i>Streptomyces clavuligerus</i> | 53 |
| Tabela 3-3: Meios de produção utilizados para ensaios contínuos, estudo da influência da concentração de fonte de nitrogênio e a importância do extrato de malte na produção de ácido clavulânico por <i>S. clavuligerus</i> | 54 |
| Tabela 3-4: Valores dos tempos de residência (θ) e das taxas de diluição (D) no qual se operou o reator nos ensaios contínuos sem reciclo celular..... | 79 |
| Tabela 3-5: Valores dos tempos de residência hidráulico e celular em que se operou o sistema nos experimento CR1, CR3, CR5 e CR6 | 82 |
| Tabela 4-1: Resultados dos testes de microfiltração; valores de vazão (Q), velocidade tangencial (v), fluxo de permeado e coeficiente de rejeição (R_e)..... | 98 |
| Tabela 4-2: Valores de $C_{X_{Max}}$, μ_{max} , $C_{p_{max}}$, P_{ac} , Pe_{ac} e Vac_{max} dos experimento F1 (pH=6,2), F2 (pH=6,8) e F3 (pH=7,4) | 110 |
| Tabela 4-3: Valores de $C_{X_{Max}}$, μ_{max} , $C_{p_{max}}$, P_{ac} , Pe_{ac} e Vac_{max} dos experimento FS301 (meio MP3) , FS302 (meio MP4) , F202 (meio MP5) e FS102 (meio MP2)..... | 115 |
| Tabela 4-4: Valores da concentrações de células (Cx), de glicerol (Cg), de maltose (Cm) e de ácido clavulânico (Cp), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica do microrganismo (Pe_{ac}) obtidas nas cinco taxas de diluição do cultivo C1 (meio MP1). | 126 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 4-5: Valores da concentrações de células (Cx), de glicerol (Cg) e de ácido clavulânico (Cp), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica do microrganismo (Pe_{ac}) obtidas nas seis taxas de diluição do cultivo C2 (meio MP2)..... | 129 |
| Tabela 4-6: Valores de concentrações de células (Cx), de glicerol (Cg) e de ácido clavulânico (Cp), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica (Pe_{ac}) obtidas nas sete taxas de diluição do cultivo C3 (MP5)..... | 133 |
| Tabela 4-7: Valores da concentrações de células (Cx), de glicerol (Cg) e de ácido clavulânico (Cp), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica (Pe_{ac}) obtidas nas cinco taxas de diluição do cultivo C4 (MP5) | 137 |
| Tabela 4-8: Valores da concentração de células (Cx), de glicerol (Cg) e de ácido clavulânico (Cp), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica obtidas nas cinco taxas de diluição de C7 (MP5)..... | 140 |
| Tabela 4-9: Valores de $C_{X_{Max}}$, $C_{p_{max}}$, P_{ac} , Pe_{ac} e a taxa de diluição ($D_{P_{ac}}$) em que se obteve a maior produtividade volumétrica em ácido clavulânico dos experimentos contínuos sem reciclo celular | 143 |
| Tabela 4-10: Valores experimentais das concentrações de células (Cx), de glicerol (Cg), de ácido clavulânico (Cp), de nitrogênio orgânico (Cn) e de amônia (C_{NH_3}) obtidos nos experimentos contínuos com reciclo celular (CR1, CR3, CR5 e CR6)..... | 145 |
| Tabela 4-11: Valores das produtividades em ácido clavulânico (P_{ac}) e das produtividades específicas (Pe_{ac}) obtidos nos experimentos contínuos com reciclo celular. | 147 |
| Tabela 4-12: Maiores valores de $C_{X_{Max}}$, $C_{p_{max}}$, P_{ac} , Pe_{ac} obtidos nos experimentos em batelada, contínuos com e sem reciclo celular. | 149 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 4-13: Valores das concentração de ácido clavulânico (C_p), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica (Pe_{ac}) dos experimentos C3, CR6 e CR5 | 150 |
| Tabela 4-14: Valores de $Y_{X/G}$, μ_{max} , K_s e do coeficiente de correlação (R^2) para os cultivos C3, C4 e C7 juntos e separadamente. | 155 |
| Tabela 4-15: Valores dos parâmetros do modelo baseado na cinética de Contois determinados a partir dos cultivos C3, C4 e C7 juntos e separadamente..... | 157 |
| Tabela 4-16: Valores dos parâmetros do modelo proposto ajustado aos valores experimentais de C3, C4 e C7 juntos e separadamente..... | 159 |
| Tabela 4-17: Valores das concentrações de células (C_x), glicerol (C_g) e de produto (C_p) e das produtividades em ácido clavulânico (P_{ac}) e específicas (Pe_{ac}) simulados pelo modelo | 165 |
| Tabela 4-18: Valores dos parâmetros das correlações entre os valores dos parâmetros reológicos K e n com os valores de concentração celular. | 170 |
| Tabela 4-19: Valores dos parâmetros de respiração celular dos experimentos C1 e C4 | 173 |
| Tabela D-1: Composição do Samprosoy 90 NB | 206 |

Nomenclatura

%OD: porcentagem de oxigênio dissolvido (%)

a_1 : parâmetro da equação 3-2 ($\text{g.cm}^{2.a^2}.\text{s}^{-n.a^2}.\text{L}^{-1}.\text{dina}^{-a^2}$)

a_2 : parâmetro da equação 3-2 (adimensional)

a_3 : parâmetro da equação 3-2 (adimensional)

c : constante da equação de Goudar *et al.* (1999) (L.g^{-1})

c_i : coeficientes de equações pseudo estequiométricas

CER: velocidade de formação de dióxido de carbono ($\text{mol}_{\text{CO}_2}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

C_g : concentração de glicerol (g.L^{-1})

C_{g_i} : concentração inicial de glicerol (g.L^{-1})

C_m : concentração de maltose (g.L^{-1})

C_n : concentração da fonte de nitrogênio orgânica (g.L^{-1})

C_{n_0} : concentração inicial da fonte de nitrogênio orgânica (g.L^{-1})

C_{NH_3} : concentração de amônia (g.L^{-1})

C_{O_2} : concentração de oxigênio dissolvido (mmol.L^{-1})

$C_{\text{O}_2}^*$: concentração de saturação de oxigênio dissolvido (mmol.L^{-1})

C_p : concentração de ácido clavulânico (mg.L^{-1})

$C_{p_{\text{max}}}$: concentração máxima de ácido clavulânico (mg.L^{-1})

C_{p_0} : concentração de produto que entra no reator (mg.L^{-1})

C_{p_e} : concentração de sólidos no permeado (g.L^{-1})

C_r : concentração de sólidos no retido (g.L^{-1})

C_s : concentração do substrato limitante (g.L^{-1})

C_{s_0} : concentração de substrato na corrente de alimentação do reator (g.L^{-1})

C_{s_i} : concentração inicial do substrato limitante (g.L^{-1})

- C_x: concentração celular (g.L⁻¹)
- C_{x0}: concentração de células na corrente de alimentação do reator (g.L⁻¹)
- C_{x_i}: concentração inicial de células (g.L⁻¹)
- C_{x_{max}}: maior concentração celular (g.L⁻¹)
- d: constante da equação da logística (L.g⁻¹)
- D: taxa de diluição (h⁻¹)
- e: constante da equação da logística (adimensional)
- F₁: vazão de alimentação de meio de cultivo (L.h⁻¹)
- F₃: vazão de retirada de caldo do reator com celular (L.h⁻¹)
- J: fluxo de permeado (L.h⁻¹.m⁻²)
- j: parâmetro do modelo de Moser (adimensional)
- k: constante da equação 3-33, proposta por Metzner *et al.* (1961) (adimensional)
- 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)
- Kf: valor final de K (dina.sⁿ.cm⁻²)
- K_j: constante de saturação do substrato j (g.L⁻¹)
- k_{La}: coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h⁻¹)
- Ko: valor inicial de K (dina.sⁿ.cm⁻²)
- Ks: constante de saturação ou constante de meia velocidade (g.L⁻¹)
- Ks₀: parâmetro das equações 2-8 e 2-9 (adimensional)
- Ks₁: parâmetro da equação 2-9 (g.L⁻¹)
- k_v: constante do modelo proposto por Verlhulst (1844) e Pearl and Reed (1920) (h⁻¹)
- Kx: parâmetro do modelo de Contois (g_s.g_x⁻¹)
- Kx₁: constante de Contois o crescimento associado ao consumo de glicerol (g_g.g_x⁻¹)

K_{X_2} : constante de Contois o crescimento associado ao consumo de nitrogênio orgânico ($g_N \cdot g_x^{-1}$)

m : constante de manutenção do microrganismo ($g_s \cdot g_x^{-1} \cdot h^{-1}$)

m_0 : velocidade de consumo de oxigênio para manutenção celular ($g_{O_2} \cdot g_x^{-1} \cdot h^{-1}$)

n : índice de comportamento de escoamento (adimensional)

N : frequência de agitação (Hz)

n_{ro} : número de substratos limitante (adimensional)

N_{O_2} : velocidade de transferência de oxigênio ($mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

n_f : valor final de n (adimensional)

P : pressão atmosférica (mmHg)

p_1 : parâmetro da lei da potência ($dina \cdot s^n \cdot cm^{-2} \cdot L^{p_2} \cdot g^{-p_2}$)

P_1 : produto associado ao crescimento

p_2 : parâmetro da lei da potência (adimensional)

P_2 : produto não associado ao crescimento

P_{ac} : produtividade em ácido clavulânico ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

Pe_{ac} : produtividade específica do microrganismo ($mg \cdot g_x^{-1} \cdot h^{-1}$)

N : representa fonte de nitrogênio

R : velocidade de respiração específica ($g_{O_2} \cdot g_x^{-1} \cdot h^{-1}$)

R_e : coeficiente de rejeição (adimensional)

r_m : velocidade de morte celular ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

r_p : velocidade global de produção ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

RQ : quociente de respiração ($mol_{CO_2} \cdot mol_{O_2}^{-1}$)

r_s : velocidade de consumo de substrato ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

r_x : velocidade de crescimento celular ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

S: representa o substrato limitante

t: tempo de cultivo (h)

V: volume do reator (L)

Vac: velocidade de produção de ácido clavulânico ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Vac_{max}: velocidade global máxima de produção de ácido clavulânico ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

w_j: peso de cada um dos substratos utilizado na equação 2-11 e 2-12(adimensional)

X: representa células

Y_{O₂}: fração molar de oxigênio (%)

Y_{CO₂}: fração molar de dióxido de carbono (%)

Y_{X/G}: coeficiente de rendimento de glicerol a células ($\text{g}_x.\text{g}_g^{-1}$)

Y_{X/N}: coeficiente de rendimento de nitrogênio orgânico a células ($\text{g}_x.\text{g}_N^{-1}$)

Y_{y/o}: coeficiente de rendimento de oxigênio a celular($\text{g}_x.\text{g}_{O_2}^{-1}$)

Y_{X/S}: coeficiente de rendimento de substrato a células ($\text{g}_x.\text{g}_s^{-1}$)

Letras gregas

α : relação entre velocidade de produção pela velocidade de crescimento celular

($\text{mg}_p.\text{g}_x^{-1}$)

α_1 : constante da equação 3-34 ($\text{cm}^{2.\beta_1}.\text{dina}^{-\beta_1}.\text{s}^{-\beta_1}.\text{h}^{-1}$)

β : constante de formação de produto ($\text{mg}_p.\text{g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$)

β_1 : constante da equação 3-34 (adimensional)

ΔP : pressão transmembrânica (mmHg)

ϕ_e : vazão molar de ar na entrada do reator

γ : velocidade de cisalhamento ou gradiente de velocidade (s^{-1})

η_1 : relação entre a velocidade de crescimento celular e a velocidade de consumo de glicerol para o crescimento celular ($g_g \cdot g_x^{-1}$).

η_2 : relação entre a velocidade de crescimento celular e a velocidade de consumo de fonte de nitrogênio para o crescimento celular ($g_n \cdot g_x^{-1}$)

μ : velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

μ_1 : velocidade específica de crescimento relacionado ao consumo de glicerol (h^{-1})

μ_2 : velocidade específica de crescimento relacionado ao consumo de nitrogênio orgânico (h^{-1})

μ_{ap} : viscosidade aparente ($dina \cdot cm^{-2} \cdot s$)

$\mu_{m\acute{a}x}$: velocidade máxima de crescimento celular (h^{-1})

$\mu_{m\acute{a}x1}$: velocidade máxima específica de crescimento relacionado ao consumo de glicerol (h^{-1})

$\mu_{m\acute{a}x2}$: velocidade máxima específica de crescimento relacionado ao consumo de nitrogênio orgânico (h^{-1})

θ : tempo de residência

θ_c : tempo de residência celular

θ_h : tempo de residência hidráulico

τ : tensão de cisalhamento ($dina \cdot cm^{-2}$)

ϖ : constantes do modelo proposto por Verlhulst (1844) e Pearl and Reed (1920) ($L \cdot g^{-1}$)

1. Introdução

A descoberta da penicilina tornou possível o tratamento de várias infecções provocadas por bactérias, pois os tratamentos convencionais existentes na época não eram eficazes.

Embora a descoberta da penicilina tenha representado um grande avanço no tratamento de várias doenças, este medicamento apresenta limitação quando utilizada para o tratamento de infecções provocadas por algumas bactérias. Deste modo foi estudado um grande número de compostos com um maior e diferenciado espectro de ação (Lima *et al.* 1975). Atualmente, são conhecidos vários compostos com atividade antibacteriana que podem ser classificados de acordo com sua estrutura química. O grupo mais utilizado atualmente é aquele que apresenta o anel β -lactâmico devido a sua eficiência contra várias infecções bacteriana e poucos efeitos colaterais (Baggaley *et al.* 1997).

No entanto, a eficácia antibacteriana dos antibióticos β -lactâmicos em geral vem diminuindo devido à capacidade de algumas bactérias produzirem β -lactamases, enzimas que clivam o anel β -lactâmico desses compostos, privando-os de sua atividade antibacteriana.

Dentre as várias estratégias para se contornar este problema foi proposta a utilização de um inibidor de β -lactamase juntamente com um antibiótico β -lactâmico. Dentre os inibidores de β -lactamase conhecidos, o ácido clavulânico se destaca devido a sua habilidade de inibir irreversivelmente uma grande gama de β -lactamases (Baggaley *et al.* 1997).

Atualmente o ácido clavulânico é utilizado em conjunto com a amoxicilina ou ticarcilina, antibióticos β -lactâmicos de alta capacidade antibacteriana (Baggaley *et al.*, 1997). Medicamentos contendo amoxicilina e clavulanato de potássio são comercializados no Brasil pelos laboratórios Rambaxy (genérico), Haller (Clavoxil), Aché (Novamox) e GlaxoSmithKline Farmacêutica (Clavulim) (<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/lista/registrados.htm>, acessada em 11/06/2003).

O ácido clavulânico pode ser produzido industrialmente através de cultivos de várias espécies de *Streptomyces*, dentre os quais se destaca o *Streptomyces clavuligerus* (Butterworth, 1984). Este autor cita que não há informações quanto ao processo industrial, baseando seu trabalho em patentes e resultados de planta piloto com fermentador de 1500 litros.

Com vista à melhoria do processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, o presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de processo contínuo de produção de ácido clavulânico com alta concentração celular. Para tal, as células da corrente de saída foram separadas, utilizando um módulo de microfiltração, e recicladas para o biorreator. Preliminarmente foi investigada a influência do pH na velocidade de produção do processo para evitar que essa variável influenciasse nos resultados obtidos. Também foi examinada a composição do meio de cultura principalmente quanto ao teor de nitrogênio, evitando assim, limitação do processo pela fonte de nitrogênio. Ainda, foram realizados cultivos contínuos sem reciclo celular visando o estabelecimento da cinética deste bioprocessos para a aplicação no processo com reciclo celular.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Resistência aos Antibióticos β -lactâmicos

O grupo dos antibióticos β -lactâmicos se caracterizam por possuírem o anel β -lactâmico em sua estrutura o que lhe confere a atividade antibacteriana. A Figura 2-1 mostra a estrutura de uma penicilina, exemplo típico de antibiótico β -lactâmico.

O grupo dos antibióticos β -lactâmicos pode ser dividido em cinco subgrupos, dependendo do radical ligado ao anel β -lactâmico, e são mostrados na Figura 2-2.

Dentre os vários antibióticos existentes, os antibióticos β -lactâmicos representam uma grande parte do mercado de antibióticos. De acordo com Pereira Jr (1996, *apud* Araújo, 1996), a importação de antibióticos β -lactâmicos no ano de 1992 foi de cerca de 60% de todos os produtos terapêuticos utilizados no Brasil. De acordo com o mesmo, as importações de penicilinas e cefalosporinas correspondem a 34% e 60%, respectivamente, das importações de antibióticos β -lactâmicos. Cabe ressaltar que o mercado brasileiro é o quarto maior mercado mundial de fármacos e movimentava até o final da década de 90 cerca de US\$ 10 bilhões (<http://cbme.if.sc.usp.br/inovacao/panorama.html>, acessada em 11/06/2003).

O mercado de antibiótico representa uma boa fatia do mercado de fármacos e movimenta anualmente em torno de US\$ 20 bilhões e cresce em média 9% ao ano (<http://einstein.ajato.com.br/cimdes.htm>, acessada em 30/7/2004)

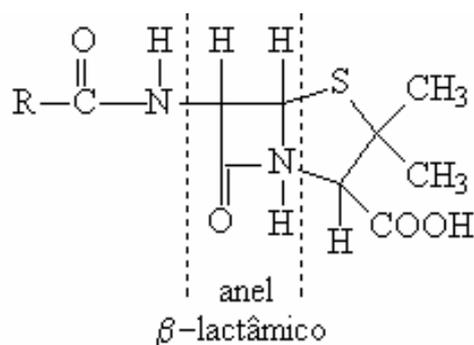
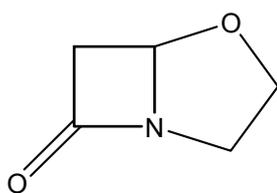


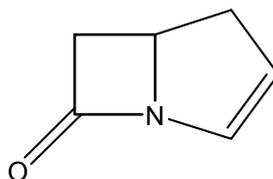
Figura 2-1: Formula estrutural de uma penicilina

Durante os últimos anos vem ocorrendo um aumento da resistência aos antibióticos, inclusive aos β -lactâmicos, refletindo-se nos vários trabalhos, que podem ser encontrados em literatura relatando esse fato.

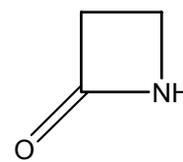
O professor Edmar Chartone de Souza da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) alertou que “os antibióticos estão perdendo a luta contra as bactérias, o que pode ser notado pelo ressurgimento de epidemias de pneumonia no mundo inteiro e do aumento de casos de tuberculose” (Folha de São Paulo, 16/07/97).



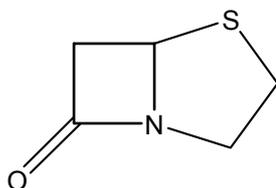
Clavans



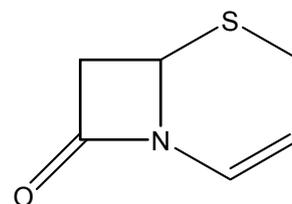
Carbapenens



Monobactans



Penicilinas



Cefamicinas e Cefalosporinas

Figura 2-2: Subgrupos do grupo dos β -lactâmico

Neely e Holder (1999) apresentam vários dados sobre o aumento da resistência de várias bactérias ao tratamento com antibióticos, citando numerosos pesquisadores e institutos de pesquisa em saúde. Dos dados citados, destaca-se o aumento da resistência de *Escherichia coli* nos Estados Unidos, que era de 4,8% no período de 1978 a 1982 subiu para 35,5% no período de 1993 a 1997 (arquivos do “National Nosocomial Infections Surveillance”, NNIS). Os autores também citam o aumento da resistência de *Klebsiella pneumoniae* a ceftazidime que era de 0% e foi para 16 % nos mesmos períodos (arquivos do NNIS).

Os antibióticos β -lactâmicos também estão perdendo a sua eficiência no tratamento de algumas doenças provocadas por bactérias devido ao aumento da resistência. Em hospitais portugueses, pesquisas mostram que número relativo de linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilinas cresceu de 50% na década de 50 para 96% em 1999 (http://ordemfarmaceuticos.mind.pt/33-boletim_cima/33-Boletim-cima_30htm, acessada em 15/12/2002).

De acordo com a revisão realizada por Therrien *et al.* (2000) linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* estão se tornando resistentes a antibióticos. Os autores, citando o trabalho de Neu (1992), relatam que, no início da década de 80, não havia resistência dessas bactérias aos antibióticos utilizados para o tratamento de infecções causadas por elas, porém, 25% dessa espécie se mostravam resistentes á ação desses antibióticos no início da década de 90.

De acordo com Craig (2001, *apud* File Jr *et al.*, 2002), cerca de 42 % das linhagens de *Streptococcus pneumoniae* não são sensíveis a penicilinas ($MIC \geq 0,12$ mg.L⁻¹) e 26% são resistentes ($MIC \geq 2$ mg.L⁻¹) ao uso desses antibióticos em todo o mundo (onde MIC é a concentração mínima para inibição).

Para explicar a resistência de bactéria à ação de antibióticos, Abraham e Chain (1940, *apud* Baggaley *et al.*, 1997), realizaram estudos sobre as bactérias resistentes às penicilinas e concluíram que essas são capazes de produzir enzimas que clivam o anel β -lactâmico. Estas enzimas são conhecidas como β -lactamases.

Como descrito no trabalho de Baggaley *et al.* (1997), as β -lactamases inativam os antibióticos β -lactâmicos, hidrolizando os seus anéis β -lactâmicos e gerando produtos de degradação sem atividade antibacteriana.

De acordo com os mesmos autores, existem vários tipos de classificações para as β -lactamases de acordo com a localização da seqüência genética das bactérias que contém o gene responsável pela sua biossíntese, da seletividade quanto ao substrato e outros fatores. A Tabela 2-1 ilustra a classificação proposta por Bush (1989, *apud* Moreira, 1998).

Tabela 2-1: Esquema geral de classificação das β -lactamases proposta por Bush (1989, *apud* Moreira 1998)

| Grupo | Subtítulo | Substrato | Inibida por Ácido clavulânico | Enzimas representativas |
|-------|-----------|-----------------------------|-------------------------------|---|
| 1 | CEP-N | cefalosporinas | Não | Enzimas cromossomiais de bactéria gram-negativas |
| 2a | PEN-Y | Penicilinas | Sim | Penicilinas de bactérias gram-positivas |
| 2b | BDS-Y | Cefalosporinas, penicilinas | Sim | TEM-1, TEM-2 |
| 2b' | EBS-Y | Cefalosporinas, penicilinas | Sim | TEM-3, TEM-5 |
| | | cefataxine | | |
| 2c | CAR-Y | Penicilinas carbenicilina | Sim | PSE-1, PSE-3, PSE-4 |
| 2d | CLX-Y | Penicilinas, cloxacilina | sim* | OXA-1, PSE-2 |
| 2e | CEP-Y | cefalosporinas | Sim | Enzimas produzidas por <i>Proteus vulgaris</i> |
| 3 | MET-N | Variável | Não | Enzimas produzidas por <i>Bacillus cereus</i> II |
| 4 | PEN-N | Penicilinas | Não | Enzimas produzidas por <i>Pseudomonas cepacia</i> |

* inibição de ácido clavulânico deve ocorrer a altas concentrações para alguns membros

2.2. Ácido Clavulânico

Devido ao aumento da resistência de algumas bactérias aos antibióticos β -lactâmicos ao longo dos anos, houve necessidade de encontrar inibidores de β -lactamases para serem utilizados em conjunto com esses antibióticos, visando melhorar a sua eficiência. Atualmente, pode-se citar, como inibidores de β -lactamases, o valclavan, as clavamicinas e o ácido clavulânico, sendo todos do subgrupo “clavam” do grupo dos β -lactâmicos (Figura 2-2) (Baggaley *et al.*, 1997). O ácido clavulânico é formado pelos anéis β -lactâmico e oxazolidino, tal como visto na Figura 2-3.

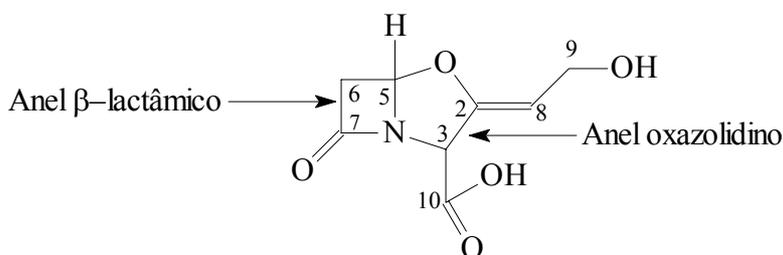


Figura 2-3: Fórmula estrutural do ácido clavulânico

O ácido clavulânico foi identificado como um inibidor da β -lactamase a partir de culturas de *Streptomyces clavuligerus*, através de estudos realizados por Brown *et al.* (1976), pesquisadores da GlaxoSmithKline. Estes estudos descrevem a quantidade mínima de ampicilina, na presença e na ausência de ácido clavulânico, para agir efetivamente contra uma colônia de bactérias produtoras de β -lactamases. No caso em que houve a adição do inibidor de β -lactamase, observou-se a necessidade de uma concentração de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina para agir efetivamente e, no caso em que não houve a adição do ácido clavulânico, a concentração necessária de antibiótico foi de 500 $\mu\text{g/ml}$ para se obter o mesmo resultado.

De acordo com Butterworth (1984), o ácido clavulânico, que possui uma baixa atividade bactericida, é normalmente utilizado junto a outro antibiótico, geralmente uma

penicilina por apresentar uma alta atividade antibacteriana. Com isso, o ácido clavulânico é encontrado em medicamentos na forma de sais de metais alcalinos, como clavulanato de potássio, em conjunto com antibióticos, como a amoxicilina. As formulações desses medicamentos e modo de uso constam na patente da Beecham Research Laboratories (Patent Number US 4441609; Croeley, 1984) que expirou em 2001.

Tal combinação vem sendo amplamente receitada para o tratamento de várias infecções provocadas por bactérias. As vendas da GlaxoSmithKline de Augmentin, contendo amoxicilina mais clavulanato de potássio, foi de 1,191 bilhões de libras em 2002 mas apresentou uma queda e as vendas ficaram em 825 milhões de libras em 2003. Este medicamento representou um pouco menos de 50% nas vendas de antibióticos no ano de 2003 dessa empresa (<http://www.gsk.com/financal/rebs03/2003-20F.pdf>, acessado em 30/07/2004). De acordo com o mesmo relatório, a introdução da versão genérica do Augmentin no mercado norte americano em 2002 e a perda da proteção pela patente em muitos países da Europa são os responsáveis pela queda nas vendas.

Cabe ressaltar que existem, em literatura, trabalhos recentes ligados a utilizações de ácido clavulânico em tratamentos contra infecções causadas por bactérias patogênicas.

Therrien *et al.* (2000) em seus testes com a β -lactamase PSE-4 juntamente com o microrganismo *E. Coli* DH5 α demonstraram a necessidade de uma concentração 400 vezes menor e 80 vezes menor quando se adicionou ácido clavulânico a amoxicilina e a ticarcilina, respectivamente.

Ball *et al.* (1997, *apud* File JR *et al.*, 2002) descrevem que a sensibilidade de *S. pneumoniae* é de 97,5% e 91,1% em hospitais europeus e norte americano aos medicamentos contendo ácido clavulânico e amoxicilina em sua formulação. Nesse

trabalho, os autores ressaltam que a utilização dessa formulação para o tratamento de enfermidades causadas por esse microrganismo se iniciou há 20 anos.

Quanto a biossíntese de ácido clavulânico, foi sugerido inicialmente uma rota biossintética similar a das penicilinas e cafosporinas, por causa da semelhança entre as estruturas químicas dos antibióticos β -lactâmico com a do inibidor de β -lactamase (Butterworth, 1984). No entanto, a “teoria do tripeptídeo”, proposta por Fawcett *et al.* (1976, *apud* Butterworth, 1984), não pôde ser aplicada devido às diferenças entre as estruturas do ácido clavulânico e dos antibióticos β -lactâmicos.

Estudos realizados por Elson *et al.* (1981, *apud* Butterworth, 1984) têm auxiliado na elucidação da rota biossintética da produção do ácido clavulânico. Estes estudos sugerem que parte da estrutura do ácido clavulânico é oriunda, provavelmente, do ácido glutâmico.

Gutman *et al.* (1985) demonstraram que o ácido β -hidroxipropiônico é um produto conhecido do metabolismo do glicerol. Os autores chegam a propor que o ácido clavulânico é oriundo da junção entre a molécula de ácido β -hidroxipropiônico e de um aminoácido apropriado, talvez o ácido glutâmico ou a ornitina.

Romero *et al.* (1986) estudaram a influência da arginina, do ácido glutâmico e da ornitina na produção do ácido clavulânico. Estes estudos sugerem que os 3 carbonos do anel β -lactâmico, C5, C6 e C7 (Figura 2-3) são originários do glicerol e os carbonos C2, C3, C8, C9 e C10 são derivados da ornitina, podendo essa ser sintetizada a partir da arginina ou do ácido glutâmico através do ciclo da arginina como descrito por Valentine *et al.* (1993) e mostrado na Figura 2-4.

Valentine *et al.* (1993) concluíram em seus trabalhos que os carbonos C2, C3, C8, C9 e C10 são derivados da arginina. Essas conclusões baseiam-se no fato de que um microrganismo incapaz de produzir arginina, a partir da ornitina, não produz ácido

clavulânico em meio utilizando ornitina como fonte de nitrogênio. Com isto, os autores concluíram que a arginina é o último precursor na rota biossintética de produção de ácido clavulânico.

Ives e Bushell (1997) descrevem em seu trabalho que os carbonos C5, C6 e C7 do ácido clavulânico são oriundos do piruvato, produto resultante do metabolismo de substratos como glicose e glicerol. Neste trabalho há a descrição do fluxo de carbono no metabolismo do *Streptomyces clavuligerus*. Tal representação pode ser visualizada na Figura 2-4.

Pitlik e Townsend (1997) sugerem em seus estudos que o piruvato é o último precursor responsável pela formação dos carbonos C5, C6 e C7 ao invés do glicerol. Já Thirkettle *et al.* (1997) concluíram que realmente o piruvato é o responsável por tal formação.

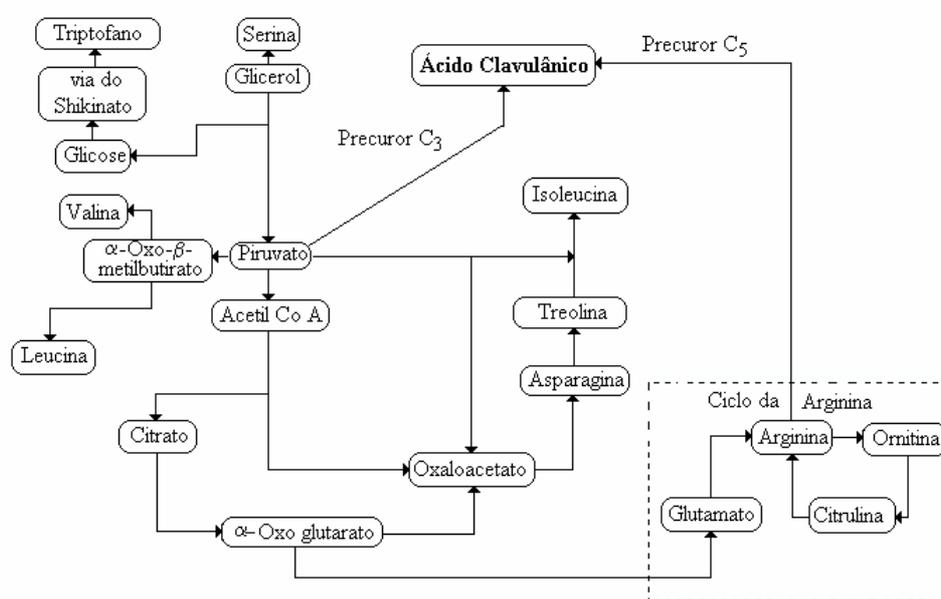


Figura 2-4: Esquema da rota biossintética proposta para produção de ácido clavulânico, ilustrando os maiores fluxos de carbono (Ives e Bushell, 1997).

Mcgowan *et al.* (1998) relatam em seu trabalho que o ácido clavulânico tem como precursor a arginina, citando como referência Valentine *et al.* (1993), e um

composto de três carbonos que pode ser glicerol ou piruvato, citando como referência o trabalho de Thirkettle *et al.* (1997). A Figura 2-5 ilustra uma provável rota biossintética para a produção de ácido clavulânico.

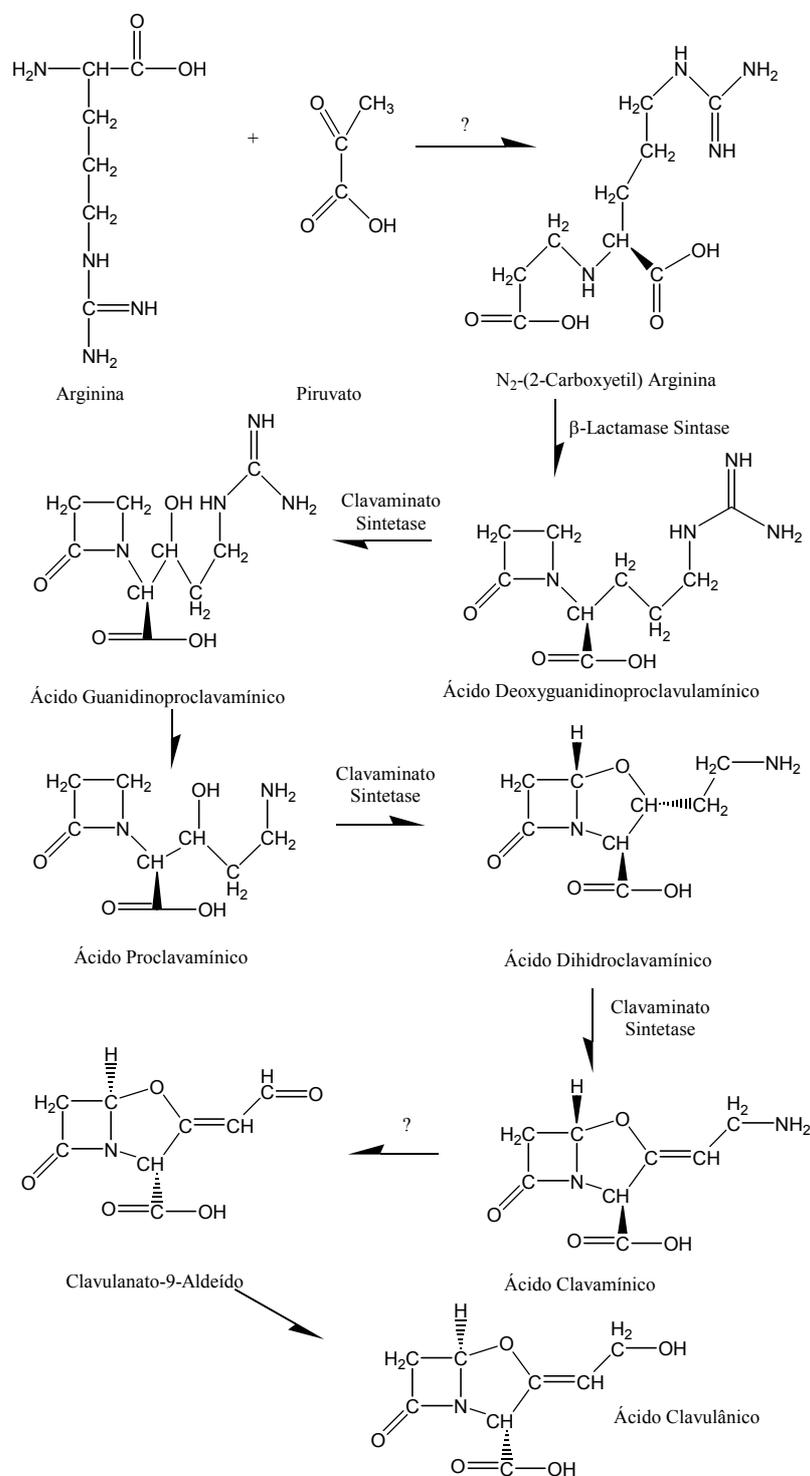


Figura 2-5: Rota biossintética para a produção de ácido clavulânico de acordo com McGowan *et al.* (1998)

2.3. *Streptomyces clavuligerus*

Streptomyces clavuligerus é uma espécie de bactéria do grupo dos actinomicetos. Este grupo de bactérias se caracteriza por possuir uma estrutura mais complexa em relação aos outros grupos de bactérias, embora mais simples que a apresentada por fungos (Alexander, 1977).

De acordo com o mesmo, os actinomicetos formam hifas, geralmente com diâmetro entre 0,5 a 1,0 µm. Para os actinomicetos maiores, as hifas se assemelham às de fungos em relação a sua característica e tamanho.

Balows *et al.* (1992) relatam que *Streptomyces* são capazes de degradar resíduos de plantas e animais incluindo polissacarídeos, proteínas e compostos aromáticos. Embora seja capaz de degradar compostos mais complexos, espécies de *Streptomyces* necessitam somente de uma fonte de carbono orgânico, fonte de nitrogênio inorgânico ou orgânico e alguns sais minerais. Também não requer vitaminas ou fatores de crescimento. Os actinomicetos são estritamente aeróbios necessitando, portanto, de oxigênio para o seu desenvolvimento.

De acordo com os mesmos autores, a maioria das espécies do gênero *Streptomyces* cresce a uma temperatura de 28 a 45°C (mesofílicas) e são encontrados, principalmente, em ambientes neutros (neutrofilicos). O ciclo de vida dos *Streptomyces* se baseia na germinação de esporos, crescimentos dos micélios e posterior esporulação. Os esporos não são tão resistentes como os artrosporos produzidos por outras espécies de bactérias, mas contribuem para a sua sobrevivência em condições adversas.

O grupo dos actinomicetos se caracteriza por possuir a maioria das espécies produtoras de antibióticos conhecidas atualmente. Espécies de *Streptomyces* são produtoras de mais ou menos 60% das substâncias antibióticas conhecidas (Lima *et al.*, 1975).

O *Streptomyces clavuligerus* é produtor de vários metabólitos secundários, dentre os quais muitos apresentam atividade antibacteriana tais como a Cefamicina C e a Penicilina N (Paradkar *et al.*, 1998), além de produz dois tipos de inibidores de β -lactamase; o BLIP (proteína inibidora de β -lactamase) tal como descrito por Liu *et al.* (2004) e o ácido clavulânico tal como descrito por Buttherworth (1984).

2.4.Meios de Cultivos para a Produção de Metabólitos Secundários por *Streptomyces clavuligerus*

Os principais nutrientes necessários para o crescimento, manutenção e biossíntese de produtos de interesse por microrganismos aeróbios são carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e oxigênio correspondendo entre 80 e 90% do material celular (Moo-Young, 1985).

Uma peculiaridade do *Streptomyces clavuligerus* é a sua incapacidade de assimilar glicose. Tal fato é devido à incapacidade deste microrganismo de transportá-la através de sua membrana (Zhang e Demain, 1992 *apud* Garcia-Dominguez *et al.*, 1998). Para contornar este problema, existem vários trabalhos em literatura utilizando outras fontes de carbono e energia como glicerol, óleos e amido.

Pruess e Kellett (1983) descreveram que o glicerol, a maltose e a dextrina são ótimas fontes de carbono para a síntese de antibióticos em culturas de *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064).

Romero *et al.* (1984) descreveram que a utilização do glicerol como fonte de carbono promove a formação de ácido clavulânico. Também foi avaliada a utilização de sacarose como fonte de carbono, substrato que não foi utilizado durante os cultivos.

Lee e Ho (1996) estudaram a utilização de várias fontes de carbono na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC

27064). Em seus trabalhos a maior produtividade de ácido clavulânico é encontrado quando se utilizou óleo de dendê como fonte de carbono e energia. Os autores atribuem a esse resultado o fato de que um dos produtos finais obtidos pela ação da lipase, enzima responsável pela quebra da molécula de óleo em ácidos graxos e glicerol, sendo o último considerado precursor na formação do ácido clavulânico.

Rius *et al.* (1997) estudaram a influência da natureza da fonte de carbono e a concentração de substrato na produção de cefalosporina C por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064). Foram utilizados glicerol e amido como fontes de carbono em concentrações de 1, 2 e 3% (m/v) de substrato. Os autores concluíram que se obteve uma maior produção de cefalosporinas quando se utilizou a concentração menor de substrato.

Large *et al.* (1998), baseados em resultados prévios (Lee e Ho, 1996), utilizaram lipídeos e óleos como fontes de carbono para a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* (linhagem doada pela Glaxo-SmithKline). Os estudos relacionados à utilização dessas fontes de carbono são geralmente justificados por serem de baixo custo.

Também são encontrados em literatura vários trabalhos utilizando diferentes fontes de nitrogênio na composição do meio de cultura.

Estudos realizados por Romero *et al.* (1984) indicam que concentrações acima de 10 mM de sais de amônia e ácido glutâmico reduziram a biossíntese de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064). Os autores propuseram o uso de aminoácidos em meios de cultura para suprir as necessidades de nitrogênio do microrganismo.

Estudos sobre a adição de ácido glutâmico, arginina e ornitina foram realizados por Romero *et al.* (1986), em que se relata a baixa produção de ácido

clavulânico na presença de ácido glutâmico, em contraste com uma melhor produção observada nas presenças de ornitina e arginina, em torno de 20 mg/l.

Spizek *et al.* (1995) ressaltam as vantagens da utilização de derivados de soja como constituintes do meio de cultura em processos fermentativos envolvendo actinomicetos.

Mayer e Deckwer (1996) descrevem a utilização de meio de cultura a base de farinha de soja. A farinha de soja é uma boa fonte de nitrogênio, o que pode explicar a alta produtividade de ácido clavulânico obtida nesse trabalho.

Jones *et al.* (1997) descrevem a não ocorrência de produtos oriundos de metabolismos secundários em cultivos de *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064) quanto este é realizado sob condições de limitação de nitrogênio.

Romero *et al.* (1997) descrevem a utilização de NH₄Cl como única fonte de nitrogênio com ou sem a adição de arginina na produção de cefalosporinas. Os autores concluíram que a adição da arginina no meio de cultura diminui a produção de antibiótico por este microrganismo.

Gouveia *et al.* (1999) compararam diferentes fontes de nitrogênio na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064), sendo que os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou Samprosoy 90NB, um hidrolisado protéico de soja. Foram utilizadas como fontes de nitrogênio, além do Samprosoy 90NB, farinha de soja e aminoácidos. A quantidade de nitrogênio total foi fixada para que a diferença entre os resultados fosse atribuída somente ao tipo da fonte de nitrogênio utilizada.

Gouveia *et al.* (2001) compararam meios de cultura contendo diversas fontes de nitrogênio combinadas (água de maceração de milho, extrato de levedura e peptona) ou não com o extrato protéico de soja (Samprosoy 90NB) para a produção de ácido

clavulânico por *S. clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064). Cabe ressaltar que os autores tiveram o cuidado de adicionar a mesma quantidade de nitrogênio nos meios de cultivo. Com isso, concluiu-se que o meio de cultivo contendo somente extrato protéico de soja apresentou o melhor resultado.

O fosfato é um nutriente muito importante nas formações de moléculas importantes para as células tais como DNA, RNA, fosfolipídeos, ATP entre outras utilizações. Geralmente a sua fonte principal são os fosfatos inorgânicos, mas os microrganismos podem também metabolizar alguns compostos orgânicos que contêm fosfato (Moo-Young, 1985).

Romero *et al.* (1984) estudaram a influência exercida pela concentração de fosfato no meio de cultura. Os autores concluíram que para concentrações acima de 10 mM, a produção de ácido clavulânico começa a ser inibida.

Lebrihi *et al.* (1987) descrevem a influência do fosfato nas produções de ácido clavulânico e de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064). Os autores observaram a repressão pelo fosfato, dos sistemas enzimáticos de biossíntese de ácido clavulânico e cefamicina C.

O enxofre se torna necessário por fazer parte de aminoácidos como a cisteína e a metionina e também na síntese de vitaminas como a biotina e a tiamina. Ele pode ser obtido de fontes inorgânicas como sulfatos e de fontes orgânicas como alguns aminoácidos (Moo-Young, 1985).

Romero *et al.* (1984) observaram que durante cultivos com *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064), houve a formação de ácido clavulânico na ausência de sulfato. Foi demonstrado, que mesmo não havendo átomos de enxofre na molécula do ácido clavulânico, houve aumento na formação do inibidor de β -lactamase quando se utilizaram concentrações acima de 4 mM de sulfato.

Também há em literatura a otimização de meio de cultivo para a produção de ácido clavulânico tal como os trabalhos realizados por Gouveia *et al.* (2001) e por Wang *et al.* (2004).

Gouveia *et al.* (2001) otimizaram o meio de cultivo para a produção de ácido clavulânico por *S. clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064). O meio de cultivo era composto por glicerol, K_2HPO_4 e Samprosoy 90 NB. Neste trabalho os autores concluíram que a melhor concentração de glicerol e de K_2HPO_4 a serem utilizadas são de 20 e 1,58 $g.L^{-1}$, respectivamente. Quanto à concentração de Samprosoy 90 NB, os autores concluíram que quanto maior a concentração da fonte de nitrogênio maior será a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.

No trabalho realizado por Wang *et al.* (2004), os autores utilizaram métodos estatísticos para determinar a melhor composição do meio de cultura para a produção do inibidor de β -lactamase por *S. clavuligerus* ATCC 27064. O meio de cultivo utilizado era composto por glicerol (de 15 a 18,75 $g.L^{-1}$), farinha de soja (de 42 a 52,5 $g.L^{-1}$), K_2HPO_4 (de 0,1 a 0,125 $g.L^{-1}$), $MgSO_4.7H_2O$ (de 0,2 a 0,25 $g.L^{-1}$), $FeSO_4.7H_2O$ (de 0,3 a 0,375 $g.L^{-1}$) e ornitina (de 1,32 a 1,65 $g.L^{-1}$). Com isso os autores concluíram que, dentro da faixa estudada, as concentrações de glicerol, KH_2PO_4 e de $MgSO_4$ não influenciam na produção de ácido clavulânico. Os autores também observaram que as concentrações de farinha de soja, de $FeSO_4.7H_2O$ e ornitina influenciaram significativamente a produção de ácido clavulânico e os seus valores otimizados foram 38,10 $g.L^{-1}$; 0,395 $g.L^{-1}$ e 1,177 $g.L^{-1}$ respectivamente.

2.5. Modos de Operação de Biorreatores

Existem vários modos de operação de biorreatores que podem ser utilizados de acordo com as características do processo e do biorreator. Também, estudos cinéticos

podem ser realizados com diferentes modos de operação, dependendo do processo fermentativo.

Dos modos clássicos de operação, i.e., cultivos em batelada, batelada alimentada e contínuo, se originam processos tais como os processos em batelada repetida e contínuo com reciclo celular.

2.5.1. Processo em Batelada

Nos cultivos em batelada não ocorre alimentação de meio suplementar ou retirada de caldo de cultivo durante o processo, caracterizando assim um sistema fechado. Neste caso, os nutrientes necessários para o crescimento celular e produção de metabólitos são adicionados no início do processo (Posten e Cooney, 1993).

Os processos em batelada são os mais utilizados na indústria por serem os mais fáceis de serem operados.

Existem em literatura, vários trabalhos utilizando processos em batelada para produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* dos quais é importante ressaltar o trabalho realizado por Rosa (2002), que teve como objetivo a determinação das melhores condições de aeração e agitação em bioreatores de 4 litros de volume útil. Utilizando uma vazão de ar de 0,5 vvm e agitação a 800 rpm, o autor obteve uma produtividade de $5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, valor inferior ao obtido quando se trabalhou com uma vazão de ar de 0,5 vvm e 1000 rpm de agitação ($11,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Cabe salientar que a linhagem de microrganismo utilizado é a mesma linhagem utilizada neste trabalho e servirá de comparação com os resultados obtidos neste trabalho.

2.5.2. Processo em Batelada Alimentada

Nos processos em batelada alimentada, os nutrientes são alimentados durante o processo sem a retirada de caldo de cultivo (Shuler e Kargi, 1992).

Os cultivos em batelada alimentados podem ser uma alternativa interessante quando existem nutrientes no meio que inibam o crescimento de microrganismo. Neste caso, uma alimentação destes nutrientes pode controlar a concentração destes substratos abaixo da concentração de inibição (Posten e Cooney, 1993).

De acordo com os mesmos autores, cultivos em batelada alimentada podem ser utilizados para obter uma alta concentração celular, pois em cultivos em batelada seria necessária uma alta concentração inicial de substrato o que poderia inibir o crescimento do microrganismo.

Também pode ser utilizado para evitar o efeito Cabtree, na fermentação alcoólica, mantendo-se a concentração de substrato baixa através do controle da velocidade de adição de substrato no cultivo (Posten e Coney, 1993)

Nos processos em que ocorre repressão anabólica, cultivos em batelada alimentada permitem controlar a concentração do nutriente que reprima a formação de produto mantendo seus valores em níveis não prejudiciais ao processo.

Na produção de produtos não associados ao crescimento, os processos em batelada alimentada podem ser utilizados para aumentar o período em que ocorre a produção. Cabe ressaltar que o ácido clavulânico é um produto de metabólito secundário e, de acordo com Baptista-Neto (2000), segue uma cinética não associada ao crescimento celular.

Várias estratégias de alimentação são utilizadas para a alimentação de meio suplementar durante os cultivos (Yamane, 1994).

Os cultivos em batelada com uma alimentação intermitente são caracterizados quando há uma adição de nutrientes em intervalos de tempo definidos e, portanto, a alimentação de nutrientes não é contínua.

Os cultivos em batelada alimentada com uma alimentação constante de nutrientes são os mais fáceis de se realizar em termos operacionais. A característica predominante neste tipo de alimentação é a ocorrência de crescimento linear, em massa por tempo.

A alimentação exponencial varia exponencialmente com o tempo de cultivo e tem como objetivo de manter o crescimento exponencial do microrganismo.

Mayer e Deckwer (1996) realizaram experimentos em batelada alimentada para a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* (DSM 738, ATCC 27064). Os autores utilizaram glicerol como fonte de carbono e energia e farinha de soja ou extrato de farinha de soja como principal fonte de nitrogênio. Neste trabalho os autores tiveram como estratégia manter a concentração de glicerol entre 1 e 4 g.L⁻¹ através da alimentação de meios suplementares. Com isso os autores obtiveram uma produção de 400 a 500 mg.L⁻¹ de ácido clavulânico em cultivos de até 90 h.

Numa patente depositada recentemente, Nabais e Fonseca (2000) propuseram a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 em batelada alimentada em biorreator de 8 litros de capacidade, utilizando meio de cultura contendo glicerol mais dextrina como fonte de carbono; farinha de soja é utilizada como única fonte de nitrogênio. Foram pesquisadas diferentes vazões de meios de cultura suplementares com distintos teores de glicerol ou maltose e farinha de soja, objetivando a manutenção da concentração de proteína entre 0,4-1,5 g.L⁻¹ no caldo durante os cultivos. A concentração máxima de ácido clavulânico obtida foi em torno de 1,6 g.L⁻¹ sendo que, os autores mencionaram que concentrações maiores poderiam ser obtidas pela minimização do efeito repressor devido à grande presença de fontes de carbono facilmente assimiláveis (glicerol, dextrina e maltose) no caldo de fermentação.

Teodoro *et al.* (2003) estudaram o processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos em batelada alimentada. Nesse trabalho, os autores estudaram a influência da vazão de alimentação ($0,04\text{L.h}^{-1}$ e $0,08\text{L.h}^{-1}$) e da concentração de glicerol no meio de alimentação (15 e 30 g.L^{-1}) no processo de produção desse inibidor de β -lactamase e observaram que uma a maior concentração de glicerol (30 g.L^{-1}) e menor vazão de alimentação ($0,04\text{ L.h}^{-1}$) de meio suplementar foi a melhor condição de operação para produção, obtendo valores de concentração de ácido clavulânico em torno de 680 mg.L^{-1} .

2.5.3. Processos Contínuos

Os processos contínuos são caracterizados pela alimentação de meio e retirada de caldo fermentado durante os cultivos. São encontrados em literatura variantes, tal como cultivo contínuo com reciclo de células, com o objetivo de obter alta concentração celular durante o processo e, assim, aumentar a produtividade do processo para a produção de metabólito secundário como é o caso do ácido clavulânico.

A. Cultivos contínuos sem reciclo celular

Os cultivos contínuos são utilizados desde o início do século 20 (Yamane, 1994), mas somente houve um grande desenvolvimento com os trabalhos de Novick e Szilar e Monod realizados por volta de 1950.

Cultivos contínuos permitem facilmente ao operador controlar a velocidade específica de crescimento celular através das condições de operações do reator. Por isso, o cultivo contínuo é uma ferramenta importante para o estudo do ciclo celular, regulação metabólica e formação de produto microbiano (Blach e Clark, 1997).

Também, de acordo os mesmos autores, cultivos contínuos podem ser utilizados no estudo de mutações. Apesar de alterações genéticas ocorrerem a uma

freqüência média de 10^{-6} a 10^{-8} genes por geração, a concentração de microrganismo é alta (10^9 células/ml) e, por isto, a probabilidade de surgir uma cultura com características diferentes da original é alta.

Cultivos contínuos podem ser utilizados para a seleção de microrganismo. Tomando como exemplo, o isolamento de um microrganismo consumidor de etanol de uma cultura mista pode ser feito através de alimentação de meio contendo etanol. Neste caso, o microrganismo incapaz de consumir etanol será totalmente excluído pela retirada de meio de cultura.

Operação contínua é mais eficiente que outros tipos de operações por não apresentar tempo morto no processo (tempo para a lavagem, preparação etc.). Porém a manutenção de alta atividade celular é muitas vezes prejudicada devido à variação genética que ocorre de modo significativo em cultivos de longa duração. Também cabe ressaltar que existem problemas ligados à dificuldade de manter a assepsia em processos de longa duração.

Por estas razões, embora os cultivos contínuos apresentem vantagens quanto à eliminação de tempo morto, não são empregados na indústria, exceto para alguns casos como no tratamento de águas residuárias (Blach e Clark, 1997) e na produção de etanol (Trovati, 2002).

Na literatura, existem vários trabalhos utilizando cultivos contínuos com as mais variadas finalidades. Porém, cabe ressaltar que somente estudo realizado por Kirk *et al.* (2001) utilizando cultivo contínuo com *Streptomyces clavuligerus* foi encontrado em literatura.

Inoue *et al.* (1982) estudaram a formação de estreptomicina por *Streptomyces griseus* em cultivos contínuos com o objetivo de estudar a influência das fontes de glicose e fosfato nesse processo. Para verificar a influência da concentração de glicose

no meio de alimentação, os autores utilizaram uma taxa de diluição de $0,08 \text{ h}^{-1}$ e concentrações de 3, 11 e 23 g.L^{-1} de glicose e concluíram que quanto maior a concentração deste substrato no meio suplementar maior a produtividade em estreptomicina. Quanto à influência da fonte de fosfato, a maior produção ocorreu quando houve limitação de fosfato no meio de cultivo. Em relação à cinética de produção de estreptomicina, os autores observaram que a produção é associada ao crescimento celular quando ocorre limitação de glicose ou fosfato e que a formação de estreptomicina aumenta sob forte limitação de fosfato.

Withers *et al.* (1995) estudaram a estabilidade do processo contínuo de produção de proteínas recombinantes (β -galactosidase e acetamidase) por mutantes de *Penicillium chrysogenum* WKW2. Nesse trabalho, a estabilidade da linhagem mutante foi comparada à da linhagem selvagem. O reator contínuo foi operado com uma alta taxa de diluição ($0,17 \text{ h}^{-1}$) e amostras foram retiradas a cada 24 horas para acompanhamento de alteração morfológica do microrganismo bem com na quantificação das proteínas em questão. Alterações morfológicas foram observadas após 500 horas de cultivo na linhagem selvagem e após 400 horas na linhagem mutante. Após 1600 horas de cultivo, não foi detectados microrganismo com a morfologia original em ambos os cultivos contínuos. Apesar das alterações morfológicas obtidas no trabalho, não houve variação significativa na produção das proteínas; com isso os autores concluíram que o processo contínuo de produção das proteínas recombinantes com a linhagem mutante estudada pode ser utilizado em maior escala.

Fazeli *et al.* (1995) estudaram a produção de estreptomicina por *Streptomyces griseus* ATCC 12475 em cultivos em batelada e contínuo utilizando meio complexo e o meio mínimo definido por Inoue *et al.* (1982). Nos cultivos em batelada, a produção ocorreu na idiofase, quando se utilizou o meio complexo, e na trofofase, quando se

utilizou o meio mínimo. Quanto aos cultivos contínuos, a estabilidade na produção de *S. griseus* foi investigada com limitação de fosfato usando o meio mínimo com taxa de diluição (D) de 0,02 h⁻¹; 0,04 h⁻¹ e 0,12h⁻¹. Somente quando se operou na menor taxa de diluição o microrganismo reteve a habilidade de produzir estreptomicina acima de 40 gerações. Para as taxas de diluições de 0,04 h⁻¹ e 0,12 h⁻¹, o microrganismo apresentou queda em sua produtividade após 9 e 7 gerações respectivamente. A concentração celular caiu de 3,7 g.L⁻¹(D=0,02 h⁻¹) para 2,5 g.L⁻¹(D=0,05h⁻¹), e a produção de estreptomicina caiu de 45 para 37 mg.L⁻¹, para as mesmas condições de cultivo.

Buttler *et al.* (1996) utilizaram cultivos contínuos para selecionar mutantes de *Streptomyces griseus* com maior capacidade de produzir estreptomicina. Para realizar a seleção, os autores alimentaram o reator com meio contendo estreptomicina e retiraram amostras periódicas para verificar o fenótipo do microrganismo e a sua capacidade produtora. Com isso, os autores obtiveram uma linhagem com capacidade produtora de 10 a 20 vezes superior a linhagem original.

Brigidi *et al.* (1996) estudaram a estabilidade de plasmídeos recombinantes em *Bacillus stearothermophilus*. O microrganismo estudado é produtor de várias enzimas que se caracterizam por sua estabilidade térmica, a solventes orgânicos e a variação de pH. Para estudar a estabilidade do plasmídeo no microrganismo, foram realizados cultivos contínuos. Com isso os autores concluíram que o plasmídeo é estável por mais de 200 gerações. Cabe ressaltar que os autores constataram uma forte influência da taxa de diluição na estabilidade dos plasmídeos.

Henriksen *et al.* (1996) realizaram cultivos contínuos com *Penicillium chrysogenum* para verificar a influência da velocidade específica de crescimento celular na composição de macromoléculas do micélio. Os autores concluíram que as quantidades de DNA e lipídeos permanecem constantes com a taxa de diluição enquanto

que as quantidades de RNA e de proteínas aumentam com o aumento da taxa de diluição.

McIntire *et al.* (1996) realizaram cultivos contínuos para estudar a influência da concentração de fosfato e de glicose na composição de meio sintético para a produção de vancomicina (antibiótico glicopeptídico) por *Amiclatopsis orientales*. Inicialmente, os autores variaram a taxa de diluição de 8 a 80% do valor da velocidade específica máxima de crescimento para determinar a taxa de diluição que maximiza a produtividade específica em produto. Com esse valor da taxa de diluição, os autores variaram a concentração de fosfato inorgânico no meio de alimentação de 2mM a 8mM e concluíram que houve uma diminuição na produção de vancomicina com o aumento da concentração desse componente. Quanto à concentração de glicose, foi observado uma queda significativa na produtividade específica do microrganismo quando os autores trabalharam com baixa concentração deste substrato no meio de alimentação.

Mukherju *et al.* (1996) realizaram cultivos contínuos para verificar a estabilidade do vetor pBk2, utilizado para aumentar a produtividade de aminoácidos em cultivos com *Corynebacterium acetoacidophilum*. Com isso os autores concluíram que a estabilidade deste vetor foi de 100% após 90 gerações.

Müller *et al.* (1999) estudaram o comportamento morfológico de duas espécies de *Aspergillus*; *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. O problema encontrado no estudo foi a variação da morfologia com a velocidade específica de crescimento, controlada através de cultivo contínuo. Com isso, os autores realizaram cultivos contínuos e consideraram o estado estacionário quando a morfologia do microrganismo permanecia estável. Com os resultados obtidos, concluíram que o uso combinado de cultivos contínuos, análise de imagem e modelos matemáticos representam uma poderosa ferramenta para o estudo de processos biológicos.

Aleksieva e Peeva (2000) estudaram a produção de proteinase ácida, enzimas utilizadas na indústria alimentícia, por *Humicola lutea* 120-5 em cultivos contínuos em reator “airlift”. Nesse trabalho, os autores realizavam os experimentos em batelada, até que uma diminuição da concentração de enzimas pudesse ser detectada. Após o término dos cultivos em batelada iniciava o cultivo contínuo com taxas de diluição entre 0,02 a 0,15 h⁻¹. Nos cultivos em batelada, os autores obtiveram uma maior atividade proteolítica em 60 horas de cultivos no valor de 1100 a 1200 U.ml⁻¹ e nos processos contínuos o maior valor foi de aproximadamente de 1000 U.ml⁻¹. Apesar da menor produção de enzima, a produtividade do processo contínuo foi três vezes superior ao obtido quando se operou o reator em batelada.

Eroshin *et al.* (2000) estudaram o processo de produção de ácido araquidônico (ARA), precursor de vários hormônios, por *Mortierella alpina* LPM 301. Neste trabalho, os autores realizaram cultivos contínuos e citam a dificuldade de retirada contínua de caldo de cultivo devido a adesão de micélios. Embora a concentração de ARA dissolvido no meio tenha caído à metade, a produtividade de ARA permaneceu próxima quando a taxa de diluição aumentou de 0,03 para 0,05 h⁻¹.

Kirk *et al.* (2000) estudaram o fluxo metabólico do *Streptomyces clavuligerus* para compreender o processo de produção de ácido clavulânico deste microrganismo. Para isso os autores realizaram cultivos contínuos sob condições de limitação de carbono, nitrogênio e fósforo e obtiveram uma produtividade específica de 0; 0,32 e 3,65 mg_p.g_x⁻¹, respectivamente. Através da análise de fluxo metabólico, os autores concluíram que, em qualquer das condições de limitação apresentadas, a formação de precursor C5 (a fórmula estrutural do ácido clavulânico pode ser vista pela Figura 2-3), a arginina do ácido clavulânico, é afetada. Os autores atribuem a não produção de ácido

clavulânico quando ocorre limitação de fonte de carbono pelo fato de não haver a formação de piruvato, precursor C3 do ácido clavulânico.

Albæk *et al.* (2002) estudaram a produção de glicoamilases por *Aspergillus niger*. De acordo com os autores, o microrganismo utilizado é capaz de produzir três diferentes formas de glicoamilase e, por isso, o trabalho teve como objetivo estudar os fatores que influenciam na proporção na qual essas enzimas são produzidas. Através dos cultivos contínuos, os autores concluíram que somente o valor de pH altera a proporção na qual a glicoamilase é produzida.

Minkevich *et al.* (2003) estudaram a cinética de degradação de EDTA (Ácido etilenodiaminoacético) pela linhagem bacteriana DSM 9103 em cultivos contínuos. Os autores propuseram uma cinética de consumo de substrato e ajustaram-na aos valores experimentais de um cultivo contínuo, operado a 5 diferentes taxas de diluições. Com isso os autores concluíram que o cultivo contínuo da linhagem bacteriana DSM 9103 é uma boa alternativa para a remoção do EDTA.

Møller *et al.* (2004) estudaram a estabilidade de mutantes de *Saccharomyces kluyveri* na produção de α -amilase através de cultivos contínuos. Nos cultivos contínuos, os autores utilizaram três diferentes taxas de diluições (0,1; 0,2; 0,3 h⁻¹). Através dos cultivos contínuos realizados, os autores obtiveram um aumento na produtividade específica com o aumento da taxa de diluição, porém uma menor produtividade volumétrica quando se operou o reator na maior taxa de diluição. Quanto à estabilidade do microrganismo, os autores não observaram alterações genéticas em 40 gerações.

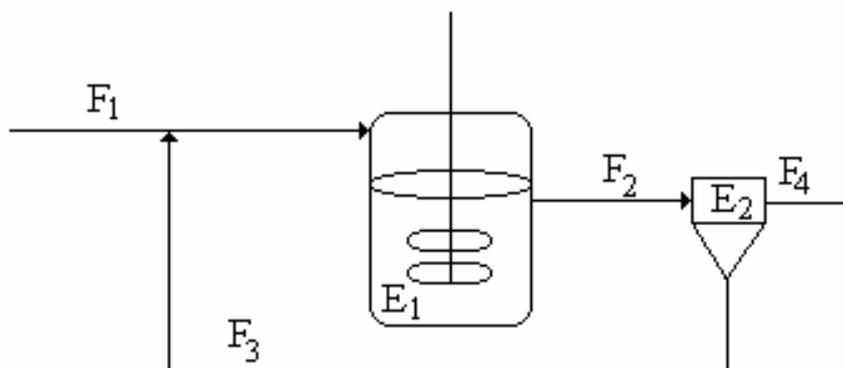
Collet *et al.* (2004) estudaram a produção de hidrogênio em cultivos contínuos de *Clostridium thermolacticum* utilizando lactose como fonte de carbono. Os autores realizaram experimentos variando a taxa de diluição (de 0,013 a 0,19 h⁻¹) e o valor de

pH (6,4 a 7,5). Com isso, os autores concluíram que a alta taxa de diluição e valores de pH acima de 7,0 aumenta a produtividade de hidrogênio.

B. Cultivos contínuos com reciclo celular

Cultivos contínuos com reciclo celular tem como objetivo aumentar a concentração celular dentro do reator. Considerando as células como biocatalizadores, um aumento na concentração celular aumentaria a velocidade de formação de produto (Shuler e Kargi, 1992). Também, de acordo com o mesmo autor, processos contínuos com reciclo celular aumentam a estabilidade de alguns processos, como o tratamento de águas residuárias, pela minimização de efeitos de perturbações do processo.

Com isso, cultivos com alto tempo de residência celular é uma das maneiras de se obter alta concentração celular. Uma forma de obter altos tempos de residência celular é a realização de cultivos com reciclo celular tal como esquematizado pela Figura 2-6.



| | | | |
|----------------|---|----------------|---------------------------------------|
| F ₁ | Corrente de entrada do fermentador | E ₁ | Fermentador |
| F ₂ | Corrente de saída do fermentador | E ₂ | Equipamento para separação de células |
| F ₃ | Corrente de reciclo com alta concentração celular | | |
| F ₄ | Corrente de saída com baixa concentração de células | | |

Figura 2-6: Esquema de um cultivo contínuo com reciclo de células

A separação de células pode ser realizada através da sedimentação, centrifugação, filtração etc. Cabe ressaltar que, em processos de produção de antibióticos, a separação e o reciclo de células têm que ser realizadas assepticamente.

Quando a utilização de sedimentador para a separação dos sólidos em suspensão se torna muito lento, pode-se utilizar uma centrífuga para o processo. Nesse caso a centrífuga é aconselhável por utilizar a força centrífuga, maior que a força gravitacional, para separar as partículas e tornando mais rápida a separação. Infelizmente, centrífugas apresentam componentes móveis o que o torna um equipamento mais complexo para ser operado (Shuler e Kargi, 1992).

Os processo de filtração tangencial tem se mostrado muito eficiente para a separação de partículas em suspensão devido ao grande avanço desta técnica. A microfiltração, geralmente operado como um filtro tangencial, é utilizado para reter particular entre 0,1 a 10 μ m. Filtros tangenciais não apresentam formação de torta sobre a membrana filtrante podendo operar por longos períodos de tempo (Blanch e Clark, 1997).

Existem na literatura vários trabalhos com cultivos com reciclo celular, mas nenhum deles sobre a produção de metabólitos por *Streptomyces clavuligerus*.

Nishizawa *et al.* (1983) realizaram um estudo sobre o processo de produção de etanol em cultivos contínuos com reciclo celular por levedura de panificação. Para a separação celular, os autores utilizaram uma membrana cerâmica. Inicialmente os autores estudaram a influência da diferença entre a pressão externa e interna da membrana (pressão transmembrânica) na faixa de 0 a 300 mmHg e concentração celular de 10 a 80 g.L⁻¹. Com isto os autores correlacionaram o fluxo de permeado com a concentração celular e a diferença entre a pressão interna e externa da membrana, tal como mostrada na equação 2-1.

$$J = 2,81 \cdot \ln \left(\frac{3,07 \cdot 10^4 \left(\frac{\Delta P}{P} \right)^{1,77}}{Cx} \right) \quad (2-1)$$

onde: J: fluxo de permeado ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)

ΔP : pressão transmembrânica (mmHg)

P: pressão fora da membrana (mmHg)

Cx: concentração celular ($g \cdot L^{-1}$)

Para verificar a eficiência do processo proposto, os autores realizaram cultivos contínuos com reciclo celular utilizando várias concentrações celulares e taxas de diluições. Com isso, observaram que a conversão de substrato a produto diminuiu quando o reator foi operado a taxas de diluição inferiores a $0,35 h^{-1}$, sendo esse fato atribuído à inibição do etanol no crescimento e em sua produção.

Holst *et al.* (1985 apud Chang 1994) estudaram a produção de superóxido dismutase (Sod) em cultivo contínuos com reciclo celular de *Streptococcus lactis* ATCC 19345. O objetivo do trabalho foi obter alta concentração celular para aumentar a produtividade do processo. Os autores escolheram este tipo de operação do reator para evitar a inibição do crescimento celular pelo ácido láctico produzido pelo metabolismo do microrganismo. Com isso, os autores obtiveram uma concentração de células cerca de 10 vezes superior a obtida em processos em batelada e a produtividade de SOD foi cerca de 4 vezes maior.

Takamatsu e Ryu (1988) estudaram a conversão de L-asparigina em L-alanina através de cultivos contínuos com retenção celular utilizando *Pseudomonas dacunhae* imobilizada. O objetivo do trabalho foi obter o produto cristalizado com alta pureza. Para isso, foram utilizados três equipamentos no processo: um cristalizador, para cristalizar a L-alanina que vem do biorreator; um reservatório, para misturas a corrente

que sai do cristalizador com a alimentação de substrato para a alimentar o biorreator; e um biorreator com retenção de células. Com o processo proposto, foram obtidas uma maior pureza e produtividade do produto quando comparados com processos operados em batelada ou em batelada alimentada.

Berg *et al.* (1989 *apud* Chang, 1994) realizaram cultivos contínuos com reciclo celular total para evitar os efeitos de inibição de substrato na produção de salicilato hidroxilase, enzima utilizada para a degradação do salicilato, por *Pseudomonas cepacia* ATCC 29351. A concentração de substrato, salicilato, foi mantida a níveis baixos para não prejudicar o crescimento do microrganismo. A concentração de células e a atividade enzimática no cultivo contínuo com reciclo celular foi maior, enquanto que a produtividade e a atividade enzimática não foi melhor que as obtidas em cultivo contínuo sem reciclo celular.

Hojo (1990) estudou o processo contínuo de produção de etanol com reciclo de células utilizando reator tipo CSTR. O autor realizou experimentos variando o tempo de retenção hidráulico (θ_h) para, através de cálculos matemáticos, obter os valores do tempo de retenção celular (θ_c) e os valores dos parâmetros Y_g (coeficiente de crescimento celular teórico) e k_d (constante de morte celular). Também foi verificada a influência da microreação no processo estudado. Neste caso os autores obtiveram uma melhoria no processo de produção de etanol.

Hoeks *et al.* (1992) estudaram o processo contínuo com reciclo celular para produção L-carnitina, por *Proteobacteria sp.* Para a separação celular foram testados três sistemas de separação assépticos; centrífuga Westfalia CSA 01 disco, um filtro rotativo e uma unidade de filtração tangencial. Através de testes realizados, concluíram que a filtração tangencial é a mais eficiente para o processo. Também foram realizados experimentos em reatores de 2,5; 20; 450 e 2.500 L. Também foi mencionado o fato de

um tempo de residência inferior a 10 s no equipamento utilizado na separação ser muito importante para a estabilidade do processo. Comparando os resultados obtidos com experimentos realizados em batelada alimentada descritos em literatura, foi mostrado que a produtividade nos processos contínuos com reciclo celular ($130 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) são superiores às obtidas em processos em batelada alimentada ($30 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Apesar disso o processo contínuo com reciclo apresenta um maior custo devido ao menor rendimento de substrato a produto o que aumenta muito o custo do processo de separação e purificação do produto.

Ishizaki *et al.* (1993) estudaram um equipamento para ser utilizado em cultivos contínuos com reciclo de células de *Brevibacterium flavum* para a produção de glutamato. Sendo o microrganismo aeróbio, foram propostas duas unidades de filtração que separassem e oxigenassem o caldo retido. O esquema da Figura 2-7 ilustra a primeira unidade de filtração que oxigena o retido, caldo com alta concentração de células, através da difusão do oxigênio em uma membrana de teflon. A segunda unidade de filtração apresenta uma membrana filtrante giratória com uma rotação de 1000 rpm e pode ser visualizado pela Figura 2-8. Como mostrado no esquema da Figura 2-8, o ar é injetado na parte lateral do sistema um pouco acima da entrada do caldo de cultivo vindo do reator. Foram realizados experimentos com e sem aeração nos sistemas propostos. Com isto, concluíram que houve uma maior produtividade quando a aeração foi utilizada.

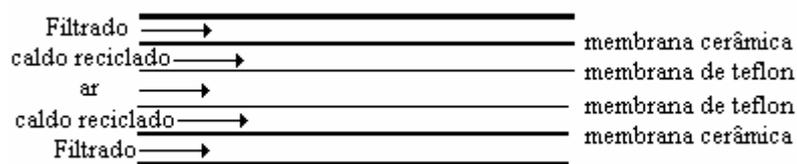


Figura 2-7: Camadas de membrana proposto por Ishizaki *et al.* (1993) para reciclo celular com aeração

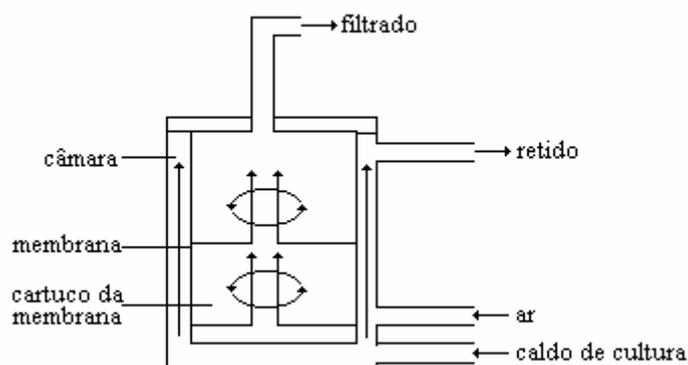


Figura 2-8: Esquema do Filtro de vórtex utilizado Ishizaki *et al.* (1993) para reciclo celular com aeração

Colomban *et al.* (1993) estudaram o processo contínuo com reciclo celular para a produção de ácido propiônico (utilizado em esterificação, manufatura de solventes etc) por *Propionibacterium sp.* Os autores realizaram cultivos em batelada e contínuos com reciclo, utilizando um módulo de ultrafiltração para o reciclo celular. Com isso, foi obtido um aumento significativo da produtividade volumétrica no processo contínuo com reciclo ($1,6 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$) comparado ao processo em batelada ($0,25 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$).

Lafforgue-Delorme *et al.* (1994) modelaram o comportamento de cultivos de levedura com alta concentração celular. Os autores propuseram um modelo baseado na cinética de Monod, considerando além da concentração celular e de produto, a viabilidade celular. O modelo descreveu satisfatoriamente os resultados obtidos nos experimentos realizados, apresentando melhor ajuste que os modelos existentes na literatura. Tal trabalho teve como objetivo a modelagem de processos com altas concentrações celulares, situação encontrada em cultivos contínuos com reciclo.

Morcel e Biedermann (1994) estudaram o processo contínuo com reciclo celular para a produção de α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens*. Para realizarem os cultivos, os autores utilizaram uma membrana de polipropileno de $0,04 \text{ m}^2$ de área

superficial e 0,2 μm de diâmetro de poro acoplado a um reator de 3 l de volume útil. Neste trabalho os autores relatam um fluxo inicial de $9 \text{ l.h}^{-1}\text{m}^{-2}$ e após 20 horas um fluxo de $6 \text{ l.h}^{-1}\text{m}^{-2}$ devido ao efeito de incrustação ("fouling") e, com isso, os autores descrevem a necessidade de uma limpeza do filtro tangencial em intervalos curtos de tempo. Os resultados obtidos demonstram que o cultivo com reciclo apresenta uma produtividade volumétrica 2 vezes maior que a obtida em cultivos em batelada.

Xavier *et al.* (1995) estudaram o processo contínuo com reciclo celular para a produção de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus*. Para tanto, foi utilizado um sistema de filtração tangencial para o reciclo celular, sendo ressaltado dificuldades operacionais do sistema devido a problema de entupimento da membrana pelos autores. Apesar das dificuldades operacionais, foi obtida uma maior produtividade volumétrica nos processos contínuos com reciclo celular ($36 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$) quando comparados com os em batelada ($3 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$) e contínuo ($6 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$).

Taylor *et al.* (1996) estudaram a utilização do processo contínuo com reciclo na produção de etanol. Neste caso, os autores realizaram ensaios com reciclo de células utilizando dois tipos de sedimentadores e a retirada contínua do etanol por uma coluna de adsorção. Com isso, obtiveram maiores produtividades de etanol.

Maneaus e Holst (1997) estudaram o processo de produção de desidrogenase álcool secundário, utilizado na redução de pequenas cetonas alifáticas, por *Thermoanaerobium brockii*, bactéria anaeróbia. Sendo a produção associada ao crescimento celular, os autores propõem utilizar baixos tempos de residência hidráulicos, obtidos através de cultivos contínuos com reciclo celular, para o aumento da produtividade desta enzima. Os autores também justificam cultivos com altas concentrações celulares devido ao fato do substrato inibir o crescimento celular. Para realizar os cultivos contínuos com reciclo celular, foi utilizado um filtro tangencial

acoplado a um fermentador. Com isto os autores obtiveram uma maior concentração celular e uma maior produtividade nos cultivos contínuos com reciclo celular que os obtidos nos cultivos em batelada.

Nishiwaki (1997) estudou teoricamente a utilização de dois reatores em série com reciclo celular em cada estágio para a produção de ácido acético por *Acetobacter acetil*. Cabe ressaltar que o modelo utilizado para o crescimento celular considera uma inibição pelo produto. Com os parâmetros do modelo estimados por Park e Toda (1990 *apud* Nishiwaki, 1997), o autor realizou várias simulações de condições de operações e concluiu que o processo estudado é bem promissor.

Reimann *et al.* (1998) realizaram cultivos contínuos com reciclo celular para estudar a produção de 1,3 propanodiol, utilizado na manufatura de poliéster, por *Clostridium butyricum*. Para realizar os cultivos contínuos com reciclo celular, os autores utilizaram dois módulos de ultrafiltração alternadamente para lavar um dos módulos durante o cultivo. Com isso, os autores obtiveram um aumento na produção de 1,3 propanodiol cinco vezes maior do que o valor original obtido em cultivos contínuos. Nesse trabalho, também é relatada a impossibilidade de manter o sistema proposto operando por longo período de tempo, devido ao problema de entupimento da membrana.

Hojo *et al.* (1999) estudaram o processo de produção de etanol em cultivos contínuos com e sem reciclo celular utilizando levedura floculante, *Saccharomyces cerevisiae*. Cultivos contínuos com reciclo celular foram realizados para a determinação da cinética de crescimento e produção. Dos vários modelos estudados, o modelo de Monod modificado por Levenspiel, no qual considera a inibição do produto na velocidade de crescimento celular, se adequou melhor ao processo estudado. Quanto aos cultivos contínuos com reciclo celular, os autores utilizaram um sedimentado acoplado a

um fermentador para realizar a separação celular. Vários experimentos com alto tempo de residência hidráulico foram realizados com o objetivo de verificar a estabilidade do processo. Com isso, os autores não obtiveram uma estabilidade do processo e propuseram com êxito a microaeração para estabilizar a concentração de produto.

Defrance *et al.* (2000) estudaram o processo de lodo ativado, que é o exemplo clássico de cultivo contínuo com reciclo celular, utilizando membrana cerâmica para separação de células. Para tanto os autores utilizaram um reator de 600 L acoplado a uma membrana cerâmica de 0,25 m² de área de membrana e 0,1- μ m de diâmetro de poro. Nesse trabalho, os autores variaram a velocidade tangencial de 1 a 5 m.s⁻¹ e obtiveram um fluxo de permeado entre 20 e 120 l.h⁻¹m⁻², respectivamente. Os autores também relatam que o fluxo de permeado não diminuiu quando a concentração de sólidos totais aumentou de 2 para 6 g.L⁻¹.

Mostafa (2001) estudou a produção de glicerol por *Kluyveromyces fragillis* utilizando soro de queijo complementado com sais como meio de cultivo. Para isso, o autor realizou experimentos em batelada com células livres e imobilizadas e experimentos contínuos com reciclo celular. Para a realização dos cultivos contínuos com reciclo celular, o autor utilizou um módulo de ultrafiltração de polissulfona de molecular "cut-off" de 500 kda (kilodaltons) com área de 0,033 m². O trabalho descreve uma maior concentração de glicerol (18,7 g.L⁻¹) e um maior rendimento de substrato a glicerol (39,78 g_s.g_p⁻¹) nos cultivos contínuos com reciclo celular.

Cánovas *et al.* (2003) estudaram a produção de L-carnitina por *Proteus sp* utilizando cultivos contínuos com reciclo celular e cultivos contínuos com retenção celular. Para os cultivos contínuos com reciclo celular, foi utilizado um módulo de ultrafiltração com membranas filtrantes de polissulfona. Nos cultivos contínuos com reciclo celular, os autores obtiveram uma concentração celular de 35 a 45 g.L⁻¹, valor

superior aos obtidos nos cultivos contínuos com retenção celular que foi pouco acima de 25 g.L^{-1} . A produtividade em L-carnitina no processo contínuo com retenção celular foi de $12,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, valor inferior ao obtido no processo contínuo com reciclo celular que foi de $40 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

2.6. Modelagem Cinética

A modelagem de bioprocessos tem como uma das mais importantes aplicações a elaboração de estratégias de controle, tal como mostra o estudo realizado por Rodrigues (1996) bem como a otimização de condições de operação, como realizado por Brass *et al.* (1997).

Modelos cinéticos podem ser classificados em estruturados e não estruturados e segregados e não segregados (Bailey e Ollis, 1986).

De acordo com a literatura, os modelos não segregados são aqueles em que não se considera a propriedade individual da população microbiana. Nesse caso, a modelagem é realizada utilizando características de toda a população. Em contrapartida, o modelo segregado considera as características de cada indivíduo.

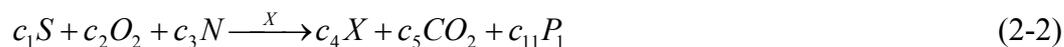
Nos modelos estruturados, as cinéticas das várias etapas intermediárias para descrever o comportamento do bioprocessos são descritas, enquanto nos modelo não estruturado baseia-se, somente, em cinéticas globais para a mesma finalidade.

De acordo Bailey e Ollis (1986), a representação real do bioprocessos deve ser realizada utilizando um modelo estruturado e segregado. Embora este tipo de modelo seja o mais completo e preciso, a necessidade da elaboração de hipóteses e o esforço computacional para a estimativa do grande número de parâmetros acabam por dificultar a sua resolução, sendo geralmente utilizado um modelo mais simples.

Para uma modelagem mais simples do bioprocesso, pode-se utilizar modelos não estruturados e não segregados encontrados facilmente em literatura (Bailey e Ollis 1985; Shuler e Kargi, 1992).

Como descrito amplamente em literatura, o crescimento em biorreatores se relaciona diretamente com o consumo do substrato limitante. Os metabólitos primários, produtos oriundos de ciclos essenciais para o microrganismo, geralmente são produzidos durante a chamada trofofase, fase de crescimento, e os metabólitos secundários, produtos não oriundos de reações vitais para o microrganismo, geralmente são produzidos na idiofase, fase em que pode estar ocorrendo falta de nutrientes.

As equações pseudo-estequiométricas 2-2, 2-3 e 2-4 descrevem resumidamente o processo aeróbio de produção de metabólitos por microrganismos, tal como sugerido por Shuler e Kargi, 1992.



onde: c_1 , c_2 , c_3 , c_4 , c_5 , c_{11} , c_{12} , c_{13} , c_{14} , c_{15} : coeficientes da equação pseudo-estequiométrica

X: representa células

S: representa o substrato limitante

N: representa fonte de nitrogênio

P_1 : produto associado ao crescimento

P_2 : produto não associado ao crescimento

A equação 2-2 descreve o crescimento de um microrganismo aeróbio bem como a produção de produtos associados ao crescimento celular, que geralmente são oriundos do metabolismo primário do microrganismo.

A equação 2-3 descreve a morte celular e ocorre principalmente quando ocorre a falta de algum nutriente importante para suprir as necessidades do microrganismo. A morte celular também pode ser influenciada pelas condições de operação do biorreator.

A formação de produtos não associados ao crescimento, descritos pela equação 2-4, geralmente são oriundas do metabolismo secundário. Dentre os vários produtos oriundos desse metabolismo, se destacam os antibióticos. Os inibidores de β -lactamases, e.g, ácido clavulânico, também são oriundos de metabólitos secundários.

A velocidade de formação de células em um sistema fechado é proporcional a velocidade específica de crescimento celular e à concentração de célula no sistema, tal como definido pela equação 2-5.

$$\frac{dCx}{dt} = \mu \cdot Cx \quad (2-5)$$

onde: μ : velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

Inicialmente, os modelos não consideravam a concentração de nutrientes no meio de cultura. Tais modelos são empregados quando não se podem identificar os substratos limitantes utilizados. O modelo mais simples é o de Malthus, que considera constante a velocidade específica de crescimento celular, definida pela equação 2-5. Para limitar o crescimento previsto pelo modelo, Verlhulst (1844) e Pearl and Reed (1920) propuseram a adição de um termo dependendo da concentração celular descrito pela equação 2-6 (Blanch e Clark, 1997).

De acordo o mesmo autor, um dos modelos mais simples que incluem a concentração de substrato no crescimento de microrganismo foi proposto por Jacques Monod baseado em observações de crescimento de *E. coli* em várias concentrações de glicose. O Modelo de Monod é descrito pela equação 2-7.

$$r_x = k_v \cdot Cx(1 - \varpi Cx) \quad (2-6)$$

onde: k_v : constante do modelo (h^{-1})

ϖ : constantes do modelo ($L \cdot g^{-1}$)

r_x : velocidade de crescimento celular ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot C_s}{K_s + C_s} \quad (2-7)$$

onde: $\mu_{m\acute{a}x}$: velocidade maxima de crescimento celular (h^{-1})

K_s : constante de saturaao ou constante de meia velocidade ($g \cdot L^{-1}$)

C_s : concentraao do substrato limitante ($g \cdot L^{-1}$)

O modelo de Monod descreve bem cultivos com baixa densidade celular e baixa concentraao de substrato. Para descrever processo com alta densidade celular a alta concentraao de substrato modificaoes no modelo de Monod sao propostas, tais como descritas pelas equaoes 2-8 e 2-9.

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot C_s}{K_{s_0} \cdot C_{s_i} + C_s} \quad (2-8)$$

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot C_s}{K_{s_1} + K_{s_0} C_{s_i} + C_s} \quad (2-9)$$

onde: K_{s_0} : parametro das equaoes 2-8 e 2-9 (adimensional)

K_{s_1} : parametro da equaao 2-9 ($g \cdot L^{-1}$)

C_{s_i} : concentraao inicial de substrato ($g \cdot L^{-1}$)

Outras equaoes tem sido propostas para descrever o crescimento de microorganismos. A equaao de Blackman, equaao 2-10, apresenta algumas vezes um melhor ajuste aos pontos experimentais que o modelo de Monod, porem a sua descontinuidade e o problema encontrado em sua aplicaao. O modelo de Moser, equaao 2-11, e a forma mais geral dos modelos apresentados apresentando 3 parametros. A partir dele pode-se obter o modelo de Monod (Shuler e Kargi, 1992).

$$\begin{aligned} \mu &= \mu_{m\acute{a}x} & \text{Se } C_s \geq 2 \cdot K_s \\ \mu &= \frac{\mu_{m\acute{a}x}}{2 \cdot K_s} C_s & \text{Se } C_s < 2 \cdot K_s \end{aligned} \quad (2-10)$$

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s^j}{K_s + C_s^j} = \mu_{m\acute{a}x} (1 + K_s \cdot C_s^{-j})^{-1} \quad (2-11)$$

onde: j: parâmetro do modelo de Moser, equação 2-11, (adimensional)

Dentre os vários modelos empregados em literatura o modelo de Contois parece ser o mais apropriado para culturas com alta densidade celular, quando a velocidade específica de crescimento celular diminui com a concentração celular. O modelo de Contois é descrito pela equação 2-12 (Blanch e Clark, 1997).

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot C_s}{K_x \cdot C_x + C_s} \quad (2-12)$$

onde: K_x : parâmetro do modelo de Contois ($g_s \cdot g_x^{-1}$).

Modelos mais complexos para descrever a velocidade de crescimento celular, considerando mais de um substrato limitante, são encontrados em literatura. Shuler e Kargi (1992) descrevem cinéticas aditivas e multiplicativas tal como descrito pelas equações 2-13 e 2-14, respectivamente.

$$\frac{\mu}{\mu_{m\acute{a}x}} = \sum_{j=1}^{nro} w_j \frac{C_{s_j}}{K_j + C_{s_j}} \quad (2-13)$$

$$\frac{\mu}{\mu_{m\acute{a}x}} = \prod_{j=1}^{nro} w_j \frac{C_{s_j}}{K_j + C_{s_j}} \quad (2-14)$$

onde: w_i : peso de cada um dos substratos (adimensional)

C_{s_j} : concentração do substrato limitante j ($g \cdot L^{-1}$)

K_j : constante de saturação do substrato j ($g \cdot L^{-1}$)

nro: número de substrato limitante (adimensional)

Também, de acordo o mesmo autor, para descrever o fenômeno de morte celular, utiliza-se um modelo cinético de primeira ordem tal como descrito pela equação 2-15.

$$r_m = k_d \cdot Cx \quad (2-15)$$

onde: r_m : velocidade de morte celular ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

k_d : constante de morte celular (h^{-1})

Quanto á velocidade de consumo de substrato, é possível utilizar a equação pseudo-estequiométrica para relacioná-la com a velocidade de crescimento celular. Com isso pode-se definir o coeficiente de rendimento de substrato a célula ($Y_{X/S}$) de acordo com a equação 2-16 e relacionar a velocidade de consumo de substrato à velocidade de crescimento celular 2-17.

$$Y_{X/S} = \frac{Cx - Cx_i}{Cs_i - Cs} \quad (2-16)$$

$$(-r_s) = \frac{r_x}{Y_{X/S}} \quad (2-17)$$

onde: Cx_i : concentração inicial de células (g.L^{-1})

Cs_i : concentração inicial de substrato (g.L^{-1})

r_s : velocidade de consumo de substrato ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

$Y_{X/S}$: coeficiente de rendimento de substrato a células ($\text{g}_x.\text{g}_s^{-1}$)

Um modelo cinético clássico de produção de metabólitos por microrganismos foi proposto por Luedeking e Piret (1959 apud Blanch e Clark, 1997) e é descrito pela equação 2-18. Nesse modelo, os autores consideraram que quando o valor do parâmetro β da equação 2-18 é igual a zero obtém-se um modelo de produção associado ao crescimento e, para a mesma equação, quando o valor de α é igual a zero obtém-se um modelo de produção não associado ao crescimento celular. A velocidade de produção é parcialmente associada ao crescimento quando a constante de formação de produto (β) e a relação entre a velocidade de produção pela velocidade de crescimento celular (α) são diferentes de zero

$$r_p = \alpha \cdot r_x + \beta \cdot C_x \quad (2-18)$$

onde: r_p : velocidade global de produção ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

α : relação entre velocidade de produção pela velocidade de crescimento celular ($\text{mg}_p \cdot \text{g}_x^{-1}$)

β : constante de formação de produto ($\text{mg}_p \cdot \text{g}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

Vários exemplos de modelagem fenomenológica de bioprocessos podem ser encontrados na literatura, como no trabalho proposto por Matsumura *et al.* (1981), em que utilizaram um modelo não segregado e semi-estruturado para modelar o bioprocessos de produção de cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium*. Nesse modelo, foram consideradas três morfologias diferentes do microrganismo e, também, a influência da concentração de metionina na formação de produto. O modelo foi bem adequado ao bioprocessos, mas, o grande número de parâmetros, elevou o número de experimentos para a obtenção de seus valores.

Tar buck *et al.* (1985) propuseram um modelo não-segregado e não-estruturado para descrever a produção de ácido clavulânico e o crescimento de *Streptomyces clavuligerus*. Como modelo de crescimento, considerou-se o proposto por Monod. Foi considerado no modelo o consumo de substrato para a produção de antibiótico e para o crescimento celular. Também foram consideradas no modelo, as cinéticas de degradação de produto e de morte celular como sendo de primeira ordem. Para se testar o modelo, os autores realizaram vários ensaios sob diferentes condições de aeração. No entanto, os autores não obtiveram um bom ajuste do modelo aos valores experimentais.

Chu e Constantinides (1988) realizaram vários experimentos com diferentes valores de pH e temperatura para a produção de Cefalosporina C. Os autores ajustaram o modelo para cada par de valores de pH e temperatura estudados. Com os parâmetros ajustados, foi possível a obtenção de uma correlação entre os parâmetros e os valores de

pH e temperatura. O modelo utilizado para descrever o processo foi um modelo não-segregado e não-estruturado em que se consideram duas morfologias celulares e a concentração de uma enzima intermediária para a produção de cefalosporina C.

Gudi *et al.* (1994) utilizaram modelos fenomenológicos para a estimativa de biomassa, em cultivos de *Streptomyces clavuligerus*, através da velocidade de formação de dióxido de carbono decorrente da respiração microbiana. Os cultivos foram realizados em batelada alimentada com duas diferentes vazões de alimentação e foram analisados dados relativos a biomassa, concentração de substrato e porcentagem de dióxido de carbono na saída do reator. Para retirar o “ruído” dos dados obtidos, os autores utilizaram o filtro estendido de Kalman.

Araújo (1996) utilizou um modelo não estruturado e não segregado para descrever o processo de produção de cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium*. O modelo levou em conta o efeito diaúxico, crescimento em dois tipos diferentes de substrato, e a diferenciação celular em cultivos com células livres e imobilizadas. O modelo, apesar de ser mais simples que os modelos de Matsumura *et al.* (1981) ou de Chu e Constantinides (1988), foi capaz de modelar adequadamente o bioprocessos estudado.

Montesinos *et al.* (1997) utilizaram um modelo não-estruturado e não-segregado para descrever o processo de produção de lipase por *Candida rugosa*. O modelo baseou-se na equação de Monod para descrever o crescimento celular. Quanto ao consumo de substrato, foram considerados modelos de transporte de nutrientes do meio de cultura para o interior da célula. Para descrever a formação de produto, foi considerada uma etapa de transporte de produto da célula para o meio de cultura, analogamente à cinética de consumo de substrato. Com o modelo validado, os autores

estudaram a otimização de várias condições de operação para maximizar a produtividade do processo.

Brass *et al.* (1997) utilizaram um modelo não estruturado para descrever o processo de produção de L-carnitina. Com esse modelo, ajustado através de técnicas estatísticas, foi possível realizar várias simulações com diferentes vazões de alimentação do processo, operado em batelada alimentada e na forma contínua, para a otimização do bioprocessamento.

Cruz *et al.* (1999) modelaram o bioprocessamento de produção de cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium* em batelada alimentada. Foi utilizado um modelo não estruturado e não segregado para descrever o processo. Nesse trabalho, a sacarose, tradicionalmente utilizada como fonte de carbono na fase de produção (idíofase), quando operado em batelada, foi substituída por sacarose invertida na produção em batelada alimentada evitando-se, assim, a repressão catabólica. Foram estudadas várias vazões de sacarose invertida com o objetivo de se maximizar a produção de cefalosporina C. O modelo apresentado pelos autores foi satisfatório para descrever o bioprocessamento em questão.

2.7. Características Reológicas do Caldo de Cultivo

No projeto de biorreatores e em estudos de estratégias de controle das variáveis de agitação e aeração, há a necessidade de um bom conhecimento do comportamento reológico do caldo de fermentação ao longo do tempo de cultivo.

De acordo com o seu comportamento reológico, os fluidos podem ser caracterizados como fluidos Newtonianos e Não-Newtonianos.

A grande maioria dos caldos de fermentações, sobretudo aqueles decorrentes de cultivos de microrganismos filamentosos, é caracterizada como não Newtoniano. A

maioria dos caldos de cultivos é caracterizada como sendo fluidos pseudoplásticos que seguem o modelo da lei de potência descrito pela equação 2-19 (Shuler e Kargi, 1992).

$$\tau = K.\gamma^n \quad (2-19)$$

onde: τ : tensão de cisalhamento (dina.cm⁻²)

γ : velocidade de cisalhamento ou gradiente de velocidade (s⁻¹)

K: índice de consistência (dina.cm⁻².sⁿ)

n: índice de comportamento de escoamento (adimensional)

A viscosidade é definida como sendo a relação entre a tensão de cisalhamento (τ) e o gradiente de velocidade (γ), e para fluidos não-Newtonianos que seguem a “lei da potência”, é dada pela equação 2-20, que expressa a viscosidade aparente (μ_{ap}):

$$\mu_{ap} = \frac{\tau}{\gamma} = K \gamma^{n-1} \quad (2-20)$$

onde: μ_{ap} : viscosidade aparente (dina.cm⁻².s)

Belmar-Beiny e Thomas (1991) descrevem a existência de uma relação entre a morfologia do micélio e a reologia do caldo de fermentação para a produção de ácido clavulânico pelo *Streptomyces clavuligerus*. Nesse trabalho, os autores ilustram a importância do estudo do efeito da morfologia nas condições de fermentação.

Kim e Yoo (1992 *apud* Badino Jr., 1997), analisaram quantitativamente as propriedades reológicas de caldos de fermentação de *Cephalosporium acremonium*. Foram obtidas correlações entre índice de consistência (K) e concentração celular (Cx), referente as três diferentes formas morfológicas que ocorrem durante o crescimento celular. Com a correlação obtida foi possível estimar, com boa precisão, valores de viscosidade aparente (μ_{ap}) dos caldos durante os cultivos.

Badino Jr. *et al.* (1994a), utilizando um reômetro rotacional de impelidor tipo turbina, caracterizaram caldos de fermentação de *Penicillium chrysogenum* e

Cephalosporium acremonium, segundo modelos reológicos clássicos (lei da potência, Bingham e Casson). Constantes reológicas foram correlacionadas com a concentração celular, assim como foram verificadas as influências dos meios de cultura sintéticos e complexos nas reologias dos caldos.

Warren *et al.* (1995) examinaram as reologias dos caldos e as morfologias de três actinomicetos em cultivos submersos. Os caldos foram caracterizados como pseudoplásticos. Os índices de comportamento de escoamento (n) decresceram durante os cultivos, mantendo-se entre 0,20 e 0,25. Já os índices de consistência (K) aumentaram com a concentração celular (C_x), apresentando um decréscimo ao final dos cultivos. Os comprimentos médios das hifas situaram-se na faixa de 15-25 μm , não se alterando acentuadamente com as variações nos índices de consistência (K).

Badino Jr (1997) observou uma relação direta entre a concentração celular (C_x) e o índice de consistência (K) e uma diminuição contínua do índice de comportamento do escoamento (n) permanecendo entre 0,3 a 0,5 em cultivos de *Aspergillus awamori*.

Recentemente, Goudar *et al.* (1999) propuseram uma correlação para descrever a influência da concentração celular nas propriedades reológicas do caldo de fermentação. Nos dados analisados pelos autores foram considerados cultivos com *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus niger* de outros autores. Os parâmetros K e n foram correlacionados com a concentração celular através de modelos como a lei da potência (equação 2-21) a das logísticas e de Cross *et al.* (1965 *apud.* Goudar *et al.*, 1999) (equações 2-22 e 2-23, respectivamente).

$$K = p_1.Cx^{p_2} \quad (2-21)$$

$$K = \frac{K_o e^{c.Cx}}{1 - \frac{K_o}{K_f} (1 - e^{c.Cx})} \quad (2-22)$$

$$n = n_f + \frac{1 - n_f}{1 + (d.Cx)^e} \quad (2-23)$$

onde: p_1 : parâmetro da lei da potência (dina.sⁿ.cm⁻².L^{p2}.g^{-p2})

p_2 : parâmetro da lei da potência (adimensional)

K_o : valor inicial de K (dina.sⁿ.cm⁻²)

K_f : valor final de K (dina.s⁻ⁿ.cm⁻²)

c : constante da equação de Goudar *et al.* (1999) (L.g⁻¹)

n_f : valor final de n (adimensional)

d : constante da equação da logística (L.g⁻¹)

e : constante da equação da logística (adimensional)

2.8. Transferência de Oxigênio

O *Streptomyces clavuligerus* se caracteriza por ser uma bactéria estritamente aeróbia, ou seja, necessita de oxigênio para a realização de funções metabólicas relacionadas ao crescimento celular e a produção de metabólito secundário.

A quantidade de oxigênio presente no meio de cultura não é suficiente para a realização do processo e por isso uma transferência de oxigênio para o calo de cultivo é requerida. A quantidade de oxigênio a ser transferida para o meio de cultura deve ser o suficiente para manter o valor da concentração desse nutriente alta o suficiente para não prejudicar o processo. Tal valor é conhecido como concentração crítica de oxigênio dissolvido (Shuler e Kargi, 1992).

Braña *et al.* (1983) relatam que quando a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em níveis altos, a velocidade de produção de antibióticos 'in vitro', foi

menos influenciada pela concentração das fontes de carbono utilizadas quanto comparada a situações com menores concentrações de oxigênio dissolvido no caldo fermentativo.

Rollins *et al.* (1988) realizaram cultivos com *Streptomyces clavuligerus* visando a produção de cefamicina C em meio complexo, controlando a concentração de oxigênio dissolvido em 50% do valor de saturação e próximo a este valor. Nessas condições, os autores não constataram alterações significativas na velocidade de crescimento, embora a produção de cefamicina C tenha sido superior quando mantidas altas concentrações de oxigênio dissolvido na trofofase.

Yegneswaran e Westlake (1988) observaram que a produção de cefamicina C não foi afetada pela redução da concentração de oxigênio dissolvido durante as primeiras cinquenta horas de cultivo. Após o crescimento cessar, a concentração de antibiótico sob condições reduzidas de oxigênio dissolvido diminuiu para um terço do valor observado sob altas condições de aeração.

Em um trabalho posterior, Yegneswaran e Westlake (1991) descrevem que, em cultivos com *Streptomyces clavuligerus* realizados em níveis de oxigênio em torno de 50% e próximo da saturação, os perfis de velocidade de crescimento celular foram semelhantes. No entanto, a concentração de cefamicina C sob condições de saturação de oxigênio dissolvido foi três vezes superior.

Para manter a concentração de oxigênio em um valor satisfatório, deve-se conhecer a velocidade de consumo de oxigênio (RCx) do processo. A velocidade de consumo de oxigênio pode ser definida de acordo com a equação 2-24.

$$R \cdot Cx = \frac{1}{Y_{\%}} \cdot \mu Cx + m_o Cx \quad (2-24)$$

onde: $Y_{\%}$: coeficiente de rendimento de oxigênio a celular ($g_x \cdot g_{O_2}^{-1}$)

m_o : velocidade de consumo de oxigênio para manutenção celular ($g_{O_2} \cdot g_x^{-1} \cdot h^{-1}$)

R : velocidade de respiração específica ($g_{O_2} \cdot g_x^{-1} \cdot h^{-1}$)

μ é a velocidade específica de crescimento

A equação 2-25 é resultante do balanço de massa para o oxigênio no caldo de cultivo.

$$\frac{dCo_2}{dt} = No_2 - R \cdot Cx \quad (2-25)$$

onde: No_2 : velocidade de transferência de oxigênio ($mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

Considerando o estado estacionário e que a velocidade de transferência de oxigênio está limitada somente na interface líquido gás, pode-se calcular o seu valor através da equação 2-26.

$$No_2 = k_L a \cdot (Co_2^* - Co_2) \quad (2-26)$$

onde: $k_L a$: coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})

Co_2^* : concentração de saturação de oxigênio dissolvido ($mmol \cdot L^{-1}$)

Co_2 : concentração de oxigênio dissolvido ($mmol \cdot L^{-1}$)

Tal como pode ser observado pela equação 2-26, o $k_L a$ é uma variável muito importante para o cálculo da velocidade de transferência de oxigênio e seu valor depende de vários fatores como; característica reológica do caldo de cultivo e condições de aeração e agitação.

O valor de $k_L a$ também é importante na elaboração de projetos de biorreatores bem como nas estratégias de controle de processos aeróbios.

Devido à importância do k_{La} , são encontrados na literatura vários métodos para determinar ou até mesmo estimar o valor de k_{La} nos cultivos utilizando microrganismo aeróbios (Shuler e Kargi, 1997).

Há na literatura vários artigos mostrando estudos de correlações para estimar o valor de k_{La} com as condições de aeração e agitação, características geométricas do reator e propriedades do caldo de cultivo (densidade, parâmetros reológicos etc). O trabalho realizado por Badino Jr *et al.* (1999), utilizando cultivos de *Aspergillus awamori*, e o de Montes *et al.* (1999) utilizando a levedura *Trigonopsis variabilis*, comparam os valores de k_{La} obtido através de várias correlações com os valores experimentais obtidos. Ambos os trabalhos o bom ajuste dos valores simulados com os valores experimentais.

Devido a importância da velocidade de transferência de oxigênio, Demirtas *et al.* (2003) estudaram a influência das condições de agitação e aeração na taxa de transferência de oxigênio no crescimento de *Thermus thermophilus* HB27. Para tanto os autores realizam cultivos em fermentadores variando; agitação de 200 a 500 rpm, aeração de 0,5 a 2 vvm e a composição do ar de alimentação do reator. Nesses cultivos, os autores concluíram que os maiores valores de k_{La} e da velocidade de transferência de oxigênio foram obtidos quando se operou o reator a 500 rpm e 2 vvm de ar enriquecido (31% de oxigênio na corrente de entrada). Tal condição foi à única que possibilitou operar o reator sem limitação de oxigênio. Os autores concluíram que a melhor condição de operação para transporte de oxigênio não apresentou a melhor condição de crescimento, devido aos efeitos tóxicos do oxigênio devido ao seu enriquecimento na corrente de ar de entrada.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, conservado na forma de células vegetativas a uma temperatura de -70°C e suspenso em uma solução crioprotetora contendo 10% de glicerol.

3.1.2. Meios de Cultura Utilizados

Os meios de cultura utilizados estão descritos nas Tabelas 3-1, 3-2 e 3-3. O pH nos meios descritos foi controlado em 6,8, exceto para os experimentos realizados para o estudo sobre a influência do pH, quando o mesmo foi mantido nos valores estudados.

Cabe ressaltar que foi utilizado Samprosoy 90NB da Bunge Alimentos na formulação dos meios de produção e de crescimento. A composição do Samprosoy 90 NB fornecida pelo fabricante é apresentada no Apêndice D.

Tabela 3-1: Meios de cultura utilizado para a reativação do microrganismo

| Componentes | MR1 | MR2 |
|---|------|-----|
| Glicerol (g.L^{-1}) | 15 | -- |
| Extrato de malte (g.L^{-1}) | 10 | 10 |
| Peptona bacteriológica (g.L^{-1}) | 10 | -- |
| Triptona (g.L^{-1}) | -- | 5 |
| Extrato de levedo (g.L^{-1}) | 1 | 3 |
| K_2HPO_4 (g.L^{-1}) | 2,5 | -- |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g.L^{-1}) | 0,75 | -- |
| Soluções de sais (mL.L^{-1}) ⁽¹⁾ | 1 | -- |
| MOPS (g.L^{-1}) ⁽²⁾ | 21 | -- |

⁽¹⁾ 1g.L^{-1} de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1g.L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1g.L^{-1} de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

⁽²⁾ ácido 3-[N-Morpholino]-propanesulfônico: utilizado para manter o pH do meio em torno de 6,8.

Tabela 3-2: Meios de culturas utilizados para estudar a influência dos sais na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*

| Componente (g.L ⁻¹) | MP1 | MP1 | MP1 | MP1 | MP1 | MP1 | MP1 | MP1 | MP1 | MP1 |
|---|-------|-------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
| Glicerol | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 |
| Ext. de malte | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Samprosoy 90NB | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Ext. de Levedo | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Óleo de soja | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| MOPS | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| KH ₂ PO ₄ | - | - | - | - | - | 1,25 | 2 | 0,31 | - | 0,58 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | - | - | 0,69 | - | 1,28 |
| NaCl | - | - | - | - | - | 5 | 5 | - | - | - |
| CaCl ₂ | - | - | - | 0,4 | - | - | 0,4 | - | - | - |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 | - | 1 | 0,25 | - | 0,8 |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | - | - | - | - | - | - | 0,1 | - | - | - |
| FeSO ₄ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,2 |
| ZnCl ₂ | - | - | - | - | - | - | 0,05 | - | - | - |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | - | - | - | - | - | - | 0,4 | - | - | - |
| Soluções de sais ⁽¹⁾ (ml.L ⁻¹) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | - |
| Soluções de sais ⁽²⁾ (ml.L ⁻¹) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Soluções de sais ⁽³⁾ (ml.L ⁻¹) | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| Soluções de sais ⁽⁴⁾ (ml.L ⁻¹) | - | - | - | - | - | 1 | - | 1 | - | - |
| Soluções de sais ⁽⁵⁾ (ml.L ⁻¹) | - | - | - | - | - | - | - | - | 10 | - |
| Soluções de sais ⁽⁶⁾ (ml.L ⁻¹) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1,6 |
| Água | dest. | dest. | tor- neira | dest. |

⁽¹⁾ Micronutrientes: MnCl₂.4H₂O (1 g/l), FeSO₄.7H₂O (1 g/l), ZnSO₄.7H₂O (1 g/l)

⁽²⁾ Micronutrientes ad: CuSO₄.5H₂O (1 g/l), CoCl₂ (1 g/l).

⁽³⁾ Soluções de sais: FeCl₃.6H₂O (0,27 g/l), MnCl₂.4H₂O (1,44 g/l), CuSO₄.5H₂O (0,079 g/L), CaCO₃ (14 g/L), ZnCl₂ (0,27 g/L), Na₂SO₄ (1,42 g/L), NaCl (2 g/L), NaNO₃ (9,87 g/L)

⁽⁴⁾ Micronutrientes: FeSO₄.7H₂O (1 g/L), MnCl₂.4H₂O (1 g/L), ZnSO₄.7H₂O (1 g/L), CaCl₂.2H₂O (0,13 g/L)

⁽⁵⁾ Micronutrientes: MgSO₄.7H₂O (25 g/L), FeSO₄.7H₂O (2,5 g/L), Cu(NO₃)₂.3H₂O (0,01 g/L), CoCl₂ (0,055 g/L), CaCl₂.2H₂O (1,38 g/L), ZnCl₂ (1,04 g/L), MnCl₂ (0,62 g/L), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (0,024 g/L)

⁽⁶⁾ Micronutrientes: H₂SO₄ 96% (20,4 g/L), citrato.H₂O (50 g/L), ZnSO₄.7H₂O (16,75), CuSO₄.5H₂O (2,5 g/L), MnCl₂.4H₂O (1,5 g/L), H₃BO₃ (2 g/L) e (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (1,6 g/L)

Tabela 3-3: Meios de produção utilizados para ensaios contínuos, estudo da influência da concentração de fonte de nitrogênio e a importância do extrato de malte na produção de ácido clavulânico por *S. clavuligerus*

| Componente | MP1 | MP2 | MP3 | MP4 | MP5 | MP6 | MP7 | MP8 |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Glicerol (g.L ⁻¹) | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 |
| Extrato de malte(g.L ⁻¹) | 10 | - | 10 | - | - | 10 | 10 | - |
| Samprosoy (g.L ⁻¹) ⁽¹⁾ | 10 | 10 | 30 | 30 | 20 | - | - | - |
| Soytone (g.L ⁻¹) ⁽²⁾ | - | - | - | - | - | 15,7 | 45 | - |
| Peptona | - | - | - | - | - | - | - | 47,5 |
| E. de Levedura (g.L ⁻¹) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - |
| K ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹) | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| MgSO ₄ (g.L ⁻¹) | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 | - |
| Solução de sais ⁽³⁾ (mL.L ⁻¹) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - |
| MOPS ⁽⁴⁾ (g.L ⁻¹) | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | - |

⁽¹⁾ Samprosoy 90 NB: hidrolisado protéico de soja cedido pela Ceval alimentos.

⁽²⁾ Soytone: hidrolisado enzimático de proteína de soja da Difco.

⁽³⁾ Solução de sais contendo: 1g.L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O, 1g.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O e 1g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O

⁽⁴⁾MOPS: utilizado somente na etapa de produção.

Quanto aos meios de cultura apresentados pela Tabela 3-2, o meio MP1A é o mesmo descrito por Rosa (2002). Nos meios MP1B e o MP1D houve adição de sais para verificar a influência de alguns sais na produtividade de ácido clavulânico. No meio MP1C utilizou-se água de torneira. O meio MP1D foi uma reprodução da concentração de sais da água de torneira. Nos meios MP1F, MP1G, MP1H, MP1I e MP1J, a concentrações de sais utilizadas foram obtidos em literatura (Yegnewaran et al., 1991; Romero et al., 1984; Rollins et al.,1989; Kirk et al.,2000; Roubos et al., 2001; respectivamente).

3.1.3. Equipamentos Utilizados

A. Sedimentador

O sedimentador utilizado para avaliar o processo de separação por sedimentação foi projetado por Hojo (1990), equipamento confeccionado no Departamento de Química da UFSCar. Esse equipamento apresenta um volume útil de 500ml e é encamisado para manter baixas temperaturas durante a separação celular. A Figura 3-1 mostra o sedimentador utilizado para testar a viabilidade do processo de sedimentação na separação celular.

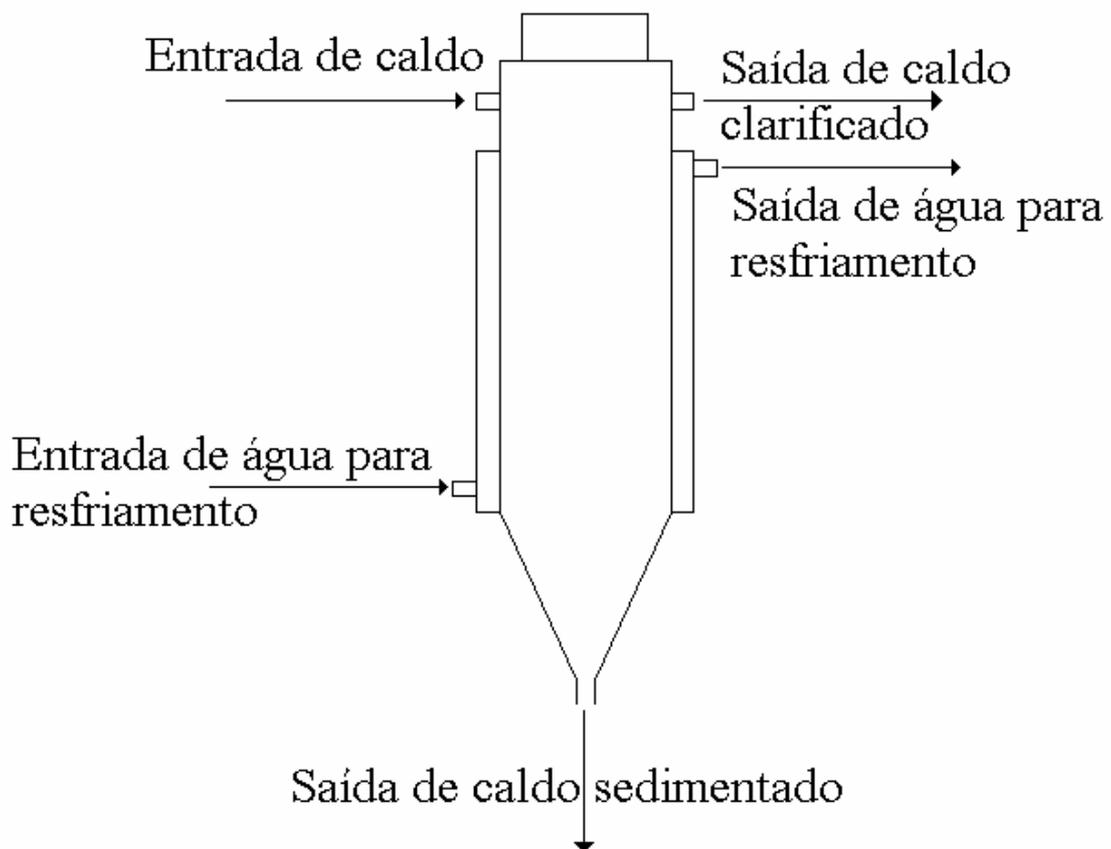


Figura 3-1: Esquema do sedimentador, projetado por Hojo (1990), utilizado para avaliar a viabilidade da utilização do processo de sedimentação na separação celular.

B. “Filtro-Centrífuga”

O “filtro-centrífuga” utilizado foi confeccionado no próprio Departamento de Engenharia Química da UFSCar. O equipamento esquematizado na Figura 3-2 é o suporte para acoplar telas ou chapas finas perfuradas com orifícios de vários diâmetros na parte lateral.

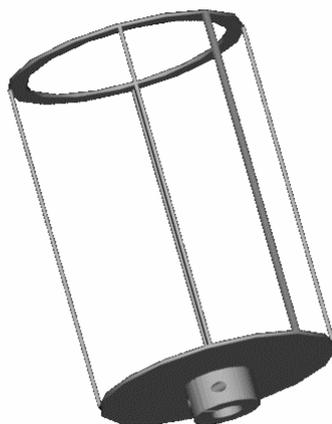


Figura 3-2: Desenho do “filtro-centrífuga” utilizado para separação celular

C. Módulos de Microfiltração

O módulo de microfiltração utilizado, para a realização dos testes, é do tipo fibra oca (“hollow-fiber”) com uma área de membrana de 16 cm^2 e diâmetro de poro de $0,2 \mu\text{m}$, cedida pela A/G Technology Corporation. Esse módulo é composto por duas membranas cilíndricas de diâmetro de 1mm e 30 cm de comprimento composta de polissulfona. Esse módulo de microfiltração, foi utilizado para testes preliminares a fim de determinar a área do módulo a ser utilizado no processo de separação celular.

Um fator importante na escolha do módulo de microfiltração é a sua resistência à esterilização. Optou-se por esterilizar o módulo através de autoclavagem e por isso a sua resistência a uma temperatura de 120°C foi considerada. A membrana escolhida para a realização dos cultivos contínuos com reciclo celular também foi adquirida da A/G Technology Corporation.

O módulo de microfiltração utilizado nos experimentos também é do tipo fibra oca (“hollow-fiber”) e apresenta uma área de 3600 cm² e é composta de 450 membranas cilíndricas de 1 mm de diâmetro e 30 cm de comprimento. A Figura 3-3 mostra um corte transversal do módulo e a Figura 3-4 mostra a sua vista lateral. Na Figura 3-4 também é visto um esquema sobre a operação do módulo de microfiltração. A Figura 3-5 mostra uma foto do módulo de microfiltração.

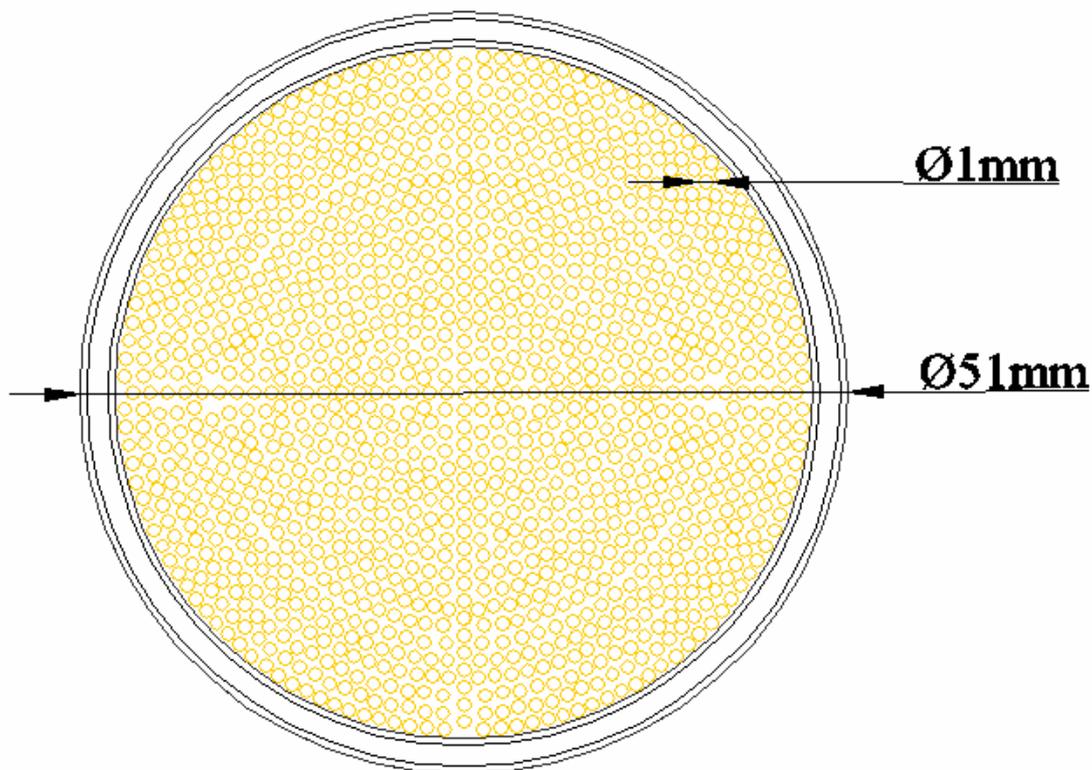


Figura 3-3: Corte transversal do módulo de microfiltração utilizado nos experimentos contínuos com reciclo celular.

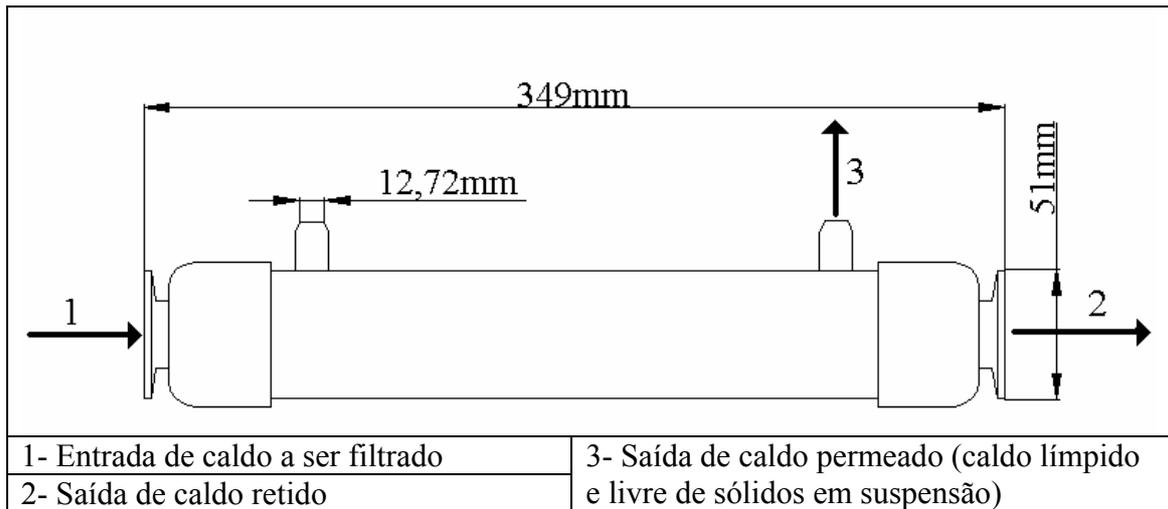


Figura 3-4: Desenho da vista lateral do módulo de microfiltração.



Figura 3-5: Fotografia do módulo de microfiltração utilizado nos cultivos contínuos com reciclo celular

D. Manômetro de Glicerina

Para o controle da pressão do módulo de microfiltração, foi utilizado um manômetro preenchido por glicerina para evitar pulsos no ponteiro do manômetro, ocasionado pela bomba peristáltica utilizada. Esse fato impossibilitaria uma medida precisa da pressão.

E. Câmara Asséptica

Para garantir uma manipulação asséptica do microrganismo foi utilizada uma câmara asséptica de fluxo laminar da marca VECO, contendo um bico de Bunsen e lâmpada germicida UV, em todas as etapas em que se fizeram necessárias.

F. Autoclaves

Alguns materiais envolvidos na realização dos processos de fermentação, tais como meio de cultura, soluções e suspensões diversas, vidraria, reator etc, foram esterilizados em autoclaves marca FABBE, a 121°C.

G. Ultrafreezer

As amostras para análise de ácido clavulânico e glicerol bem como os criotubos contendo os microrganismos foram armazenados em um BIO-FREEZER FORMA SCIENTIFIC a uma temperatura de -70°C

H. Mesa Incubadora Rotativa

Ensaio preliminares, bem como as etapas de reativação e crescimento do microrganismo, foram realizados em mesa incubadora rotativa da New Brunswick Scientific, Inc., modelo G-25 com controles de temperatura e agitação.

I. Centrífuga Refrigerada

As amostras eram centrifugadas em centrífuga refrigerada 5403 EPPENDORF, com capacidade para 6 tubos, podendo conter até 35 ml de volume cada um.

J. Medidor de pH

O valor de pH foi medido utilizando um pHmetro de bancada da Orion YSP710

K. Fluxômetro de Massa

As vazões de alimentação de ar foram medidas com um fluxômetro de massa da Cole Parmer modelo EW33116-10. Cabe ressaltar que o fluxômetro de massa foi utilizado em alguns cultivos a fim de obter valores preciso de vazão de ar para a determinação dos parâmetros de respiração através do balanço gasoso.

L. Viscosímetro

Para as medidas reológicas foi utilizado o viscosímetro LV-DVIII+ de cilindros concêntricos da BROOKFIELD.

M. Analisadores dos Gases de Saída

Para as medidas das frações molares de oxigênio (Y_{O_2}) e de dióxido de carbono (Y_{CO_2}) nos gases de saída do biorreator foram utilizados analisadores de O_2 da Rosemount, modelo 755, e de CO_2 da Rosemount, modelo 880A.

N. Controlador de pH

Em alguns experimentos foi utilizado o controlador de pH da New Brunswick Scientific, INC, modelo pH-40.

O. Bombas

Foram utilizadas bombas da ISMATEC modelos BVP e MCP para a retirada de caldo de cultivo, recirculação de caldo de cultivo e retirada de meio de cultivo.

Também foram utilizadas bombas da INCIBRÁS para o controle de pH.

P. Biorreator de Bancada

Os experimentos foram realizados em biorreator de bancada da New Brunswick modelo Bioflo III com 4L de volume útil. Esse fermentador é munido de controle de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e rotação, bem como rotâmetro para aeração e bombas para a alimentação de meio de cultivo, adição de antiespumante e soluções de ácido e de base.

Q. Cromatógrafo

Para a realização das análises foram utilizados dois sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da WATERS.

Análise de glicerol: Sistema contendo duas bombas modelo 510, refratômetro W410, injetor Rheodyne 7125 com loop de 20 μ l.

Análise de ácido clavulânico: Sistema com duas bombas modelo 515, detector PDA W996, injetor automático com controle de temperatura modelo W717.

3.2. Metodologias

3.2.1. Metodologia Experimental

A. Experimentos em Mesa Incubadora Rotativa

O procedimento para a realização dos experimentos foi descrito por Rosa (2002). Os ensaios foram realizados em três etapas; reativação do microrganismo, crescimento e produção, tal como visualizado na Figura 3-6.

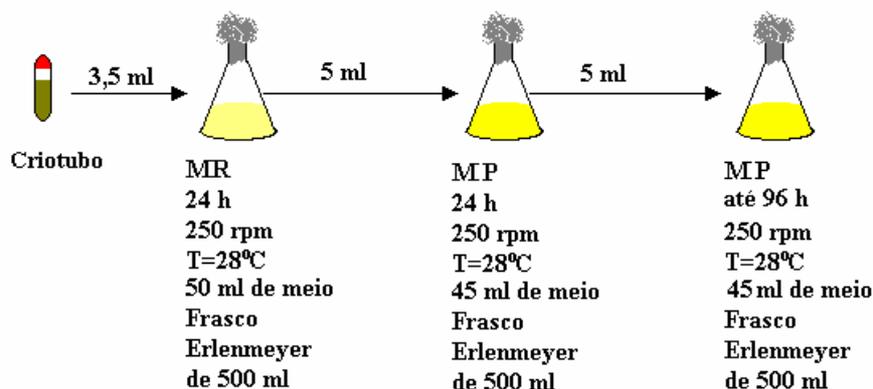


Figura 3-6: Procedimento adotado para cultivos de *Streptomyces clavuligerus* em mesa incubadora rotativa

Para todas as etapas de todos os experimentos em mesa incubadora rotativa, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de caldo de cultivo. Esses frascos foram agitados a 250 rpm e a temperatura controlada em 28°C.

Tal como descrito na Figura 3-6, o procedimento de cultivo é resumido nos seguintes passos:

1) Etapa de reativação: 3,5 mL de suspensão de células vegetativas, previamente descongeladas, foram inoculadas em frascos Erlenmeyers contendo 50 mL de meio de reativação por 24 horas.

2) Etapa de crescimento: Após a etapa de reativação, inoculou-se 5 mL do caldo resultante em frascos Erlenmeyers contendo 45 mL de meio de cultura de produção por mais 24 horas. Cabe ressaltar que, para todos os casos, o volume de inóculo corresponde a 10% do volume total.

3) Etapa de produção: Após a etapa de crescimento, inoculou-se 5 mL do caldo resultante em frascos Erlenmeyers contendo 45 mL de meio de cultura de produção. De tempos em tempos foi retirado um frasco Erlenmeyer para amostragem. Nessas amostras foram determinados os valores dos parâmetros reológicos dos caldos

de cultivo (índice de consistência, K, e índice de comportamento de escoamento, n), a concentração de glicerol e a de ácido clavulânico.

O pH do caldo de cultivo foi mantido, em todas as etapas, em 6,8 através da adição de tampão MOPS, tal como descrito no item sobre os meios de cultura utilizados (item 3.1.2).

B. Experimentos em Fermentador

O procedimento para a realização dos ensaios foi semelhante ao descrito para os ensaios em mesa incubadora rotativa (Figura 3-7), diferenciando-se somente na etapa de produção que é realizada em fermentador.

Em todos os experimentos, para as etapas de reativação e de crescimento, foram utilizados frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 50 mL de caldo de cultivo. Esses frascos foram agitados a 250 rpm em mesa incubadora rotativa, a uma temperatura de 28°C. O pH durante as etapas de reativação e crescimento foi mantida em 6,8 através da adição do tampão MOPS, tal como descrito no item sobre os meios de cultura utilizados (item 3.1.2).

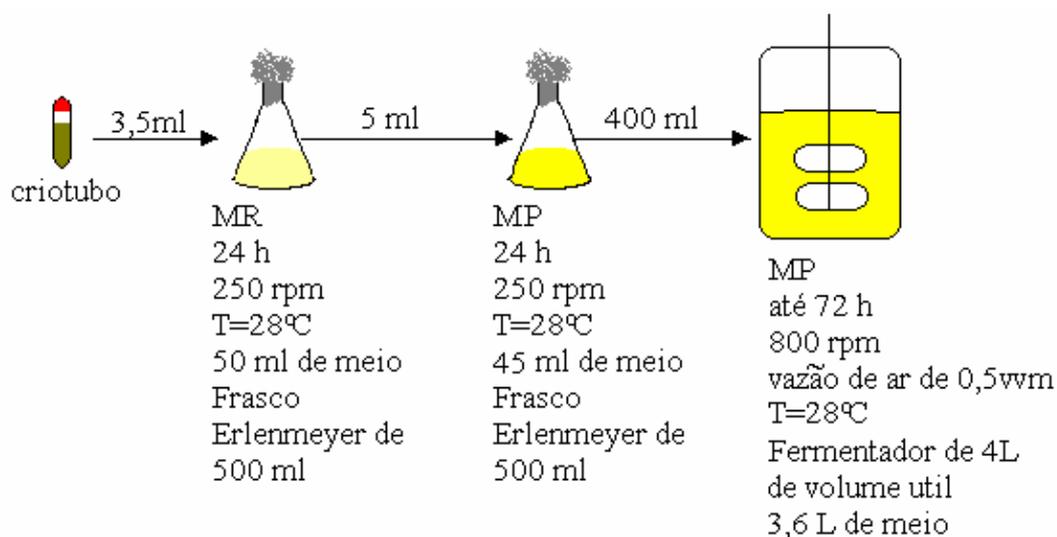


Figura 3-7: Procedimento adotado para cultivos de *Streptomyces clavuligerus* em biorreator de bancada

A etapa de produção foi realizada em fermentador com volume de trabalho de 2,5L, experimentos contínuos, e a 4 L, experimentos em batelada. Nos experimentos realizados em fermentador, foram controladas a temperatura em 28°C, a agitação em 800 rpm e a aeração em 0,5 vvm.

Tal como descrito na Figura 3-7, o procedimento de cultivo é resumido nos seguintes passos:

1) Etapa de reativação: 3,5 mL de suspensão de células vegetativas, previamente descongeladas, foram inoculadas em frascos Erlenmeyers contendo 50 mL de meio de reativação por 24 horas.

2) Etapa de crescimento: Após a etapa de reativação, inoculou-se 5 mL do caldo resultante em frascos Erlenmeyers contendo 45 mL de meio de cultura de produção por mais 24 horas. Cabe ressaltar que, para todos os casos, o volume de inóculo corresponde a 10% do volume total.

3) Etapa de produção: Após a etapa de crescimento, inoculou-se no reator um volume de caldo resultante da etapa de crescimento de tal modo que correspondesse a 10% do volume total de caldo. De tempos em tempos, foram retiradas amostras para análise. Nessas amostras foram determinados os valores dos parâmetros reológicos dos caldos de cultivo (índice de consistência, K, e índice de comportamento de escoamento, n) e as concentrações de ácido clavulânico, de glicerol e de maltose. Devido a presença de sólidos em suspensão, a concentração celular foi determinada em alguns experimentos. Concentrações de nitrogênio, tanto orgânico como na forma amoniacal, foram determinadas na maioria dos experimentos contínuos. Cabe salientar que a determinação da concentração de nitrogênio foi introduzida após um certo tempo do início desse trabalho.

Em alguns cultivos em fermentador, foram realizadas medidas em linha das frações molares de dióxido de carbono e de oxigênio, a fim de determinar os parâmetros de respiração do microrganismo, bem como o valor do coeficiente de transferência gasosa.

Na maioria dos experimentos em fermentador, o pH foi controlado em 6,8, exceto quando se estudou a influência do pH no processo. O controle de pH foi feito através da adição de ácido (4M HCl) e base (1M NaOH) em todos os cultivos em fermentadores.

3.2.2. Metodologias Analíticas

A. Análise de Ácido Clavulânico

Para a determinação de ácido clavulânico utilizou-se o método desenvolvido por Foulstone e Reading (1982). Esse se baseia na determinação de um composto oriundo da derivatização do ácido clavulânico com imidazol, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para a separação do composto derivatizado utilizou-se, como fase estacionária, uma coluna C-18 μ -Bondapak de 300 mm da Waters e uma fase móvel composta de 6% de metanol e 94% de tampão fosfato (0,1 M de KH_2PO_4 ; pH=3,2), a uma vazão de 2,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Os picos foram detectados a um comprimento de onda de 311 nm.

B. Análise de Glicerol e Maltose

As concentrações de glicerol e maltose foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna Shodex KS-802 (Lonpak, divisão da Millipore) e água Milli-Q como eluente. O equipamento foi operado nas seguintes condições: 80°C, 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As concentrações de glicerol e maltose foram determinadas a partir de uma curva de calibração obtida com soluções com concentrações inferiores a 0,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de substrato. Os picos foram detectados utilizando-se um medidor do índice de refração das substâncias (W410 da Waters).

C. Determinação da Concentração de Nitrogênio

A determinação das concentrações de nitrogênio, tanto na forma amoniacal como na forma orgânica (proteínas, peptídeos e aminoácidos) foram realizadas pelo método de Kjeldahl. Para a medida de nitrogênio total na amostra foram necessárias duas etapas: uma para digestão de amostra (transformar todo o nitrogênio em sulfato de amônio) e outra para determinar a concentração de nitrogênio na forma amoniacal. No Apêndice A, o método de Kjeldahl é descrito em detalhes.

D. Determinação da Concentração Celular

A concentração celular foi obtida determinando-se a massa seca à 110°C por 24 horas, após centrifugação (10000g por 10 min) ou filtração (filtro de 0,45 μm de diâmetro de poro) e lavagem de um volume conhecido de amostra.

E. Caracterização Reológica do Caldo de Cultivo

Para o cálculo dos parâmetros reológicos K (índice de consistência) e n (índice de comportamento de escoamento) considerou-se o caldo de cultivo como sendo pseudoplástico. Tais tipos de fluidos seguem a lei da potência, descrita pela equação 2-19.

Os valores de τ (tensão de cisalhamento) e γ (velocidade de cisalhamento) para a determinação de K e n são obtidos através de um viscosímetro de cilindros concêntricos, modelo DV III+ da Brookfield.

F. Cálculo da Velocidade Global de Respiração (R.Cx), da Velocidade de Formação de Dióxido de Carbono (CER), do Quociente de Respiratório (RQ) e do Coeficiente Volumétrico de Transferência de Oxigênio (k_{La})

Para o cálculo de R.Cx, CER e RQ foi utilizado o método do balanço gasoso, bem descrito em vários trabalhos como o de Baptista Neto (2000). O método se baseia no balanço de massa de oxigênio na fase gasosa para se determinar os parâmetros de respiração. A partir de medidas das frações molares de oxigênio (Y_{O_2}), de dióxido de carbono (Y_{CO_2}) do gás efluente do biorreator e da vazão molar de gás na alimentação (ϕ_e), é possível determinar o quociente de respiração (RQ), velocidade global de respiração celular (R.Cx), coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}) e a velocidade de formação de dióxido de carbono (CER). No apêndice B, o método do balanço gasoso é descrito com mais detalhes.

3.2.3. Metodologia Numérica utilizada

Para a realização da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados utilizou-se o Software Microcal-Origin 6.0. Para a determinação dos parâmetros por

métodos não-lineares utilizou-se o método “Quasi-Newton”, implementado no software Statistica 5.5 ou o método Marquardt (1963) implementado em Fortran.

Para o cálculo de derivadas, a partir de valores experimentais, também foi utilizado o Software Microcal-Origin versões 6.0 e 7.0.

A simulação do modelo obtido para os cultivos contínuos utilizou-se o método de resolução de sistemas de equações não-lineares, Newton-Raphson implementado em Fortran.

3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Separação de Células

A. Sedimentação

Como descrito em livros texto de operações unitárias, e.g. Richardson e Coulson (1976), realizou-se o teste da proveta para se obter parâmetros de projeto de um sedimentador para separar as células do caldo de cultivo.

Para tanto, realizou-se um cultivo em mesa incubadora rotativa com um meio livre de sólidos em suspensão, meio MP8 (Tabela 3-3). Após o cultivo, transferiu-se o caldo resultante para uma proveta de 1 L e anotou-se a altura de massa precipitada com o tempo. Após este primeiro teste, realizou-se novo experimento em proveta de 0,5 L no qual se utilizou o precipitado do teste anterior. Neste último, portanto, a concentração celular inicial era o dobro do primeiro teste.

Também foi realizado um experimento utilizando um sedimentador encamisado, contendo um volume útil de 500 mL e que foi utilizado por Hojo (1990). Nesse caso, conectou-se o sedimentador ao fermentador após termino do ensaio F3, descrito no item 3.2.3 adiante. O aparato experimental pode ser visualizado na Figura

3-8. A temperatura do sedimentador foi controlada em 10°C para aumentar a eficiência da precipitação, bem como diminuir a velocidade de morte celular.

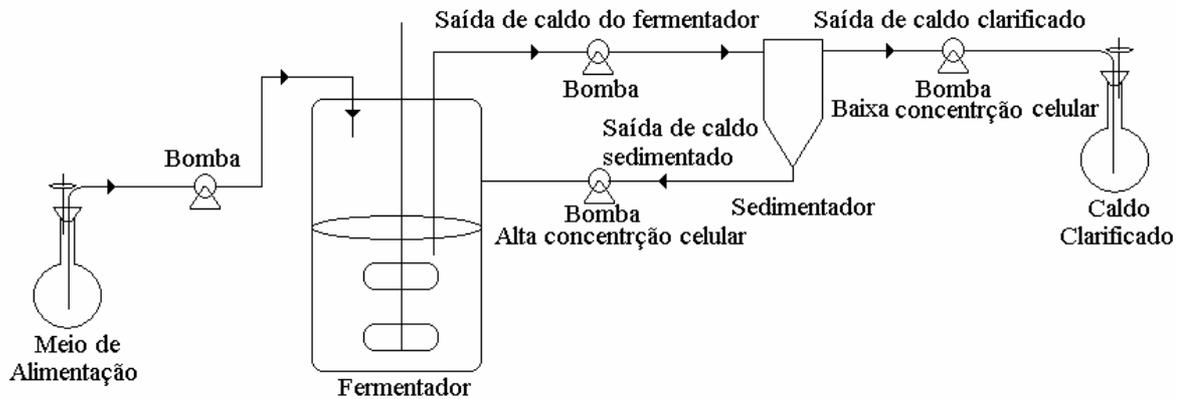


Figura 3-8: Aparato experimental para teste de sedimentação utilizado por Hojo (1990)

B. Filtração por “Filtro-centrífuga”

Neste método, utiliza-se a própria força centrífuga do eixo de agitação do fermentador para separar uma grande quantidade de células do caldo de fermentação. Para os testes realizados, utilizou-se o suporte, descrito no item 3.1, com uma tela fina (furos de 200 mesh ou de 74 μm de diâmetro) e, em um teste posterior, com uma fina chapa perfurada (com furos de 500 μm).

Desta forma, o meio com baixa concentração celular adentra o suporte pela força da gravidade e o sólido mais denso não atravessa os furos devido à força centrífuga. Tal esquema pode ser visualizado pela Figura 3-9.

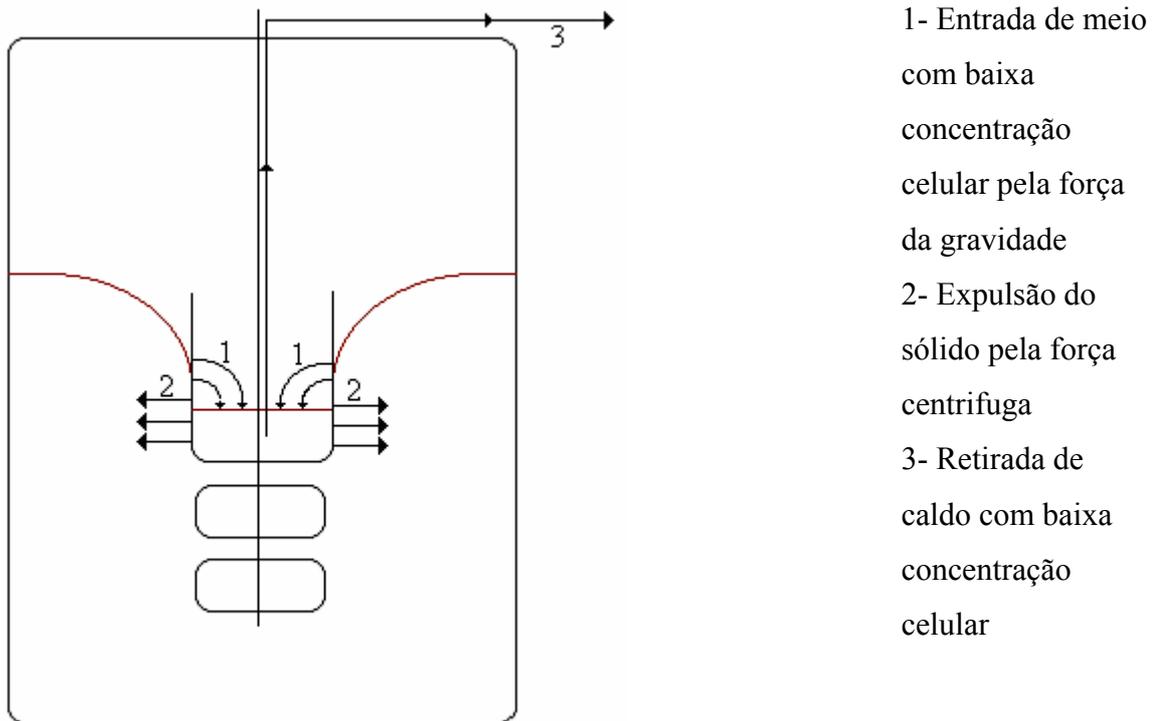


Figura 3-9: Esquema da separação de células pela força centrífuga

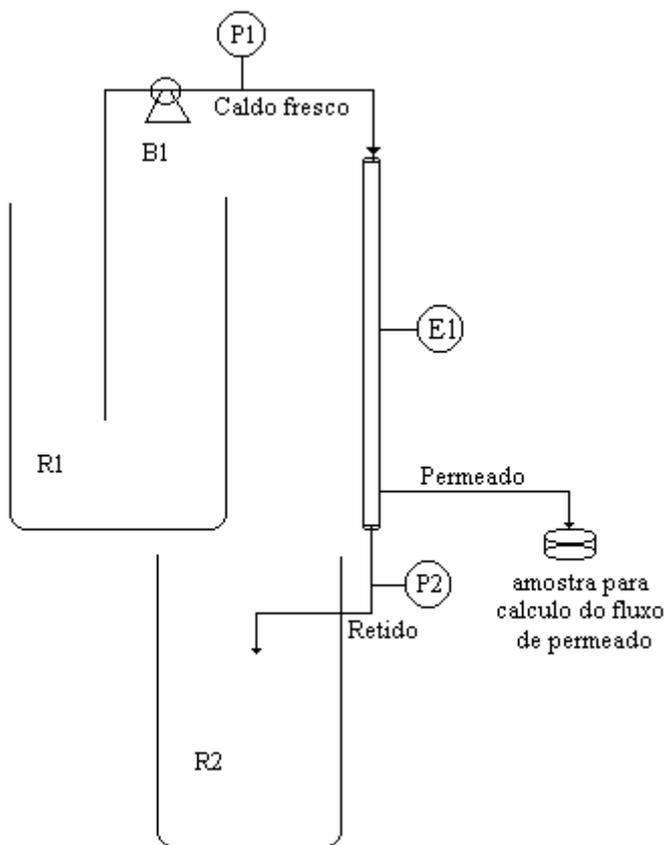
Testes preliminares com este equipamento foram realizados. Para verificar a vazão de água para dentro do aparato utilizando diferentes frequências de rotações e avaliar a possibilidade de utilizar esse equipamento na separação do microrganismo.

C. Microfiltração

A técnica de microfiltração tem sido utilizada em vários bioprocessos. Em cultivos contínuos com reciclo de células também tem sido muito utilizados devido ao fato de se operar por um grande período de tempo sem a necessidade de se interromper o processo para limpeza dos equipamentos.

No presente trabalho testou-se um pequeno módulo de filtração tangencial descrito no item 3.1.3.

O sistema utilizado para o teste é esquematizado pela Figura 3-9



R1, R2: Reservatórios.

P1: Pressão antes da membrana.

P2: Pressão após a membrana.

B1: Bomba peristáltica com vazão controlada.

E1: Módulo de microfiltração.

Figura 3-10: Esquema do aparato experimental utilizado para avaliar o processo de microfiltração

O cálculo da vazão de permeado, e conseqüentemente o seu fluxo através da membrana, é realizado medindo-se a massa de amostra coletada em um intervalo de tempo determinado. O fluxo de permeado pela membrana é uma variável imprescindível para determinar a área da membrana a ser utilizado no sistema de cultivo com reciclo celular.

Trabalhou-se com três vazões de caldo cultivado: $5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e $20 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, resultando em uma velocidade tangencial de fluido dentro da membrana de $5,31\cdot 10^{-2}$; $1,06\cdot 10^{-1}$ e $2,12\cdot 10^{-1} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente. Utilizando a vazão de $10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, também se verificou o efeito da pressão de trabalho sobre o fluxo de permeado. Também foram comparados os coeficientes de rejeição, calculados através da equação 3-1, obtidos nos testes realizados.

$$R_e = 1 - \frac{C_p}{C_r} \quad (3-1)$$

onde: R_e : coeficiente de rejeição (adimensional)

C_p : concentração de sólidos no permeado (g.L^{-1})

C_r : concentração de sólidos no retido (g.L^{-1})

A concentração celular do caldo cultivado utilizado no teste foi de $6,79 \text{ g.L}^{-1}$.

3.3.2. Experimentos em Batelada

Experimentos em Mesa Incubadora Rotativa

Inicialmente, realizaram-se ensaios em mesa incubadora rotativa para a determinação de meio de cultivo apropriado para a realização do trabalho.

O objetivo destes ensaios foi estudar a influência dos sais sobre o processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Para isso, foram fixadas as fontes de carbonos e a de nitrogênio. O meio de reativação utilizado foi o MR2 (Tabela 3-1) e os meios de produções (MP's) estão descritos na Tabela 3-2. O meio MP1A (Tabela 3-2) é o mesmo utilizado por Rosa (2002) em seus experimentos. Como se pode observar pela Tabela 3-2, houve adição de sais aos meios MP1B e o MP1D para verificar a influência desses na produtividade em ácido clavulânico. No meio MP1C, utilizou-se a água de torneira. O meio MP1D foi uma reprodução da concentração de sais minerais da água de torneira, cujos valores foram fornecidos pela SAEE de São Carlos. Nos meios MP1F, MP1G, MP1H, MP1I e MP1J, as concentrações de sais utilizadas foram obtidas em literatura (Yegnewaran *et al.*, 1991; Romero *et al.*, 1984; Rollins *et al.*, 1989; Kirk *et al.*, 2000; Roubos *et al.*, 2001; respectivamente).

Amostras em 48, 72 e 96 h de cultivo foram retiradas. Foram determinados as concentrações de glicerol e de ácido clavulânico, os valores de pH e as caracterizações reológicas dos caldos de cultivo.

Experimentos em Fermentador

A. Ensaio para a Determinação da Massa Celular

Os ensaios Fsoy10 e Fsoy30 foram realizados com meios de cultura contendo diferentes concentrações de fonte de nitrogênio solúvel (Soytone). O objetivo foi de se obter correlações que possibilitem a estimativa da concentração celular quando meios com sólidos em suspensão (meio contendo Samprosoy) são utilizados. O meio utilizado para reativação das células congeladas foi o MR1 (Tabela 3-1). Para as etapas de inóculo e de produção, foi utilizado o meio MP6, para o ensaio Fsoy10, e o MP7, para o ensaio Fsoy 30, ambos descritos na Tabela 3-3. Cabe ressaltar que a concentração de nitrogênio total do meio MP6 é a mesma do meio MP1. O mesmo se aplica para os meios MP7 e MP3.

Somente para o ensaio Fsoy10, foram realizadas medidas em linha da fração molar de oxigênio, de dióxido de carbono na saída do reator e da porcentagem de oxigênio dissolvido. Amostras foram retiradas para determinação das concentrações de células, substrato e ácido clavulânico para ambos os ensaios. Também foi realizada a caracterização reológica do caldo de cultivo.

Cabe ressaltar que, para cumprir o objetivo deste ensaio, valores precisos de concentrações de células devem ser obtidos.

O valor de $Y_{x/g}$ (coeficiente de rendimento de células/glicerol) foi determinado por regressão linear dos dados experimentais de concentrações de células e de glicerol. Também foi determinada uma relação entre biomassa e CO_2 (Y_{Cx/CO_2}) formado, tal como descrito por Baptista-Neto *et al.* (2000).

Quanto a reologia, a equação 3-2, descrita por Baptista Neto (2000), foi utilizada para correlacionar a concentração celular (C_x) com os parâmetros reológicos K e n .

$$Cx = a_1 \cdot K^{a_2} \cdot n^{a_3} \quad (3-2)$$

onde: Cx: concentração celular (g.L⁻¹)

a₁: parâmetro da equação 3-2 (g.cm^{2.a2}.s^{-n.a2}.L⁻¹.dina^{-a2})

a₂ e a₃: parâmetros da equação 3-2 (adimensional)

Os valores dos parâmetros a₁, a₂ e a₃ da equação 3-2 foram ajustados utilizando um método de otimização de parâmetros não-lineares.

B. Estudo da Influência do pH na Produção de Ácido Clavulânico por *S.*

clavuligerus

Com o objetivo de se determinar o valor de pH ótimo para o presente estudo, ensaios com pH 6,2 (F1), 6,8 (F2) e 7,4(F3) foram realizados. Escolheu-se o valor de pH 6,2 devido ao fato da velocidade de degradação do ácido clavulânico ser a menor, como descrito por Bersanetti *et al.* (2000) e Almeida *et al.* (2002).

Para a etapa de reativação utilizou-se o meio MR2 e para a etapa de produção e crescimento foi usado o meio MP1E (Tabela 3-2).

Nos ensaios F1 e F3, foram realizadas análises dos gases de saída e os dados foram registrados a cada hora de cultivo.

Amostras foram retiradas de 3 em 3 horas nas primeiras 24 horas e em 4 em 4 no período subsequente para determinações das características reológicas, da concentração de glicerol, de ácido clavulânico e estimativas da concentração celular.

C. Ensaios em Batelada para Estudo da Composição do Meio

Para verificar a influência do extrato de malte e da concentração de Samprosoy 90NB (fonte de nitrogênio), foram realizado quatro experimentos em batelada. O meio de reativação dos quatro experimentos realizados foi o MR1 (Tabela 3-1). Os meios de inóculo e de produção foram o MP2, MP3, MP4 e MP5 (Tabela 3-3) para os

experimentos FS102, FS301, FS302 e FS202, respectivamente. Cabe ressaltar que os valores obtidos também foram comparados com os descritos por Rosa (2002), utilizando o meio MP1 nas mesmas condições de agitação e aeração.

Para o experimento FS301, amostras foram retiradas a cada 2 horas até 24 horas, quando as amostras passaram a ser retirada a cada 6 horas. Para os demais experimentos, as amostras foram retiradas a cada 3 horas nas primeiras 24 horas e a cada 4 horas até o final do cultivo. As amostras retiradas foram utilizadas para a determinação das concentrações de substratos e ácido clavulânico e para a determinação dos valores dos parâmetros reológicos. O termino dos experimentos ocorria quando a concentração de ácido clavulânico iniciava o declínio.

D. Verificação da Viabilidade dos Lotes de Microrganismos Utilizados

Foram realizados três experimentos em batelada para verificar a produtividade dos lotes de microrganismo. Dois desses experimentos foram realizados para verificar a produtividade do segundo lote de microrganismo, T1 realizado logo após a sua preparação e T2 após 6 meses. O terceiro experimento foi realizado para verificar a produtividade do terceiro lote de microrganismo (T3) logo após a sua preparação. Para isso, o procedimento realizado foi o mesmo descrito nos ensaios em batelada, utilizando o meio MR1, para a etapa de reativação, e o meio MP5, para as etapas de crescimento e produção.

Amostras foram retiradas a cada 3 horas nas primeiras 24 horas de cultivo e de 4 em 4 horas no período subsequente para a determinação da concentração de glicerol e de ácido clavulânico.

E. Estudo da Inibição ou Repressão do Glicerol na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*

Realizou-se um experimento (P1) em batelada para verificar o efeito inibidor e/ou repressor do glicerol na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. O procedimento e condição do cultivo foram os mesmos utilizados para os outros três experimentos em batelada. Porém, após 24 horas de cultivo, houve adição de cerca de 80 g de glicerol para que sua concentração no meio aumentasse de um valor baixo, no qual ocorre a produção de ácido clavulânico, para um valor alto, em torno de 20 g.L⁻¹, com o objetivo de verificar se há queda na velocidade de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.

Amostras foram retiradas a cada 3 horas durante todo o cultivo, pouco antes de adicionar glicerol e logo após a adição desse substrato, a fim de determinar a concentração de glicerol e de ácido clavulânico.

Cabe ressaltar que esse experimento foi realizado com o terceiro lote de microrganismo.

3.3.3. Experimentos Contínuos

A. Ensaio Contínuo sem Reciclo Celular

Foram realizados sete ensaios contínuos sem reciclo celular para obtenção de valores experimentais necessários para o estudo cinético do processo de produção de ácido clavulânico e crescimento do *Streptomyces clavuligerus*.

A Figura 3-11 ilustra o procedimento adotado para a realização dos cultivos contínuos sem reciclo celular.

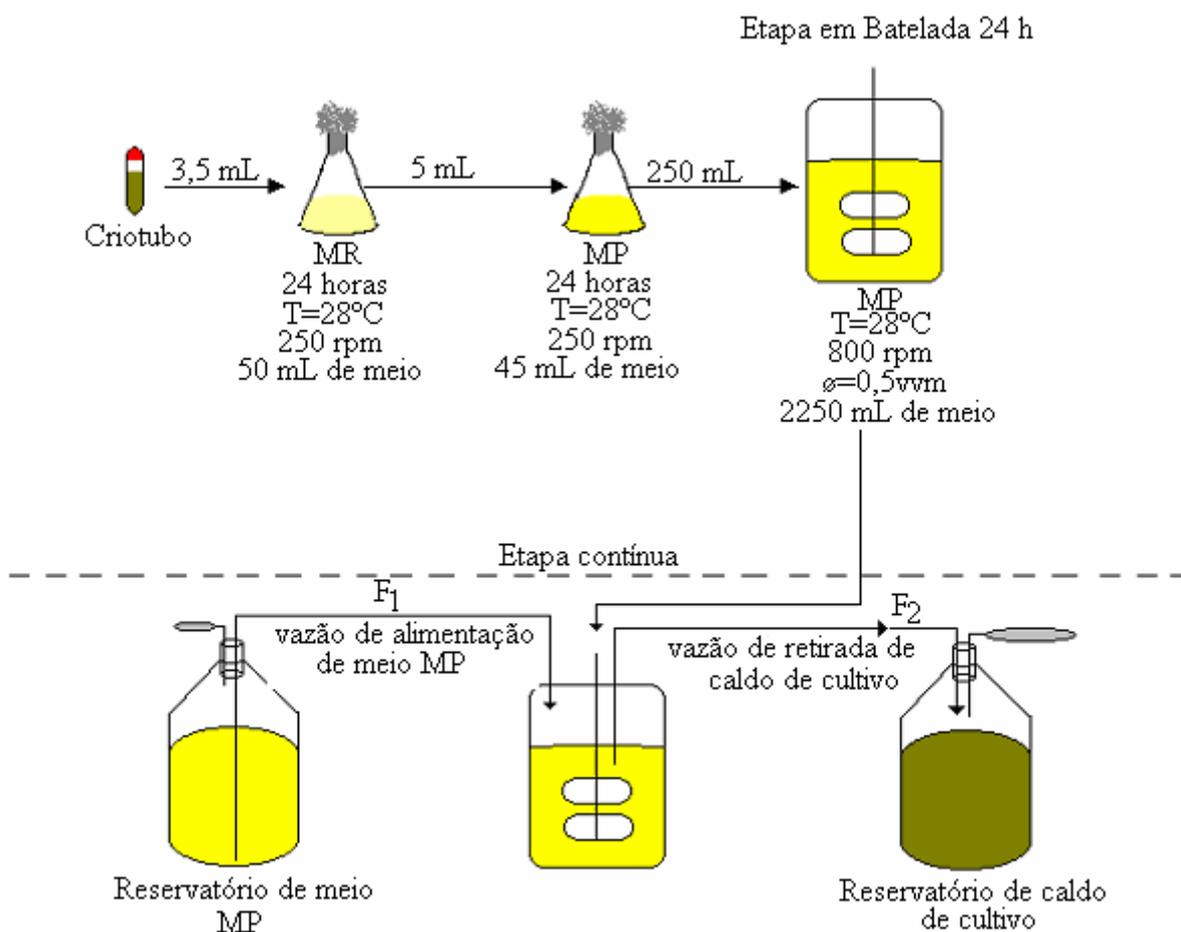


Figura 3-11: Esquema do procedimento adotado para a realização dos experimentos contínuos sem reciclo celular

O procedimento experimental utilizado foi o mesmo para os ensaios em batelada, diferenciando-se somente pela forma de operação que foi contínua. A alimentação de meio de cultura fresco, MP1 para o ensaio C1, MP2 para o ensaio C2 e MP5 para os ensaios C3, C4, C5, C6 e C7, e a retirada de caldo de cultivo se iniciaram após 24 horas do início do cultivo. Para todos os experimentos, o volume de meio no reator foi mantido constante em torno de 2,5 L.

Baseado na Figura 3-11, define-se o tempo de residência e a taxa de diluição através da equação 3-3.

$$D = \frac{1}{\theta} = \frac{V}{F_1} \quad (3-3)$$

Onde: D: taxa de diluição (h^{-1})

θ : tempo de residência (h)

V: volume de caldo no reator (L)

F_1 : vazão de alimentação de meio de cultivo (L.h^{-1})

No primeiro ensaio (C1), foram utilizados os meios MR1 para a etapa de reativação e o meio MP1 para a etapa de crescimento e de produção; para o segundo ensaio (C2), foi utilizado meio MR1 para a reativação e o meio MP2 para as etapas seguintes; e para o terceiro, quarto, quinto, sexto e sétimo ensaio (C3, C4, C5, C6 e C7) foram utilizados o meio MR1 para a reativação e o meio MP5 para as etapas de crescimento e produção.

O reator foi operado com cinco tempos de residências para os experimentos C1, C4 e C7, seis tempos de residência para o experimento C2 e sete tempos de residência para o experimento C3, tais como descritos pela Tabela 3-4. Ressalta-se que os experimentos C5 e C6 não apresentaram resultados por causa de problemas operacionais durante os cultivos.

Tabela 3-4: Valores dos tempos de residência (θ) e das taxas de diluição (D) no qual se operou o reator nos ensaios contínuos sem reciclo celular

| Ponto exp. | C1 | | C2 | | C3 | | C4 | | C7 | |
|------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|
| | D (h^{-1}) | θ (h) |
| 1 | 0,034 | 29,63 | 0,036 | 27,70 | 0,035 | 28,89 | 0,026 | 38,46 | 0,031 | 32,47 |
| 2 | 0,073 | 13,66 | 0,054 | 18,46 | 0,054 | 18,52 | 0,053 | 18,87 | 0,054 | 18,62 |
| 3 | 0,103 | 9,71 | 0,073 | 13,71 | 0,069 | 14,44 | 0,071 | 14,08 | 0,082 | 12,12 |
| 4 | 0,144 | 6,94 | 0,096 | 10,42 | 0,100 | 10,00 | 0,095 | 10,53 | 0,116 | 8,63 |
| 5 | 0,181 | 5,53 | 0,144 | 6,94 | 0,120 | 8,33 | 0,111 | 9,01 | 0,172 | 5,82 |
| 6 | | | 0,180 | 5,56 | 0,160 | 6,25 | | | | |
| 7 | | | | | 0,200 | 5,00 | | | | |

Amostras foram retiradas de tempos em tempos para análise de concentração de células, glicerol e ácido clavulânico bem como para a caracterização reológica do caldo de cultivo. Para os experimentos C3, C4 e C7, também foram determinadas as concentrações de nitrogênio na forma orgânica e na forma amoniacal (pelo método de Kjeldahl), para cada tempo de residência estudado.

Nos experimentos C1, C2, C3, C4; também foram realizadas algumas medidas em linha: fração molar de oxigênio e de dióxido de carbono na saída do reator. As variações das medidas em linha e dos parâmetros reológicos indicaram se o reator estava em regime permanente (estacionário) ou não.

B. Ensaios Contínuos com Reciclo Celular

Foram realizados seis experimentos contínuos com reciclo celular. Todos os experimentos utilizaram o meio de cultivo MP5, para as etapas de crescimento, e produção e o meio MR1, para a etapa de reativação.

O procedimento experimental utilizado, esquematizado pela Figura 3-12, foi o mesmo para os ensaios realizados em batelada, diferenciando-se somente pela forma de operação que foi contínua com reciclo celular. A alimentação de meio de cultura fresco,

MP5, e a retirada de caldo de cultivo se iniciaram após 24 horas de seu início. Tal como nos experimentos contínuos sem reciclo celular, o volume de meio no reator foi mantido constante em torno de 2,5 L.

Baseado na Figura 3-12, define-se o tempo de residência hidráulico (θ_h) e celular (θ_c) de acordo com as equações 3-4 e 3-5.

$$\theta_h = \frac{V}{F_1} \quad (3-4)$$

$$\theta_c = \frac{V}{F_3} \quad (3-5)$$

onde: θ_h : tempo de residência hidráulico (h)

V: volume do reator (L)

F_1 : vazão de entrada de meio de alimentação ($L \cdot h^{-1}$)

θ_c : tempo de residência celular (h)

F_3 : vazão de retirada de caldo do reator com células

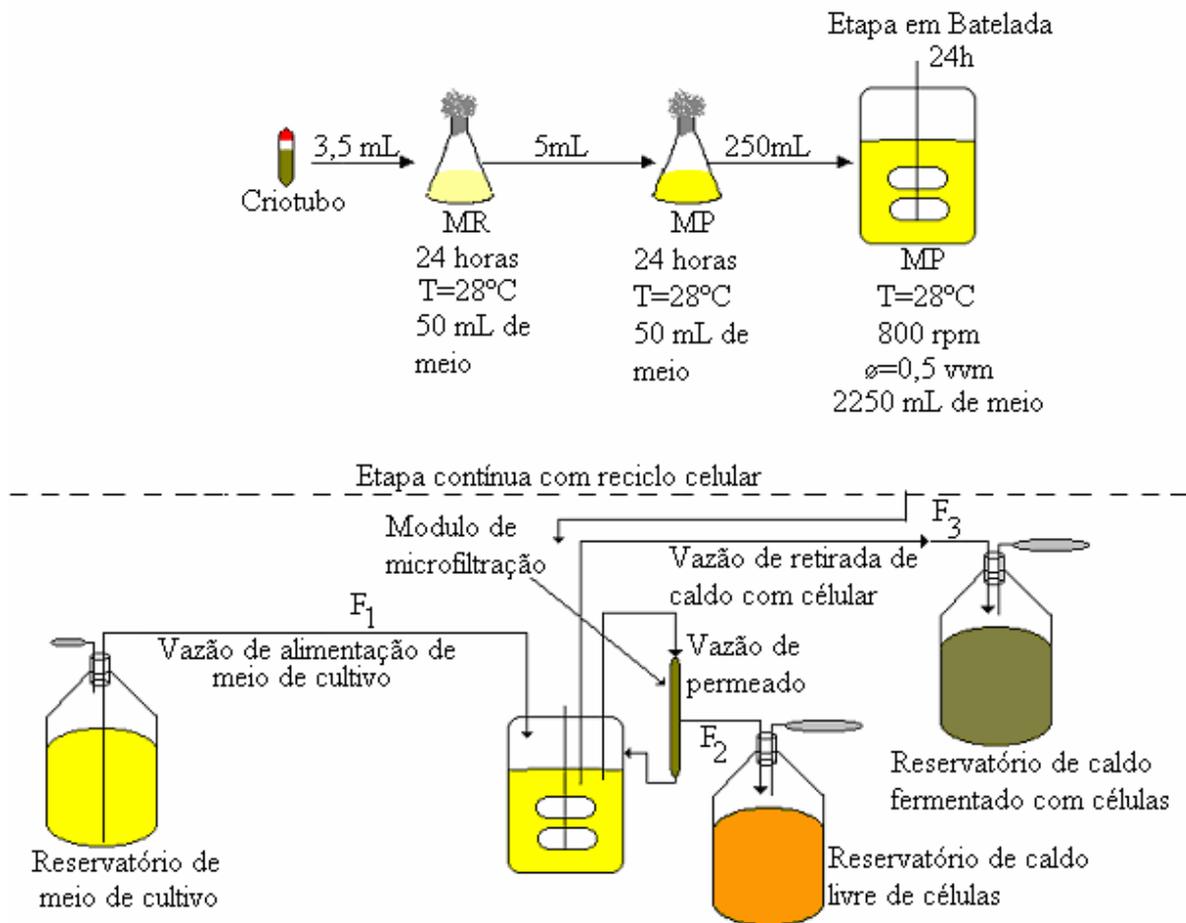


Figura 3-12: Esquema do procedimento utilizado nos cultivos contínuos com reciclo celular

Durante os cultivos contínuos com reciclo celular, operou-se o reator com somente um tempo de residência hidráulico (θ_h). No cultivo CR1, operou-se o reator com três diferentes tempos de residência celular (θ_c); no cultivo CR2, com dois diferentes valores de θ_c e, nos cultivos CR5 e CR6, com somente um tempo de residência celular.

Os experimentos CR2 e CR4 não apresentam resultados devido a problemas operacionais.

A Tabela 3-5 mostra os valores dos tempos de residência hidráulico e celular no qual o sistema foi operado.

Tabela 3-5: Valores dos tempos de residência hidráulico e celular em que se operou o sistema nos experimento CR1, CR3, CR5 e CR6

| Ponto | CR1 | | CR3 | | CR5 | | CR6 | |
|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | $\theta_h(h)$ | $\theta_c(h)$ | $\theta_h(h)$ | $\theta_c(h)$ | $\theta_h(h)$ | $\theta_c(h)$ | $\theta_h(h)$ | $\theta_c(h)$ |
| 1 | 11,8 | 28 | 10,8 | 22 | 18 | 36 | 23 | 36 |
| 2 | 11,8 | 20 | 10,8 | 18 | | | | |
| 3 | 11,8 | 15 | | | | | | |

Nos experimentos contínuos com reciclo de células esperou-se quatro tempos de residência celular para garantir que os valores experimentais estivessem nos respectivos estados estacionários.

Amostras foram retiradas para análise de concentração de células, glicerol e ácido clavulânico, bem como para a caracterização reológica do caldo de cultivo. Também foi determinada, em todos os experimentos contínuos com reciclo celular, a concentração de nitrogênio na forma orgânica e na forma amoniacal para cada tempo de residência estudado.

No experimento CR5, realizou-se medida em linha: a fração molar de oxigênio e de dióxido de carbono na saída do reator e a porcentagem de oxigênio dissolvido.

As variações das medidas dos parâmetros reológicos indicaram se o reator estava em regime permanente (estacionário) ou não.

Uma fotografia do sistema operando é mostrada na Figura 3-13.



Figura 3-13: Fotografia de um experimento contínuo com reciclo celular

3.4. Tratamento Numérico dos Valores Experimentais

3.4.1. Cálculo das Produtividades em Ácido Clavulânico e das Produtividades Específicas do Microrganismo.

Os valores de produtividades em ácido clavulânico e das produtividades específicas do microrganismo são importantes para determinar o melhor processo a ser utilizado.

As produtividades em ácido clavulânico dos experimentos em batelada foram determinadas pela equação 3-6.

$$P_{ac} = \frac{Cp}{t} \quad (3-6)$$

onde: P_{ac} : produtividade em ácido clavulânico ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Cp : concentração de ácido clavulânico (mg.L^{-1})

t : tempo de cultivo (h)

Para o cálculo da produtividade específica no processo em batelada foi determinada a velocidade global de produção de ácido clavulânico pela equação 3-7, obtida através do balanço de massa para cultivos em batelada.

$$Vac = \frac{dC_p}{dt} \quad (3-7)$$

onde: Vac : velocidade de produção de ácido clavulânico ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Com a determinação da velocidade global de produção de ácido clavulânico, foi calculada a produtividade específica do microrganismo através da equação 3-8.

$$Pe_{ac} = \frac{Vac}{Cx} \quad (3-8)$$

onde: Pe_{ac} : produtividade específica do microrganismo ($\text{mg.g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Para a determinação da produtividade em ácido clavulânico nos processos contínuos sem e com reciclo celular foi utilizada a equação 3-9.

$$Pac = \frac{Cp}{\theta} \quad (3-9)$$

Cabe ressaltar que, para os cultivos contínuos com reciclo celular, foi considerado o tempo de residência hidráulico para o cálculo da produtividade em ácido clavulânico.

Quanto à produtividade específica do microrganismo nos experimentos contínuos, o cálculo foi feito utilizando a equação 3-10.

$$Pe_{AC} = \frac{Pac}{Cx} \quad (3-10)$$

Através das equações descritas neste item, calculou-se as produtividades em ácido clavulânico, velocidade global de produção, bem como a produtividade específica que são variáveis importantes para a discussão dos resultados obtidos neste trabalho.

3.4.2. Modelagem Cinética

Para a elaboração do modelo cinético do bioprocesso, inicialmente foi realizado um balanço de massa para processo contínuo sem reciclo celular. As equações 3-11 a 3-13 é resultado desse balanço.

$$D \cdot (Cx - Cx_0) = r_x - r_m \quad (3-11)$$

$$D \cdot (Cs - Cs_0) = -\frac{\mu}{Y_{X/S}} \cdot Cx - m \cdot Cx \quad (3-12)$$

$$D \cdot (Cp - Cp_0) = \alpha \cdot \mu \cdot Cx + \beta \cdot Cx - k_{dp} Cp \quad (3-13)$$

onde: Cx_0 : concentração de células que entra no reator, que é igual a zero (g.L^{-1})

Cs : concentração de substrato limitante (g.L^{-1})

Cs_0 : concentração de substrato limitante que entra no reator (g.L^{-1})

Cp : concentração de produto (mg.L^{-1})

Cp_0 : concentração de produto que entra no reator, que é igual a zero (mg.L^{-1})

α : relação entre a velocidade de produção e a velocidade de crescimento celular (mg.g_x)

β : constante de formação de produto ($\text{mg.g}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

μ : velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

m : constante de manutenção do microrganismo ($\text{g}_s \cdot \text{g}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

$Y_{X/S}$: coeficiente de rendimento de substrato á células ($\text{g}_x \cdot \text{g}_s^{-1}$)

k_{dp} : constante de degradação de produto (h^{-1})

r_m : velocidade de morte celular ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

r_x : velocidade de crescimento celular ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

A. Considerando Somente um Substrato Limitante no Modelo Cinético de Crescimento Celular

A primeira hipótese considerada foi que somente o glicerol estaria influenciando na velocidade de crescimento celular, tal como nos modelos clássicos. Com isso o processo de crescimento celular pode ser representado pela equação 3-14.



onde: c_1, c_2, c_3, c_4 e c_5 : coeficientes pseudo-estequiométricos.

S: representa a fonte de carbono (glicerol)

N: representa a fonte de nitrogênio

X: representa as células

Com isso, a velocidade de crescimento celular pode ser determinada pela equação 3-15.

$$r_x = \mu \cdot Cx \quad (3-15)$$

Como o processo de crescimento celular pode ser representado pela equação 3-14, pode-se deduzir a equação 3-16 para determinar o valor coeficiente de rendimento de glicerol a células.

$$Y_{X/G} = \frac{Cx_0 - Cx}{Cg_0 - Cg} \quad (3-16)$$

onde: $Y_{X/G}$: coeficiente de rendimento de glicerol a células ($g_x \cdot g_g^{-1}$)

Cg : concentração de glicerol ($g \cdot L^{-1}$)

Cg_0 : concentração de glicerol na alimentação do reator ($g \cdot L^{-1}$)

Cx_0 : concentração de células na alimentação do reator ($g \cdot L^{-1}$)

Cinética de Crescimento de Monod

Inicialmente, considerou-se a cinética de Monod para descrever o crescimento do microrganismo. Também foi considerado que a velocidade de morte celular não influenciaria o processo ($k_d=0$). Com isso pode-se reescrever a equação 3-14 de acordo a equação 3-17.

$$\frac{1}{D} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} \frac{1}{C_g} - \frac{1}{\mu_{\max}} \quad (3-17)$$

onde: μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})

K_s : constante de saturação de Monod ($g.L^{-1}$)

Para a determinação dos parâmetros da equação 3-17, foi realizada uma regressão linear, ajustando o modelo aos valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7, tanto juntos como separadamente.

Após a determinação dos parâmetros do modelo de crescimento, foi determinado o valor de $Y_{X/G}$ através da equação 3-16. Foram utilizados os mesmos valores experimentais para a determinação dos parâmetros de crescimento celular.

Com isso, após a determinação dos valores dos parâmetros do modelo, utilizou-se o sistema formado pelas equações 3-18 e 3-19 para simular os perfis de concentrações de células e de glicerol.

$$D = \frac{\mu_{\max} \cdot C_g}{K_s + C_g} \quad (3-18)$$

$$D = \frac{-\frac{1}{Y_{X/G}} \frac{\mu_{\max} \cdot C_g}{K_s + C_g} \cdot C_x}{C_g - C_{g_0}} \quad (3-19)$$

Cinética de Crescimento de Contois

Após ajustar o modelo baseado na cinética de Monod, considerou-se o modelo de Contois para descrever o crescimento celular. Nesse modelo também não foi

considerada a velocidade de morte celular ($k_d=0$). Com isso pode-se reescrever a equação 3-11 de acordo a equação 3-20.

$$D = \frac{\mu_{\max} \cdot C_g}{K_x \cdot C_x + C_g} \quad (3-20)$$

onde: K_x : constante de Contois ($g_s \cdot g_x^{-1}$)

Os parâmetros da equação 3-20 foram determinados por um método de ajuste não-linear, tal como descrito em detalhes no item 3.2.3 (Metodologia numérica utilizada).

Para o ajuste do modelo, também foram considerados os valores dos cultivos C3, C4 e C7 tanto juntos como separadamente.

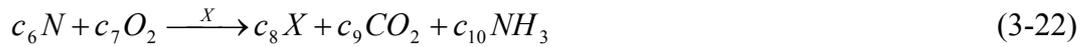
O modelo utilizado para simular as concentrações celulares e de glicerol é composto pelas equações 3-20 e 3-21.

$$D = \frac{1}{Y_{X/G}} \frac{\mu_{\max} \cdot C_g}{K_x \cdot C_x + C_g} \cdot C_x}{C_g - C_{g_0}} \quad (3-21)$$

Os valores de $Y_{X/G}$ utilizados foram os mesmos determinados para o modelo de Monod considerando somente um substrato limitante. Com isso, simulou os perfis de concentração de células e de glicerol e os comparou com os experimentais.

B. Considerando dois Substratos no Modelo Cinético de Crescimento Celular

Neste caso, considerou-se que o microrganismo está consumindo simultânea e independentemente o glicerol e aminoácidos provenientes do Samprosoy 90 NB como fonte de carbono e energia para o crescimento celular e, por isso, a sua velocidade de crescimento depende da concentração de ambos os substratos. Com isso, o processo de crescimento do microrganismo pode ser representado pelo sistema de equação formada pelas equações 3-14 e 3-22.



onde: $c_6, c_7, c_8, c_9, c_{10}$: coeficientes de pseudo-estequiométricos.

Com isso, a velocidade de crescimento celular pode ser determinada pela 3-23.

$$r_x = \mu_1 \cdot Cx + \mu_2 \cdot Cx \quad (3-23)$$

onde: μ_1 : velocidade específica de crescimento relacionado ao consumo de glicerol (h^{-1})

μ_2 : velocidade específica de crescimento relacionado ao consumo de nitrogênio orgânico (h^{-1})

Como o processo de crescimento celular pode ser representado pelas equações 3-14 e 3-22, pode-se deduzir a equação 3-24 para determinar os valores tanto do coeficiente de rendimento de glicerol a células bem como de rendimento de fonte de nitrogênio a células.

$$Cx - Cx_0 = Y_{X/G}(Cg_0 - Cg) + Y_{X/N}(Cn_0 - Cn) \quad (3-24)$$

onde: $Y_{X/G}$: coeficiente de rendimento de glicerol a células ($g_X \cdot g_G^{-1}$)

$Y_{X/N}$: coeficiente de rendimento de nitrogênio orgânico a células ($g_X \cdot g_N^{-1}$)

Cn : concentração da fonte de nitrogênio orgânica ($g \cdot L^{-1}$)

Cn_0 : concentração inicial da fonte de nitrogênio orgânica ($g \cdot L^{-1}$)

Para esta etapa de ajuste, foi utilizada somente a cinética de Contois, na descrição do crescimento do microrganismo. Nesse caso, também foi desconsiderada a velocidade de morte celular. Considerando a utilização dos dois substratos para o crescimento e a equação de balanço 3-11, obtém-se a equação 3-25 para descrever a cinética de crescimento do microrganismo.

$$D = \frac{\mu_{\max 1} \cdot Cg}{Kx_1 \cdot Cx + Cg} + \frac{\mu_{\max 2} \cdot Cn}{Kx_2 \cdot Cx + Cn} \quad (3-25)$$

onde: $\mu_{\max 1}$: velocidade máxima específica de crescimento relacionado ao consumo de glicerol (h^{-1})

$\mu_{\max 2}$: velocidade máxima específica de crescimento relacionado ao consumo de nitrogênio orgânico (h^{-1})

Kx_1 : constante de Contois para o crescimento relacionado ao consumo de glicerol ($g_g \cdot g_x^{-1}$)

Kx_2 : constante de Contois para o crescimento relacionado ao consumo de nitrogênio orgânico ($g_N \cdot g_x^{-1}$)

Para o ajuste do modelo, também foram considerados os valores dos cultivos C3, C4 e C7 tanto juntos como separadamente.

Após o ajuste do modelo cinético de crescimento celular foi examinado o modelo de consumo de substrato. Reescrevendo a equação 3-7 tanto para o consumo de glicerol como para consumo de nitrogênio orgânico, obtêm-se as equações 3-26 e 3-27.

$$D \cdot (Cg - Cg_0) = -\eta_1 \frac{\mu_{\max 1} \cdot Cg}{Kx_1 \cdot Cx + Cg} \cdot Cx - m \cdot Cx \quad (3-26)$$

$$D \cdot (Cn - Cn_0) = -\eta_2 \frac{\mu_{\max 2} \cdot Cn}{Kx_2 \cdot Cx + Cn} \cdot Cx \quad (3-27)$$

onde: η_1 : relação entre velocidade de consumo de glicerol para o crescimento celular e a velocidade de crescimento celular ($g_g \cdot g_x^{-1}$).

η_2 : relação entre a velocidade de consumo de fonte de nitrogênio para o crescimento celular e a velocidade de crescimento celular ($g_N \cdot g_x^{-1}$).

No modelo cinético para descrever a velocidade de consumo da fonte de nitrogênio, uma parcela para a manutenção celular não foi considerada. Diferentemente, para a velocidade de consumo de glicerol o coeficiente de manutenção foi considerado.

Com isso foram determinados os valores de η_1 e η_2 , bem como o coeficiente de manutenção celular.

Para o ajuste dos parâmetros do modelo de crescimento celular, bem como de consumo de substrato, foram utilizados os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7, tanto juntos como separadamente.

E, finalizando, foram determinados os valores dos parâmetros do modelo cinético de produção de ácido clavulânico. Para tanto, utilizou-se a equação 3-13, desprezando o termo ligado à produção associada ao crescimento celular ($\alpha=0$).

Os parâmetros dos modelo propostos foram determinados por um método de ajuste não-linear, tal como explicado mais detalhadamente no item 3.2.3 (Metodologias Numérica Utilizadas).

Após determinar os valores dos parâmetros, compararam-se os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7 com os valores simulados pelo modelo.

C. Modelagem Cinética do Processo Contínuo com Reciclo Celular

O modelo cinético deve explicar tanto o processo contínuo sem reciclo celular como o processo com reciclo.

Para tanto, estabeleceram-se equações de balanço material para o sistema com reciclo celular e os resultados experimentais foram comparados com os obtidos através do modelo proposto.

As equações de 3-28 a 3-31 foram obtidas a partir do balanço de massa para o cultivo contínuo com reciclo celular.

$$\frac{1}{\theta_c} = \frac{\mu_{\max 1} \cdot Cg}{Kx_1 \cdot Cx + Cg} + \frac{\mu_{\max 2} \cdot Cn}{Kx_2 \cdot Cx + Cn} \quad (3-28)$$

$$\frac{1}{\theta_h} = \frac{-\eta_1 \frac{\mu_{\max 1} \cdot Cg}{Kx_1 \cdot Cx + Cg} \cdot Cx - m \cdot Cx}{(Cg - Cg_0)} \quad (3-29)$$

$$\frac{1}{\theta_h} = \frac{-\eta_2 \frac{\mu_{\max 2} \cdot Cn}{Kx_2 \cdot Cx + Cn} \cdot Cx}{(Cn - Cn_0)} \quad (3-30)$$

$$\frac{1}{\theta_h} = \frac{\beta \cdot Cx - k_{dp} Cp}{(Cp - Cp_0)} \quad (3-31)$$

3.4.3. Estudo de Correlação dos Parâmetros Reológicos com a Concentração Celular

Os valores dos parâmetros reológicos K e n determinados foram correlacionados com a concentração celular.

Para correlacionar K com a concentração celular foram utilizadas a equação da lei da potência, equação 2-21, e a equação proposta por Goudar *et al.* (1999), equação 2-22.

Para correlacionar n com a concentração celular utilizou-se a equação da logística, equação 2-23, proposta por Cross (1965, apud Goudar *et al.*, 1999).

Os modelos descritos foram ajustados aos valores experimentais obtidos em todos os experimentos descritos nesse trabalho, através de métodos numéricos, tal como descrito no item 3.2.3 (Metodologias Numéricas Utilizadas).

3.4.4. Determinação da Velocidade de Respiração Específica (R)

O valor da velocidade de respiração é definido pela equação 2-24.

Em cultivos contínuos, a velocidade específica de crescimento celular é controlada através da taxa de diluição e, por isso, é possível simplificar a equação 2-24 e obter a equação 3-32.

$$R = \frac{1}{Y_{x/o}} \cdot D + m_o \quad (3-32)$$

Os parâmetros da equação 3-32 foram determinados para cada um dos experimentos contínuos sem reciclo celular através de regressão linear.

3.4.5. Correlação para a Determinação do Coeficiente Volumétrico de Transferência de Oxigênio (k_La)

Existem na literatura várias correlações para a determinação do valor de k_La considerando agitação, aeração, viscosidade etc. No presente trabalho, as condições de agitação e aeração foram constantes e por isso se teve como objetivo correlacionar o valor de k_La com as características reológicas do caldo de cultivo.

Inicialmente, calculou-se a viscosidade aparente (μ_{ap}). De acordo com Metzner *et al.* (1961 *apud* Badino Jr, 1997), definiu-se a equação 3-33 para o cálculo de μ_{ap} .

$$\mu_{ap} = K \cdot (k \cdot N)^{n-1} \quad (3-33)$$

Onde: k: constante para sistemas e varia de 10 a 12 (adimensional)

N: frequência de agitação (Hz)

Para fermentadores tipo Rushton (tanque agitado por dois impelidores de 6 pás tipo turbina) o valor é de 11,5.

Com isso, correlacionou-se o valor da viscosidade aparente com os valores de k_La , obtidos pelo balanço gasoso, através da equação 3-34.

$$k_L a = \alpha_1 \cdot \mu_{ap}^{\beta_1} \quad (3-34)$$

Onde: $k_L a$: coeficiente de transferência de oxigênio (h^{-1})

α_1 : constante da equação 3-34 ($\text{cm}^{2\beta_1} \cdot \text{dina}^{-\beta_1} \cdot \text{s}^{-\beta_1} \cdot \text{h}^{-1}$)

β_1 : constante da equação 3-34 (adimensional)

Para a determinação das constantes das equações 3-34 foram utilizados todos os valores experimentais dos cultivos contínuos sem e com reciclo celular.

4. Resultados e Discussões

4.1. Separação de Células

A. Sedimentador

Inicialmente realizaram-se 2 testes de proveta para verificar a possibilidade de se utilizar um sedimentador como sistema de separação.

No primeiro teste, a concentração inicial de células foi de $3,78 \text{ g.L}^{-1}$. O gráfico da Figura 4-1 descreve a variação da altura da biomassa precipitada e a concentração desta com o tempo. Este teste realizado foi em proveta de 1L.

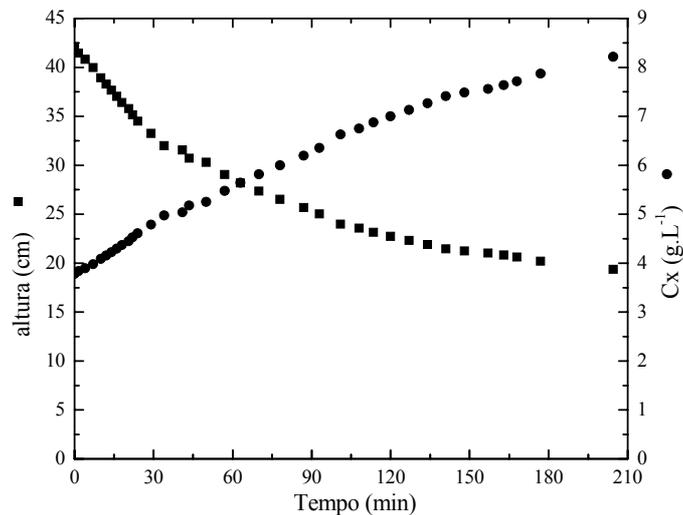


Figura 4-1: Variação da altura de sedimentado com o tempo para concentração inicial de células de $3,78 \text{ g.L}^{-1}$

Apesar da alta velocidade inicial de sedimentação, a concentração final do caldo de cultivo obtida foi inferior a três vezes o seu valor inicial depois de um tempo de espera de 5,5 horas. Tal fato impossibilita a utilização deste sistema para a separação do microrganismo, pois o processo tem que concentrar melhor a massa celular num tempo menor para não prejudicar a viabilidade do microrganismo no processo.

No segundo teste, foi utilizado um caldo de cultivo com concentração celular de $7,56 \text{ g.L}^{-1}$ numa proveta de 500 mL. Os resultados podem ser visualizados no gráfico da Figura 4-2. Como pode ser observado, nessas condições o precipitado forma a chamada zona de compressão, isto é, para se obter maior concentração, é necessária força externa.

Também se testou o sedimentador utilizado por Hojo (1990). Porém, como previsto pelo teste da proveta, o sedimentador utilizado por Hojo (1990) não apresentou um resultado satisfatório apesar do alto tempo de residência no sedimentador, de cerca de 10 horas. A separação celular não foi boa, confirmada pelos valores próximos do parâmetro reológico K no sedimentado ($14,5 \text{ Pa.s}$), no clarificado ($15,0 \text{ Pa.s}$) e no caldo a ser separado ($15,2 \text{ Pa.s}$); isto indica valores próximos de biomassa nos três pontos do sedimentador.

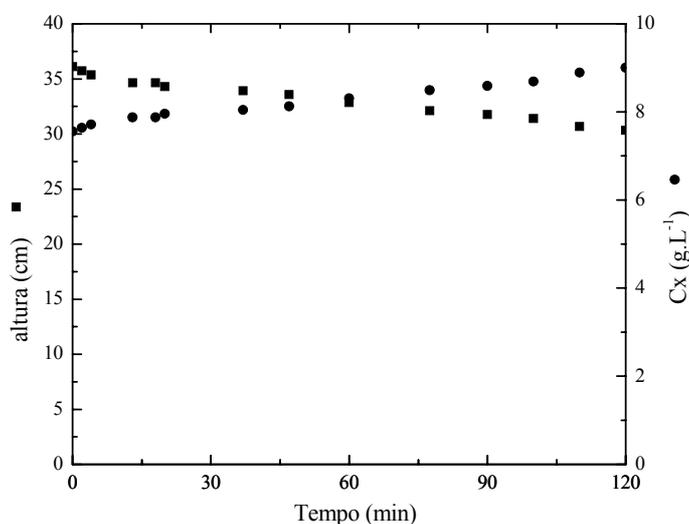


Figura 4-2: Variação da altura de sedimentado com o tempo para concentração inicial de células igual de $7,56 \text{ g.L}^{-1}$

B. Filtração por “Filtro-Centrífuga”

O teste realizado com o “filtro-centrifuga” também não foi satisfatório. Ensaios preliminares com água mostraram que este equipamento não apresenta uma alta vazão de filtrado quando se usa a tela de 200 mesh (74 μm de abertura) mesmo a baixas rotações.

Quanto à chapa perfurada, resultados semelhantes também foram encontrados. Neste caso, também com testes preliminares utilizando água, para uma frequência de agitação de 300 rpm obteve-se uma vazão de filtrado de 203 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (12,18 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$). Aumentando a frequência de agitação para 325 rpm a vazão de filtrado foi de 51 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (3,06 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) e para uma rotação de 350 rpm não houve vazão de filtrado. Sendo a frequência de agitação fixada em 800 rpm para a realização dos cultivos, tais condições seriam inviáveis de serem aplicadas.

Com isso, a utilização de chapas com furos maiores seria necessária para verificar a viabilidade do uso desta técnica para a separação de células.

Para a sua utilização no processo, este sistema necessitaria de um estudo mais intenso e detalhado, com novas configurações e diâmetro dos furos.

C. Microfiltração

O processo de microfiltração também foi avaliado, obtendo-se os resultados descritos na Tabela 4-1.

Tabela 4-1: Resultados dos testes de microfiltração; valores de vazão (Q), velocidade tangencial (v), fluxo de permeado e coeficiente de rejeição (R_e)

| Q (ml.min ⁻¹) | v (m/s) | P _{média} (mmHg) (P1 Figura 3-4) | P _{média} (mmHg) (P2 Figura 3-4) | Fluxo de permeado (ml.min ⁻¹ .m ⁻²) | R _e |
|------------------------------|------------------------|--|--|---|----------------|
| 5 | 5,31.10 ⁻² | 44 | 13 | 177 | 1 |
| 10 | 10,6 .10 ⁻² | 66 | 16 | 219 | 1 |
| 20 | 21,2.10 ⁻² | 100 | 27 | 294 | 1 |
| 10 | 10,6.10 ⁻² | 159 | 102 | 386 | 1 |
| 10 | 10,6.10 ⁻² | 384 | 278 | 478 | 1 |

Como pode ser observado, os resultados obtidos utilizando o processo de microfiltração foram bastante satisfatórios, mostrando um alto valor do coeficiente de rejeição (R_e), fato que indica a obtenção de um permeado límpido. Tal fato indica que pode-se separar totalmente a massa celular do caldo de fermentação e, dependendo da área da membrana, pode ser utilizada uma alta vazão de caldo de cultivo.

A Figura 4-3 mostra uma fotografia de um volume de caldo microfiltrado obtido durante um cultivo contínuo com reciclo celular no qual se observa que o permeado resultante da microfiltração do caldo de fermentação é bem límpido.

Cabe ressaltar que uma das vantagens em obter caldo livre de células é a eliminação de uma das etapas de “downstream” do processo; a separação das células do caldo de cultivo, normalmente utilizando-se centrífugas.



Figura 4-3: Fotografia do caldo de cultivo permeado

Utilizando os dados obtidos para fluxo de permeado (Tabela 4-1), pôde-se determinar a área mínima de membrana a ser utilizada. Como nos cultivos com alta concentração celular é requerida uma alta vazão de permeado, em torno de $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; a área superficial mínima da membrana deverá ser de $0,17 \text{ m}^2$ para operar a uma velocidade de $5,31 \cdot 10^{-2} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, com uma pressão na entrada da membrana de 177 mmHg.

Cabe ressaltar que, apesar de ser possível aumentar o fluxo de permeado, fatores tais como uma maior concentração celular e o efeito da incrustação também têm que ser levados em consideração no dimensionamento do equipamento em questão e, por isso, um módulo de microfiltração com uma maior área superficial de membrana ($0,36 \text{ m}^2$) foi utilizado nos experimentos.

4.2. Experimentos em Batelada

4.2.1. Resultados dos Experimentos em Mesa Incubadora Rotativa; Avaliação da Influência de Sais no Meio de Cultivo na Produção de Ácido Clavulânico

Os gráficos das Figuras 4-4 a 4-7 ilustram os resultados obtidos durante a evolução do processo fermentativo.

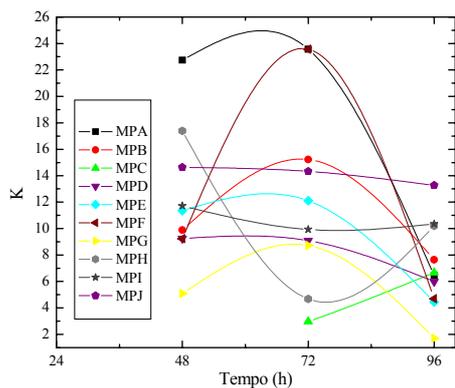


Figura 4-4: Perfil do Valor de K (índice de consistência de escoamento)

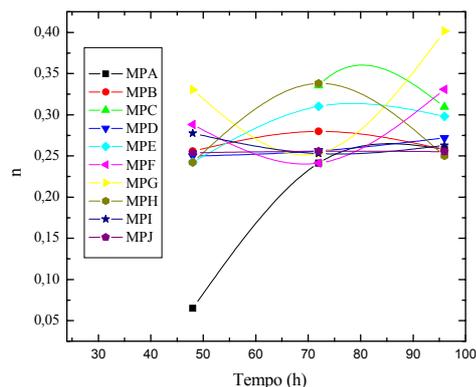


Figura 4-5: Perfil do Valor de n (índice de comportamento de escoamento)

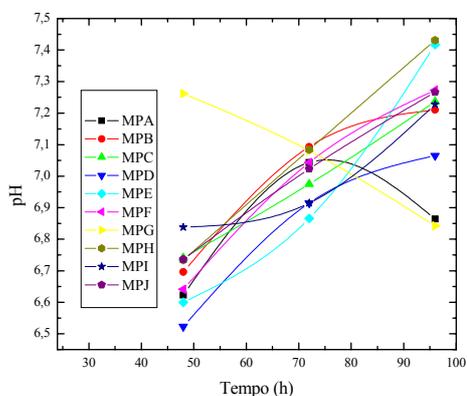


Figura 4-6: Perfis de pH dos experimentos

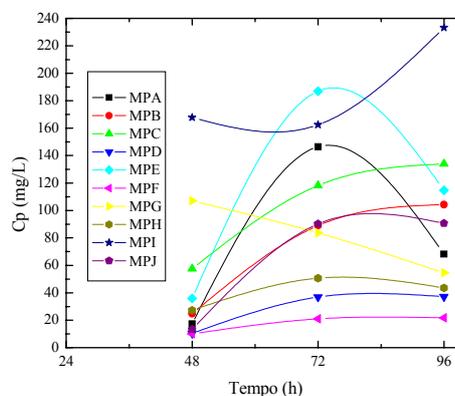


Figura 4-7: Produção de ácido clavulânico

Como se pode observar pelos gráficos das Figuras 4-4 e 4-5, os valores dos parâmetros reológicos indicam que uma maior concentração celular na etapa de produção foi obtida quando não houve adição de sais. Outro fato a ser observado é que

os perfis de pH obtidos são semelhantes o que significa que esta variável não influenciou na escolha do meio de cultura.

Apesar do meio MPI apresentar uma maior produção de ácido clavulânico, o meio MPE foi escolhido por apresentar maiores produção e produtividade em ácido clavulânico em 72 horas de cultivo tal como mostrado nas Figuras 4-7 e 4-8.

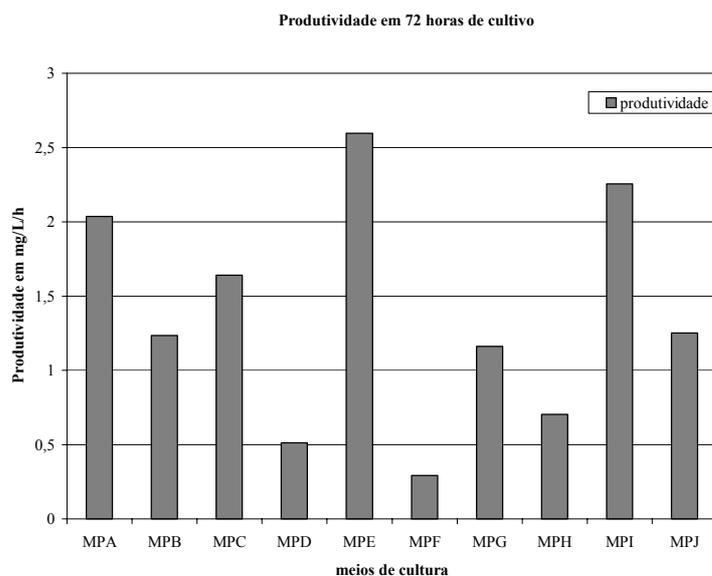


Figura 4-8: Produtividade dos meios de cultura após 72 horas de cultivo

4.2.2. Resultados dos Experimentos em Fermentador

A. Resultados dos Experimentos para a Determinação da Massa Celular

Foram realizados dois ensaios utilizando meios de culturas totalmente solúveis tal que possibilitasse determinação de concentração de microrganismo em massa seca de células.

Os resultados dos valores de concentração celular (C_x), de glicerol (C_g) e de ácido clavulânico (C_p) bem como dos parâmetros reológicos são visualizados pelos gráficos da Figura 4-10 (ensaio Fsoy10, meio MP6) e Figura 4-11 (ensaio Fsoy30, meio MP7). Os resultados da análise dos gases da saída obtidos no experimento Fsoy10 podem ser visualizados na Figura 4-9.

Os valores de concentrações celulares (C_x) obtidos no experimento Fsoy30 não foram bons e, por isso, um tratamento para correlacionar o valor da concentração celular com outros parâmetros não teria sentido. Neste caso foram tratados somente os valores experimentais do experimento Fsoy10.

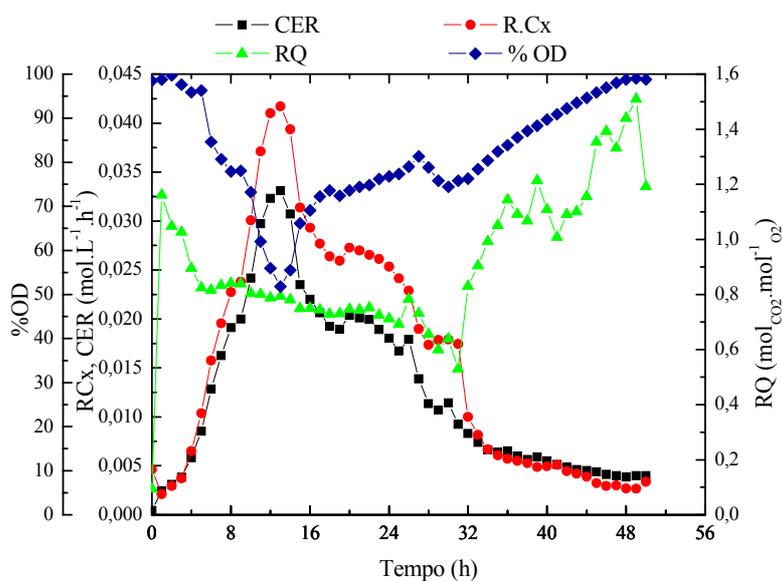


Figura 4-9: Variação das velocidades de respiração (RCx), velocidade de formação de CO₂ (CER), quociente respiratório (RQ) e porcentagem de oxigênio dissolvido (%OD) com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* no experimento Fsoy10 (meio MP6)

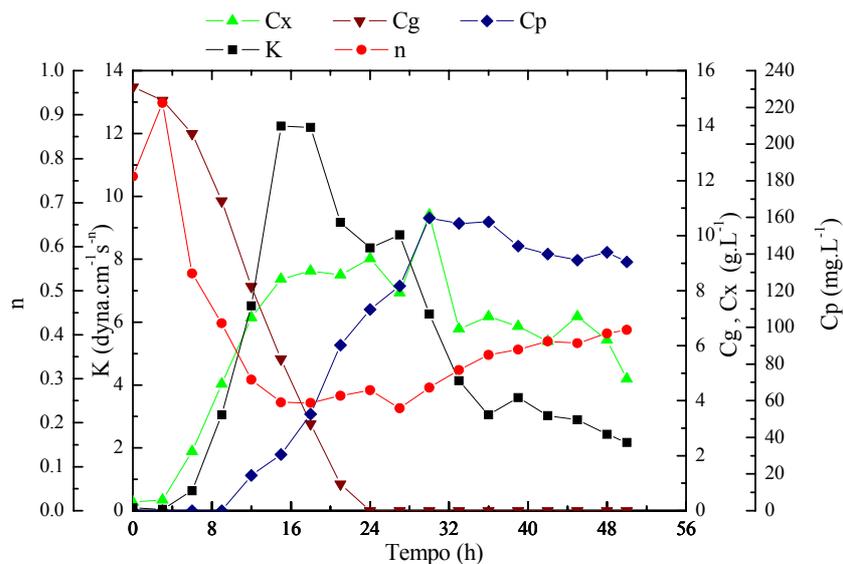


Figura 4-10: Variação dos parâmetros reológicos (K e n) e das concentrações de células (Cx), glicerol (Cg) e produto (Cp) com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* do experimento Fsoy10(meio MP6)

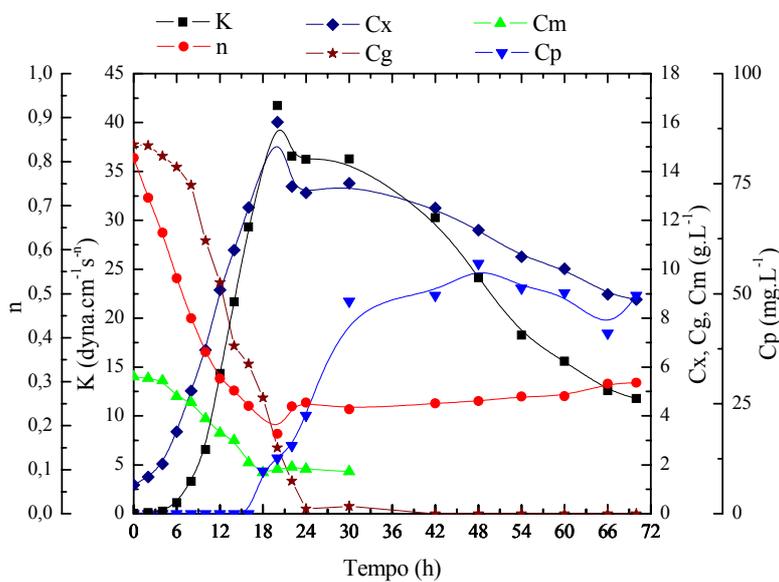


Figura 4-11: Variação dos parâmetros reológicos (K e n) e das concentrações de células (Cx), glicerol (Cg), maltose (Cm) e de produto Cp com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* do experimento Fsoy30 (meio MP7)

O valor de $Y_{x/s}$ calculado foi de $0,86 \frac{g_x}{g_G}$ (Fsoy10), obtido através de uma regressão linear, cujo o coeficiente de correlação foi de 0,991, tal como visualizado pelo gráfico da Figura 4-12.

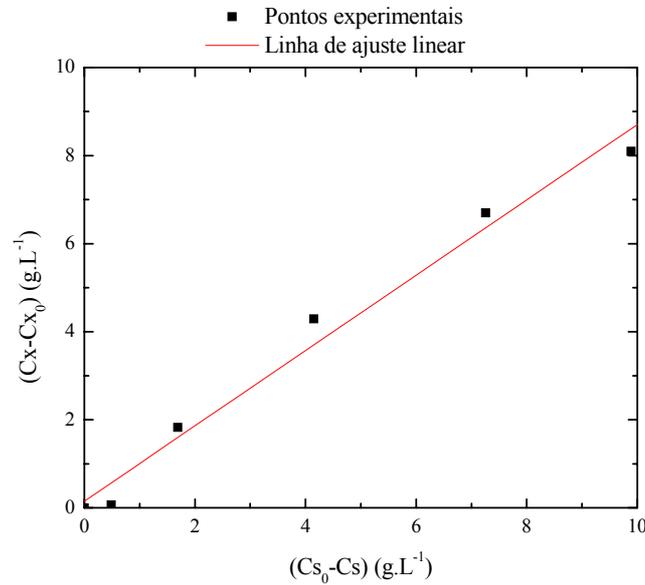


Figura 4-12: Regressão linear realizada para o cálculo de $Y_{x/s}$ utilizando os valores experimentais de concentração celular (Cx) e concentração de glicerol (Cg) do ensaio Fsoy10 (meio MP6)

Tal valor é alto quando comparado com o obtido por Baptista-Neto (2000), $Y_{x/s}=0,574 \frac{g_x}{g_G}$. Isso pode ser explicado pela presença de extrato de malte no meio, o que aumentaria a concentração celular significativamente, comparado com o meio utilizado por Baptista-Neto (2000), no qual não consta tal substrato.

Através do método de estimativa de parâmetro não-linear, tal como descrito no item 3.2.3, foi possível a determinação dos valores dos parâmetros a_1 , a_2 e a_3 da equação (3-2). Com isto obteve-se a expressão descrita pela equação (4-1) para estimativa da concentração celular (Cx).

$$Cx = 3,760.K^{0,333}.n^{-0,079} \quad (4.1)$$

O gráfico da Figura 4-13 mostra a comparação entre os valores simulados pelo modelo e os experimentais. Pode-se observar, pelo mesmo gráfico, que o modelo pode ser utilizado para inferir a concentração celular, apesar de apresentar um grande número de valores simulados com desvio superiores a 10% do valor experimental.

Tal como descrito por Baptista Neto (2000), o valor de $Y_{CO_2/CX}$ foi estimado somente para as 12 primeiras horas de cultivo, tal como pode ser visualizado no gráfico da Figura 4-14. O valor de $Y_{CO_2/CX}$ calculado foi de $1,1 \frac{g_{CO_2}}{g_X}$, calculado através de regressão linear de valores de quantidade dióxido de carbono com a concentração celular formadas e o coeficiente de correlação obtido foi de 0,987.

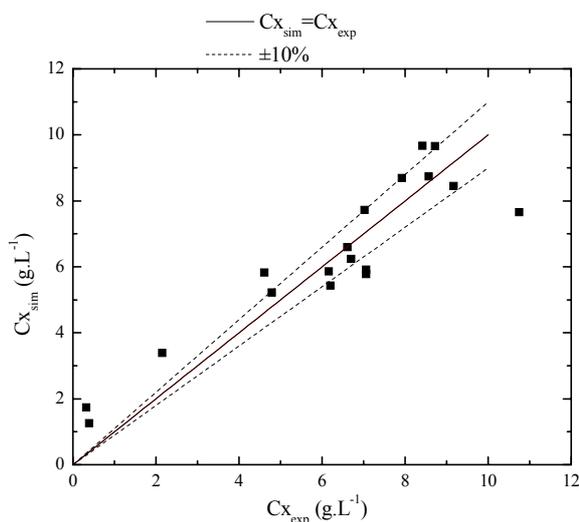


Figura 4-13: Comparação entre os valores experimentais de Cx e o simulado pela equação (4-1) para o ensaio Fsoy10 (meio MP6)

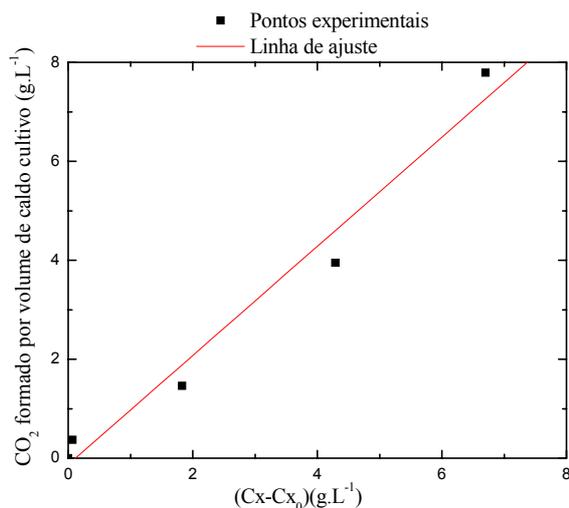


Figura 4-14: Regressão linear dos valores experimentais de C_x e formação de CO_2 do ensaio Fsoy10 (meio MP6) para o cálculo de $Y_{CO_2/CX}$

Com os resultados obtidos, estimativas dos valores das concentrações celulares puderam ser feitas com uma certa precisão. Estas estimativas foram importantes para estudar modelo cinético de crescimento e produção, utilizando meio complexo não totalmente solúvel, tanto neste processo específico como em outros trabalhos em andamento no DEQ-UFSCar.

B. Influência do pH na Produção de Ácido Clavulânico por *S. clavuligerus*

Os valores referentes às variáveis relacionadas à respiração e velocidade de formação de dióxido de carbono, bem como do oxigênio dissolvido, obtidos e utilizados para o balanço gasoso durante o ensaio F1 (meio MP1E) estão ilustrados na Figura 4-15.

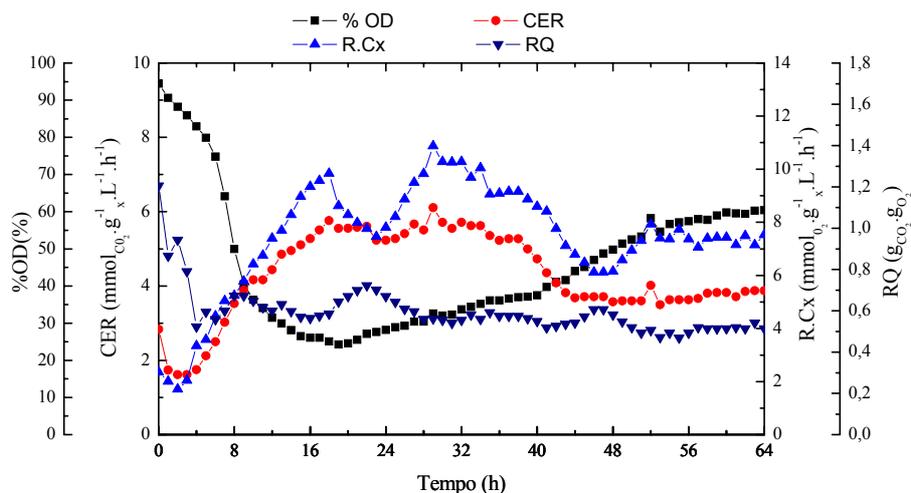


Figura 4-15: Variação das velocidades de respiração (RCx), velocidade de formação de CO₂ (CER), quociente respiratório (RQ) e porcentagem de oxigênio dissolvido (%OD) com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* no experimento F1 (meio MP1E), pH=6,2

Os valores obtidos dos parâmetros reológicos, concentração de glicerol e ácido clavulânico do ensaio F1 podem ser visualizados no gráfico da Figura 4-16.

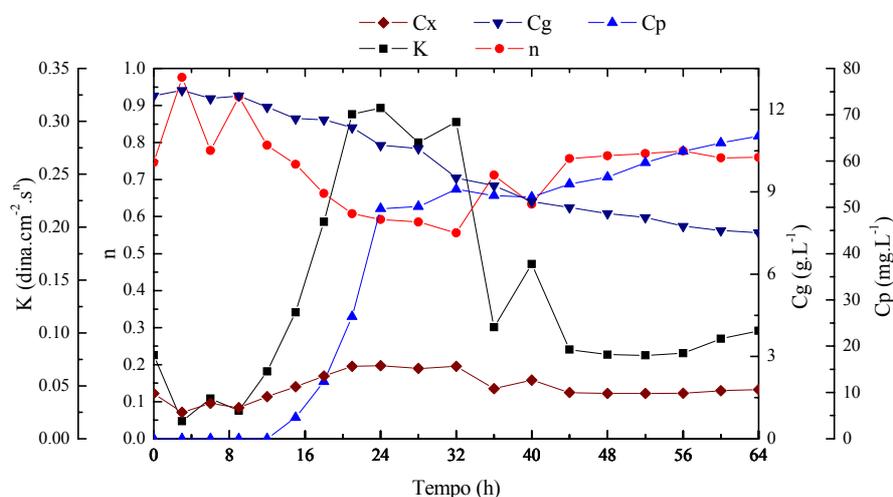


Figura 4-16: Variação dos parâmetros reológicos (K e n), concentrações celulares (Cx), de glicerol (Cg) e produto (Cp) com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* no experimento F1 (meio MP1E), pH = 6,2

Para o ensaio F2 (meio MP1E), a variação com o tempo dos parâmetros reológicos (K, n), concentração de substrato (C_g) e de produto (C_p) estão descritos no gráfico da Figura 4-17.

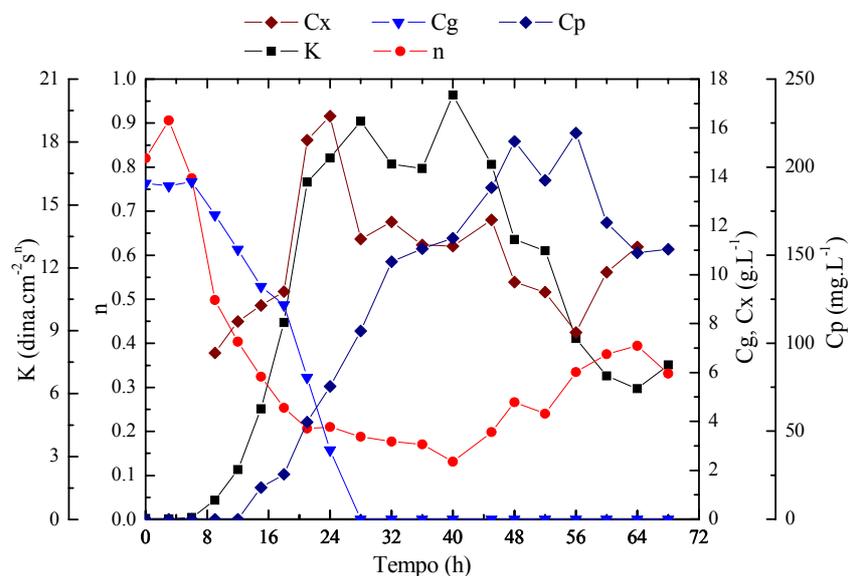


Figura 4-17: Variação dos parâmetros reológicos (n e K), das concentrações celulares (C_x), de glicerol (C_g) e produto (C_p) com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* no experimento F2 (meio MP1E), pH = 6,8.

Os valores referentes às variáveis utilizadas no balanço gasoso do experimento F3 (meio MP1E) podem ser visualizados no gráfico da Figura 4-18 e os valores obtidos dos parâmetros reológicos, concentração de celular, de glicerol e de ácido clavulânico do ensaio F3 podem ser visualizados no gráfico da Figura 4-19.

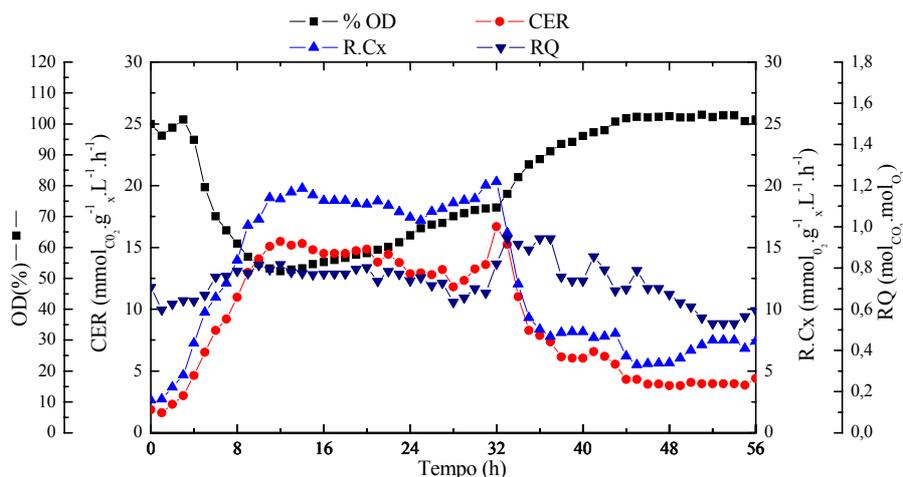


Figura 4-18: Variação das velocidades de respiração (RCx), velocidade de formação de CO₂ (CER), quociente respiratório (RQ) e porcentagem de oxigênio dissolvido (%OD) com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* no experimento F3 (meio MP1E), pH=7,4

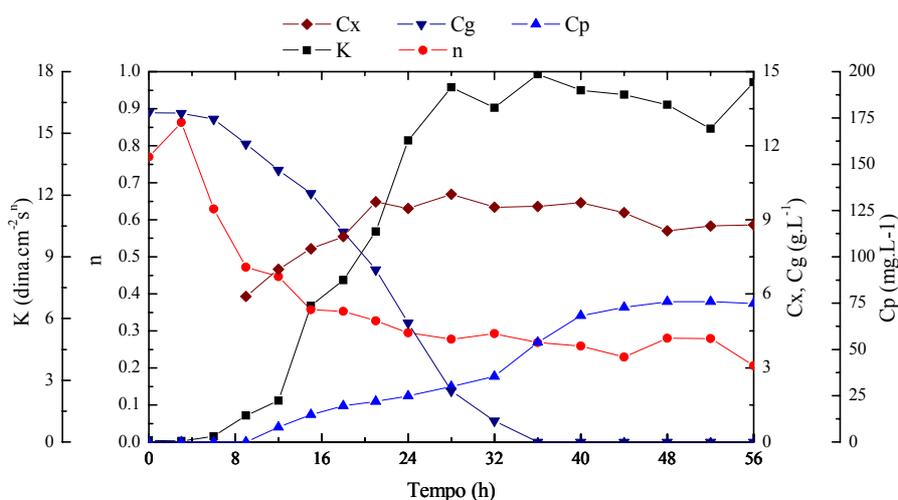


Figura 4-19: Variação dos parâmetros reológicos (K e n) e das concentrações de células (Cx), glicerol (Cg) e produto (Cp) com o tempo de cultivo de *S. clavuligerus* no experimento F3 (meio MP1E), pH = 7,4

Os gráficos das Figuras 4-15 e 4-16 mostram o péssimo crescimento celular do microrganismo quando o pH foi controlado em 6,2, em contraste com um bom crescimento obtido nos outros dois valores (6,8 e 7,4). Tal como encontrado em literatura, os actinomicetos são microrganismos que crescem bem quando se encontram

em ambientes neutros a alcalinos e não apresentam bom crescimento em levementes ácidos.

Quanto à produção de ácido clavulânico, a maior concentração foi obtida quando se controlou o pH em 6,8. A Tabela 4-2 mostra valores da maior concentração celular ($C_{X_{max}}$), velocidade máxima de crescimento celular (μ_{max}), concentração máxima de ácido clavulânico ($C_{p_{max}}$), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}), produtividade específica (Pe_{ac}) e velocidade global máxima de produção de ácido clavulânico ($V_{ac_{max}}$).

Tabela 4-2: Valores de $C_{X_{Max}}$, μ_{max} , $C_{p_{max}}$, P_{ac} , Pe_{ac} e $V_{ac_{max}}$ dos experimento F1 (pH=6,2), F2 (pH=6,8) e F3 (pH=7,4)

| Parâmetro | F1 | F2 | F3 |
|--|--------|--------|--------|
| $C_{X_{max}}$ (g.L ⁻¹) | 1,59 | 10,4 | 10,6 |
| $\mu_{máx}$ (h ⁻¹) | 0,0768 | 0,1622 | 0,1574 |
| $C_{p_{max}}$ (mg.L ⁻¹) | 64 | 219 | 75 |
| P_{ac} (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹) | 2,07 | 4,47 | 1,70 |
| Pe_{ac} (mg.g ⁻¹ .h ⁻¹) | 3,91 | 0,86 | 0,63 |
| $V_{ac_{máx}}$ (mg.L ⁻¹ h ⁻¹) | 6,23 | 8,84 | 4,09 |

Observado-se os valores da Tabela 4-2, a maior produtividade específica em ácido clavulânico ocorreu quando o pH foi controlado em 6,2. Tal fato pode estar ligado à velocidade de degradação do ácido clavulânico que é minimizada em valores de pH próximos a 6,2, tal como descrito por Bersanetti *et al.* (2000) e Almeida *et al.*(2002).

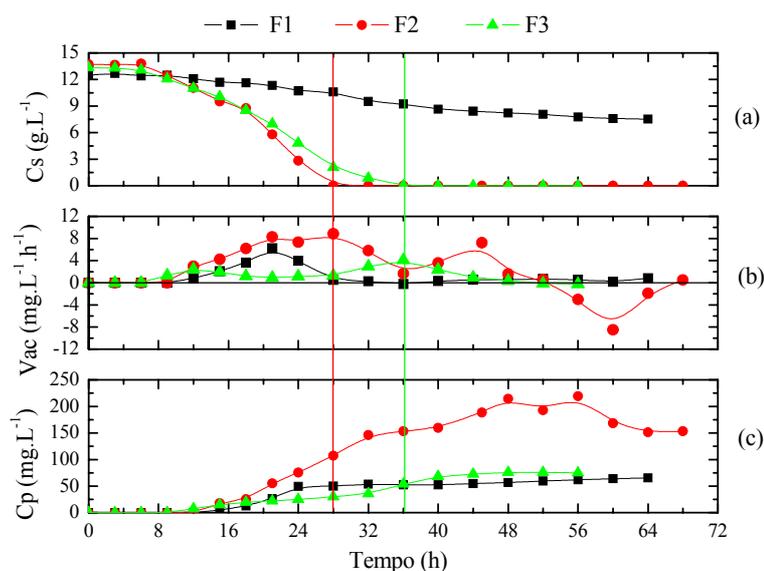


Figura 4-20: Valores da concentração de glicerol (a), velocidade de produção (b) e da concentração de produto (c) dos experimentos F1, F2 e F3 no decorrer do tempo de cultivo

Tal como pode ser observado nos gráficos da Figura 4-20, a produção de ácido clavulânico foi afetada pela exaustão do glicerol nos experimentos F2 e F3. Quanto ao experimento F1, não houve a exaustão de glicerol, mas a produção de ácido clavulânico foi afetada após 24 horas de cultivo.

No experimento F2, a velocidade de produção diminuiu após o término do glicerol (28 h de cultivo), embora tenha continuado a ser produzido por mais 20 horas. Quanto ao experimento F3, também se observou uma alteração na velocidade de produção, sendo nula após 12 horas da exaustão do glicerol. Tal constatação pode ser devido à formação de algum fator no caldo de cultivo que possa estar influenciando a velocidade de formação de produto bem como a exaustão de algum nutriente relacionado à formação de ácido clavulânico. O resultado também sugere que o microrganismo está consumindo mais lentamente outras fontes de carbono e energia (aminoácidos e peptídeos oriundos do Samprosoy 90NB) resultando na produção de piruvato, um dos precursores do ácido clavulânico.

Com os resultados obtidos no estudo da influência do pH na produção de ácido clavulânico, sugere-se uma estratégia de controle de pH em cultivos em batelada e batelada alimentada, no qual se inicia o processo controlando o seu valor em 6,8 até o final da etapa de crescimento celular (primeiras 24 horas), e depois em 6,2 para diminuir a velocidade de degradação do produto durante a sua etapa de produção. Tal sugestão também é baseada no trabalho realizado por Lee et al. (2002) no qual descreve um aumento na produção de ácido clavulânico quando esta estratégia é utilizada.

Com isso, pode-se concluir que o melhor valor de pH para produzir ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* é de 6,8.

C. Resultado do Estudo sobre a Composição do Meio de Cultura

Os valores da concentração de substratos e de ácido clavulânico bem como valores dos parâmetros reológicos dos experimentos FS301 (meio MP3), FS302 (meio MP4), FS202 (meio MP5) e FS102 (meio MP2) são visualizados nos gráficos das Figuras 4-21, 4-22, 4-23 e 4-24, respectivamente. Cabe ressaltar que os valores de concentração celular foram calculados através da equação 4-1.

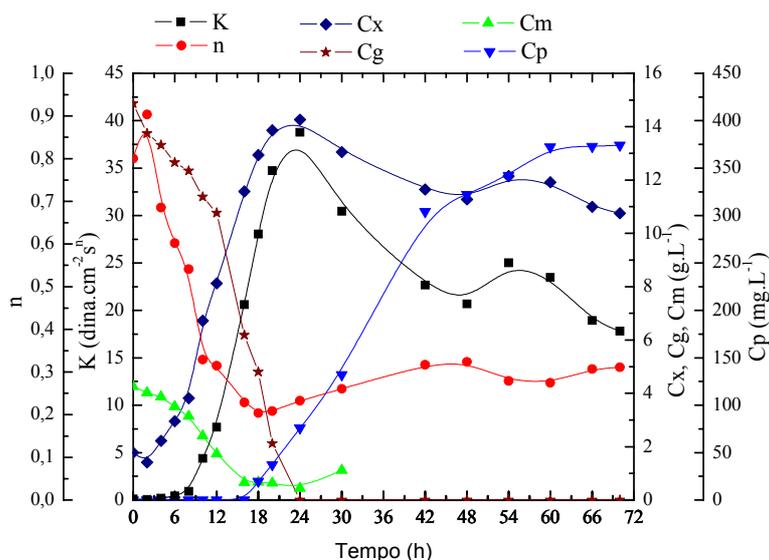


Figura 4-21: Variação dos parâmetros reológicos, concentração celular (Cx), concentração de glicerol (Cg), concentração de maltose (Cm) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com o tempo no cultivo de *S. clavuligerus* do experimento FS301 (meio MP3)

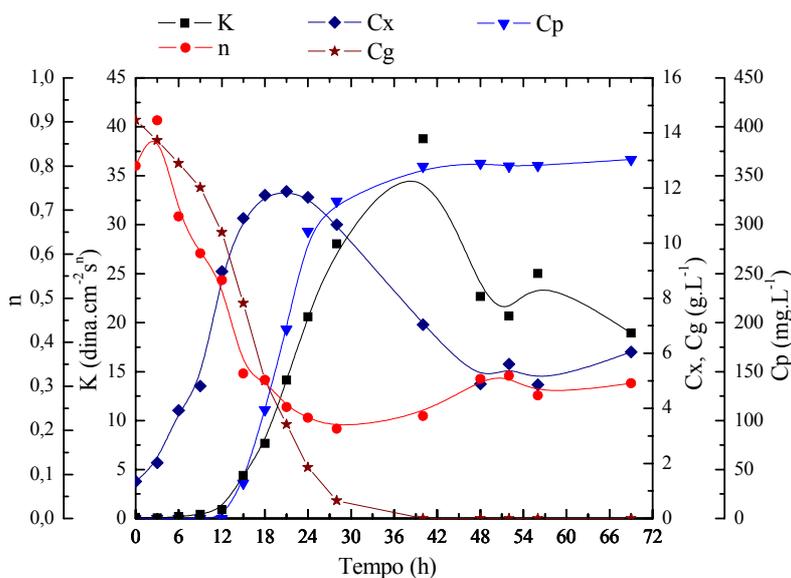


Figura 4-22: Variação dos parâmetros reológicos, concentração celular (Cx), concentração de glicerol (Cg) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com o tempo no cultivo de *S. clavuligerus* do experimento FS302 (meio MP4)

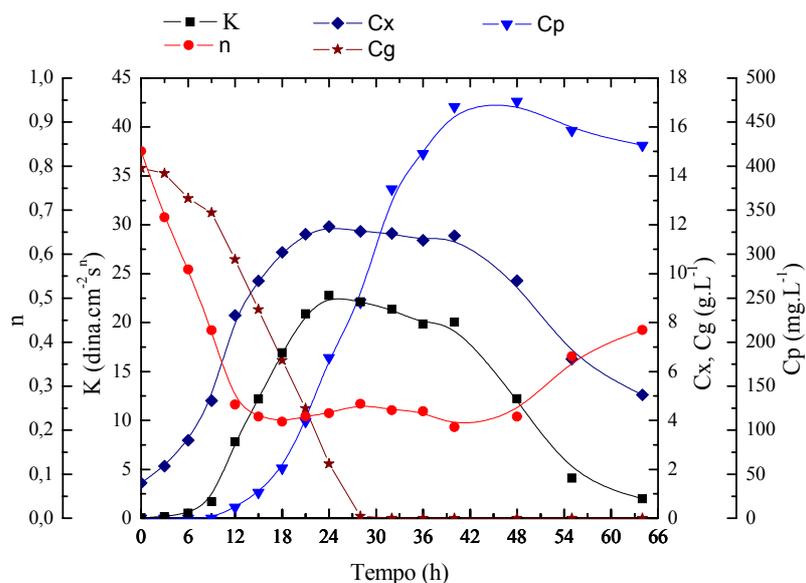


Figura 4-23: Variação dos parâmetros reológicos, concentração celular (Cx), concentração de glicerol (Cg) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com o tempo no cultivo de *S. clavuligerus* do experimento FS202 (meio MP5)

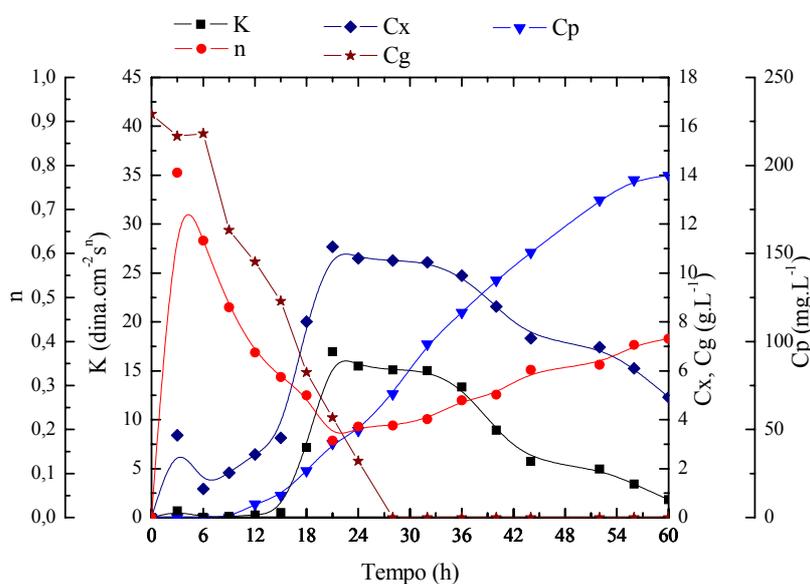


Figura 4-24: Variação dos parâmetros reológicos, concentração de células (Cx), concentração de glicerol (Cg) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com o tempo no cultivo de *S. clavuligerus* do experimento FS102 (meio MP2)

Pelos valores da Tabela 4-3, observa-se que a concentração de nitrogênio aparentemente não afetou significativamente na velocidade específica máxima de

crescimento celular. Também se observou que o meio contendo extrato de malte em sua composição (composição do meio MP3 do experimento FS301) apresentou um valor da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) ligeiramente maior daquele meio que não continha esse nutriente em sua composição (composição do meio MP4 do experimento FS302). Tal fato pode ser devido ao consumo simultâneo do glicerol e da maltose presente no extrato de malte, fato que pode ser observado nos cultivos FS301 (Figura 4-21) e FS302 (Figura 4-22).

Tabela 4-3: Valores de $C_{X_{\max}}$, μ_{\max} , $C_{p_{\max}}$, P_{ac} , Pe_{ac} e Vac_{\max} dos experimento FS301 (meio MP3) , FS302 (meio MP4) , F202 (meio MP5) e FS102 (meio MP2)

| Parâmetro | FS301 | FS302 | F202 | FS102 | | | | |
|-------------------------------------|-------|-------|--|-------------------------------------|-------|-------|-------|------|
| $C_{X_{\max}}$ ($g.L^{-1}$) | 14,6 | 11,88 | 11,92 | 10,61 | | | | |
| μ_{\max} (h^{-1}) | 0,176 | 0,156 | 0,144 | 0,151 | | | | |
| $C_{p_{\max}}$ ($mg.L^{-1}$) | 373 | 363 | 474 | 194 | | | | |
| P_{ac} ($mg.L^{-1}.h^{-1}$) | 7,24 | 12,25 | 11,69 | 3,47 | | | | |
| Pe_{ac} ($mg.g^{-1}.h^{-1}$) | 2,19 | 2,56 | 2,04 </tr <tr> <td>Vac_{\max} ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)</td> <td>28,38</td> <td>30,38</td> <td>23,94</td> <td>6,13</td> </tr> | Vac_{\max} ($mg.L^{-1}.h^{-1}$) | 28,38 | 30,38 | 23,94 | 6,13 |
| Vac_{\max} ($mg.L^{-1}.h^{-1}$) | 28,38 | 30,38 | 23,94 | 6,13 | | | | |

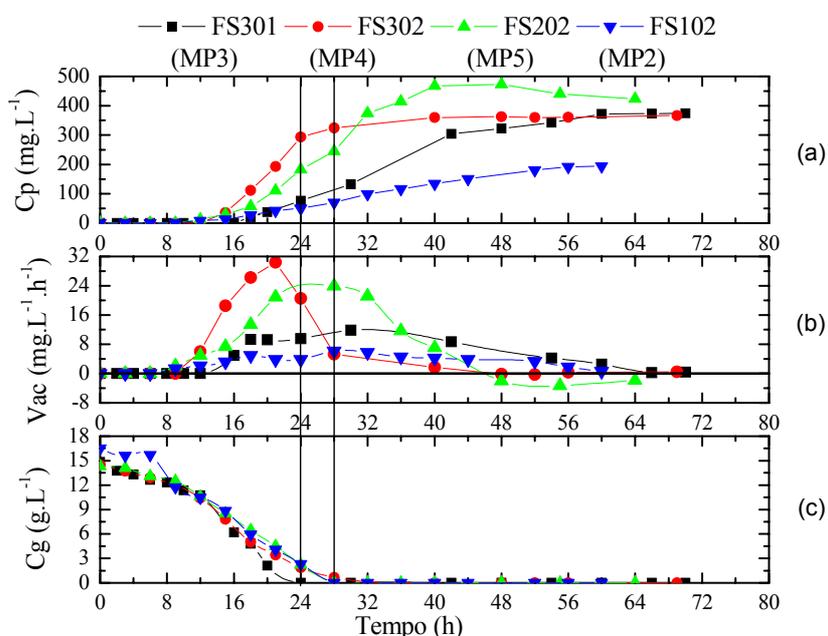


Figura 4-25: Valores de (a) concentração de ácido clavulânico, (b) velocidade global de produção e (c) concentração de glicerol dos experimentos FS301 (MP3), FS302 (MP4), FS202 (MP5) e FS102 (MP2) no decorrer do cultivo

Quanto à concentração de células, o meio contendo extrato de malte (MP3 do ensaio FS301) apresentou um valor superior aos outros experimentos devido, também, ao consumo dos nutrientes presentes no extrato de malte. Pelos resultados dos experimentos FS302, FS202 e FS102, não se observou grandes diferenças na concentração celular indicando que, dentro dos valores estudados, a quantidade de fonte de nitrogênio não afetou significativamente a quantidade de biomassa formada.

Quanto à produção de ácido clavulânico, observa-se pelos valores da Tabela 4-3, que a maior concentração de produto foi obtido no ensaio FS202 e a maior produtividade ocorreu no experimento FS302. Tal como pode ser analisado nos gráficos da Figura 4-25, a velocidade global de produção de ácido clavulânico foi maior no experimento FS302 mas por um período de tempo mais curto. Comportamento oposto é observado no ensaio FS102 em que a velocidade global de produção foi a mais baixa porém durante um período maior de tempo. Observando o mesmo gráfico, a velocidade global de produção do experimento FS202 se mantém em patamares menores, mas por maior período de tempo quando comparado com o ensaio FS302.

Tais fatos indicam que o aumento na quantidade de nitrogênio presente no meio de cultura aumenta tanto a velocidade de produção de ácido clavulânico bem como a velocidade de formação de alguns metabólitos, não determinados, que possam influenciar negativamente na formação do produto em questão.

Existem trabalhos em literatura que relatam sobre a influência da concentração de amônia na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Fang e Demain (1995) descrevem a inibição por íons amônio na produção de ácido clavulânico quando ocorre controle da %OD. Sendo a amônia um dos produtos resultantes do consumo de aminoácidos como fonte de carbono e energia por microrganismos, tal composto pode estar relacionado na diminuição da velocidade global de produção de

ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Cabe salientar que, de acordo com Roubos *et al.* (2001), a velocidade de degradação de ácido clavulânico aumenta com o aumento da concentração de amônia no caldo de cultivo, o que diminui a velocidade global de produção de ácido clavulânico.

Quanto à produção no experimento FS301, apesar de apresentar um período maior quando comparado ao experimento FS302, a concentração máxima de ácido clavulânico foi menor devido à menor velocidade global de produção (gráficos da Figura 4-25). O maior tempo de produção observado no experimento FS301 sugere que o extrato de malte exerce efeitos de inibição e/ou repressão de produtos oriundos do metabolismo do microrganismo que podem influenciar negativamente a produção de ácido clavulânico.

Também constata-se, pelos gráficos da Figura 4-25, que a produção de ácido clavulânico no cultivo FS301 atrasou comparativamente a outros cultivos. Observando o gráfico da Figura 4-21, nota-se que a produção de ácido clavulânico somente se iniciou quando não houve variação significativa da concentração de maltose. Tal fato indica um efeito de repressão da maltose na produção de ácido clavulânico.

Experimento realizado por Rosa (2002), nas mesmas condições de agitação e aeração, apresentou uma concentração máxima de produto de 505 mg.L^{-1} , o maior valor obtido quando comparado com os valores obtidos nos ensaios aqui descritos. Porém, cabe ressaltar que este valor não é muito superior ao obtido para o ensaio FS202 que foi de 473 mg.L^{-1} .

Comparando também outros parâmetros importantes tais como a produtividade e a produtividade específica, os valores máximos do experimento FS202 foram $11,68 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $2,04 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_X^{-1}$, superiores ao obtido por Rosa (2002), que obteve para os mesmos parâmetros, $10,41 \text{ mg.h}^{-1}$ e $0,88 \text{ mg.h}^{-1}.\text{g}_X^{-1}$, respectivamente.

Considerando os valores apresentados de produtividade e produtividade específica, pode-se concluir que o meio de cultura mais adequado para se trabalhar é o MP5 (experimento FS202), com 20 g.L^{-1} de Samprosoy e sem a adição de extrato de malte.

Diante dos resultados obtidos, o meio MP5 foi utilizado na maioria dos experimentos contínuos sem reciclo celular e em todos os experimentos contínuos com reciclo celular.

D. Resultados dos Experimentos para Verificação da Estabilidade Celular

Os resultados experimentais do ensaio realizado para verificar a estabilidade do segundo lote de microrganismo, logo após a sua preparação e armazenagem em criotubos, são apresentados no gráfico da Figura 4-26 (T1). Após cerca de 6 meses de sua preparação, foi realizado um outro experimento nas mesmas condições e obteve-se o perfil de ácido clavulânico mostrado no gráfico da Figura 4-27 (T2).

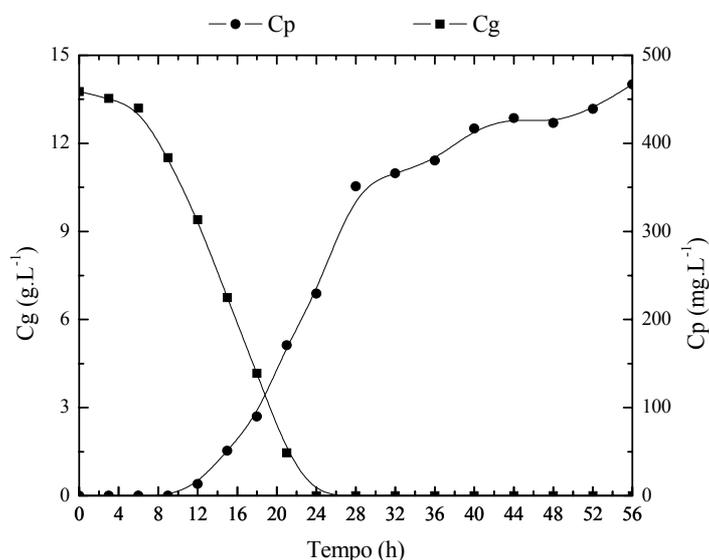


Figura 4-26: Perfis de concentração de glicerol (Cg) e de ácido clavulânico (Cp) com o tempo de cultivo para testar o produtividade do segundo lote de microrganismos logo após sua confecção (T1)

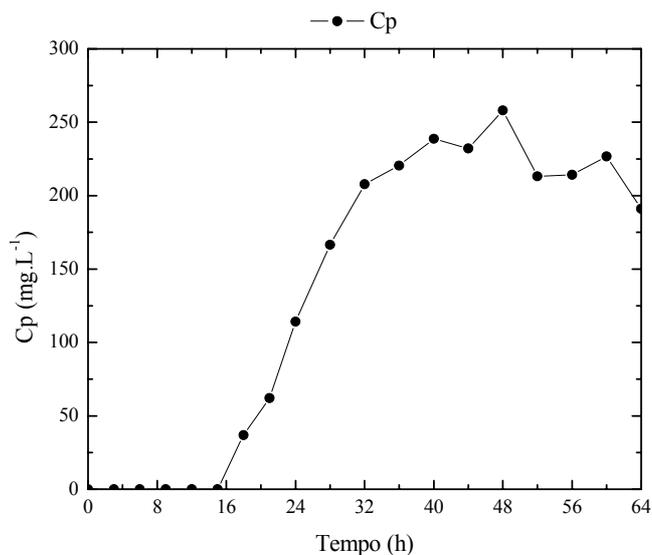


Figura 4-27: Perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp) com o tempo de cultivo para testar o produtividade do segundo lote de microrganismos após 6 meses da sua confecção (T2)

Observa-se através dos gráficos das Figuras 4-26 e 4-27, que o valor de produtividade máxima do segundo lote de microrganismos caiu de $12,54 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para $6,49 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Devido a isso, foi preparado um terceiro lote de criotubos. O resultado do experimento em batelada para o teste da produtividade do terceiro lote de microrganismos são apresentados no gráfico da Figura 4-28 (T3).

O experimento realizado com o terceiro lote de microrganismos, logo após a sua confecção, mostrou uma produtividade menor que a obtida com o segundo lote. Porém, se compararmos os experimentos padrões dos três lotes de microrganismos pode-se observar que a velocidade de produção é praticamente igual para os três lotes testados. Tal fato é observado no gráfico da Figura 4-29. Cabe ressaltar que o experimento padrão do primeiro lote de microrganismos é o experimento FS202, apresentado no estudo sobre a composição do meio de cultivo. Apesar da produtividade do segundo lote de microrganismos ter sido um pouco superior aos outros dois, $11,7$ e $10,7 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para o primeiro e o terceiro lote de microrganismos respectivamente, a velocidade de

produção foi praticamente a mesma e por isso fatores relativos à diferença de produção entre os lotes de microrganismos não foram levados em consideração.

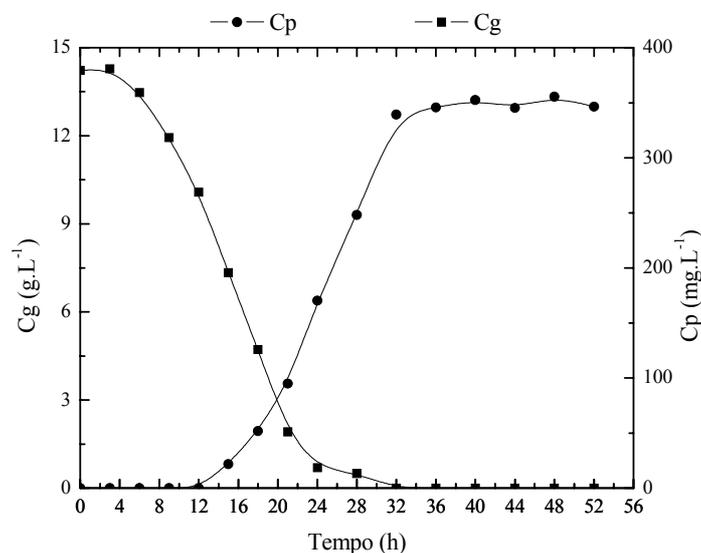


Figura 4-28: Perfis de concentração de glicerol (Cg) e de ácido clavulânico (Cp) com o tempo de cultivo para testar o produtividade do terceiro lote de microrganismos logo após sua confecção (T3)

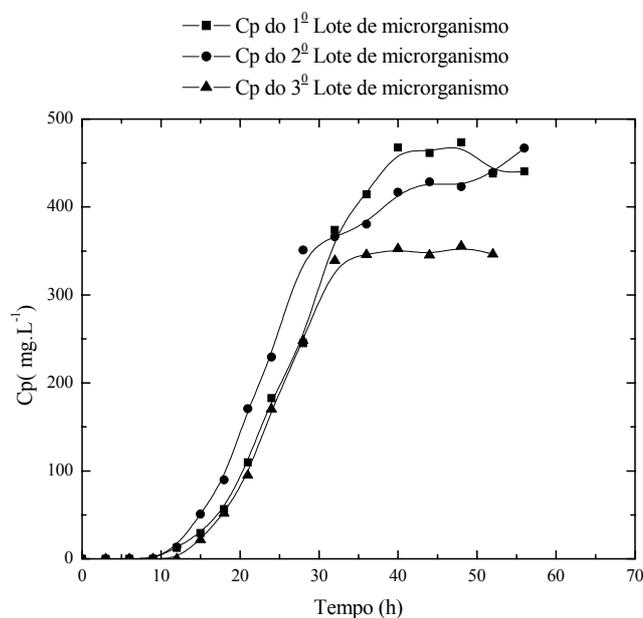


Figura 4-29: Comparação dos perfis de concentração de ácido clavulânico (Cp) dos três lotes de microrganismos (FS202, T1 e T3)

E. Estudo da Inibição ou Repressão do Glicerol na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*

Para verificar a ocorrência de possíveis efeitos de repressão e/ou inibição do glicerol na produção de ácido clavulânico, foi realizado um experimento em batelada no qual, praticamente ao final do consumo de glicerol, adicionou-se cerca de 80 g de glicerol em um reator contendo 4 L de caldo de cultivo, perfazendo uma concentração de cerca de 20 g.L^{-1} , para verificar essa hipótese. Os resultados do experimento P1 são apresentados no gráfico da Figura 4-30.

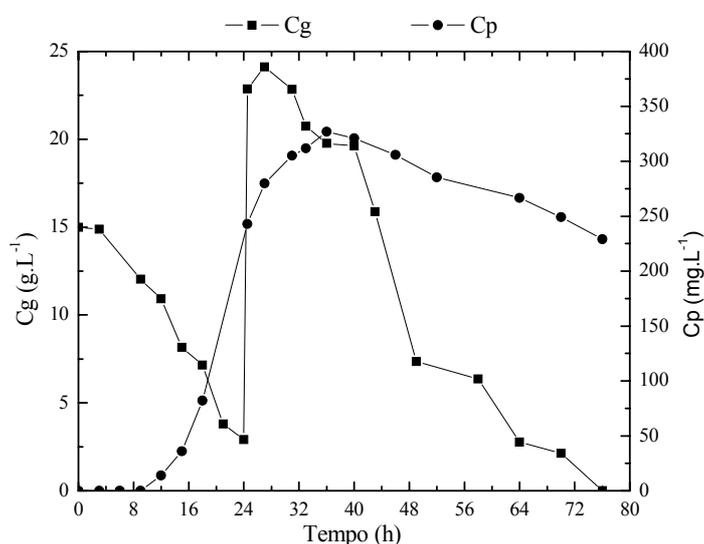


Figura 4-30: Perfil de concentração de glicerol (Cg) e de ácido clavulânico (Cp) durante o experimento P1

O gráfico da Figura 4-31 mostra os perfis de concentração de ácido clavulânico dos experimentos P1 e T3 e o gráfico da Figura 4-32 mostra a variação da velocidade de produção de ácido clavulânico com o tempo de cultivo.

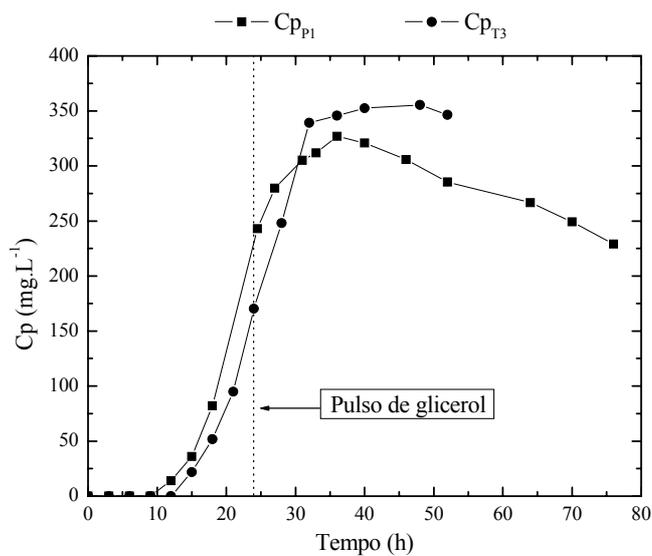


Figura 4-31: Comparação entre os perfis de concentração de ácido clavulânico (C_p) com o tempo de cultivo nos experimentos P1 e T3

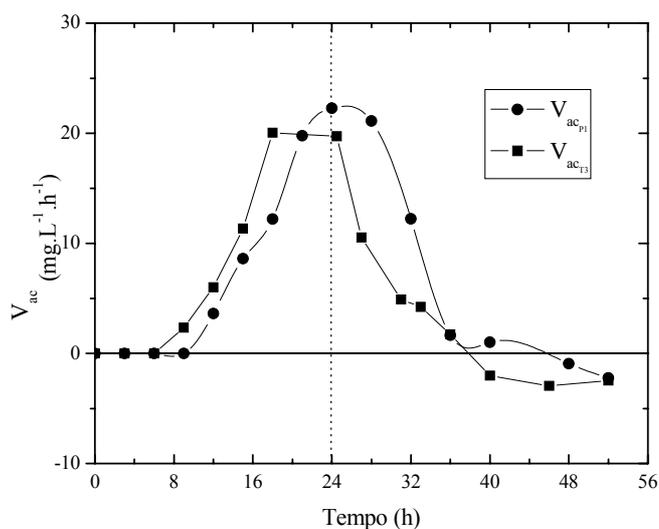


Figura 4-32: Variação da velocidade de produção de ácido clavulânico (V_{ac}) com o tempo de cultivo nos experimentos P1 e T3

Pode-se observar pelo gráfico da Figura 4-32 que, apesar de se constatar uma diminuição na velocidade de produção de ácido clavulânico após a adição de glicerol, não foi possível determinar um efeito de inibição pelo substrato (experimento P1).

Observando o gráfico da Figura 4-31, a concentração máxima de ácido clavulânico foi pouco menor para o experimento P1 o que impossibilita verificar se esta variável também foi influenciada pelo pulso de glicerol.

A não detecção da produção de ácido clavulânico quando a concentração de glicerol voltou a um patamar mais baixo (menor que 10 g.L^{-1}) deve-se a produtos oriundos do metabolismo do microrganismo e/ou a exaustão de outros nutrientes necessários para a sua produção.

Com tudo isso, não foi possível determinar se houve um efeito de inibição pelo glicerol na produção de ácido clavulânico.

4.3. Experimentos Contínuos

Os resultados dos experimentos contínuos com e sem reciclo celular serão apresentados no estado estacionário.

A. Experimentos Contínuos sem Reciclo de Células.

Experimento C1

O gráfico da Figura 4-33 mostra os valores de respiração celular (R.Cx) e do quociente respiração RQ em função da taxa de diluição (D). No gráfico da Figura 4-34 são visualizados os valores obtidos por análise das amostras.

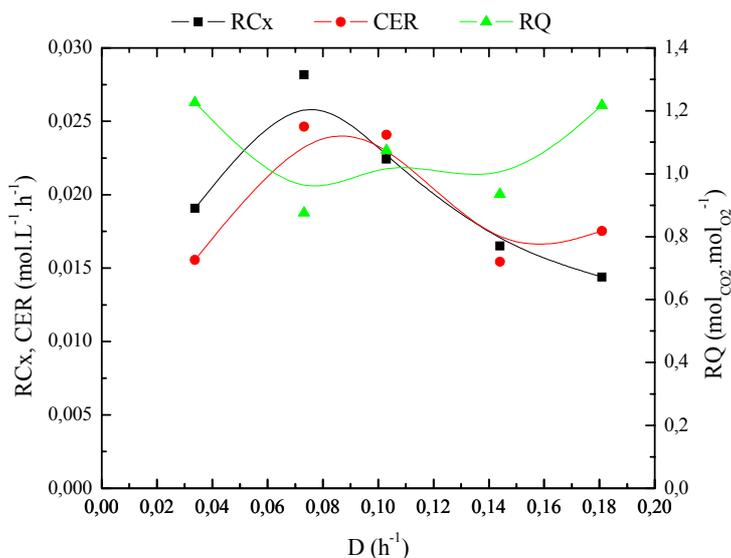


Figura 4-33: Variação das velocidades de respiração (RCx), velocidade de formação de CO₂ (CER) e quociente respiratório (RQ) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C1 (MP1)

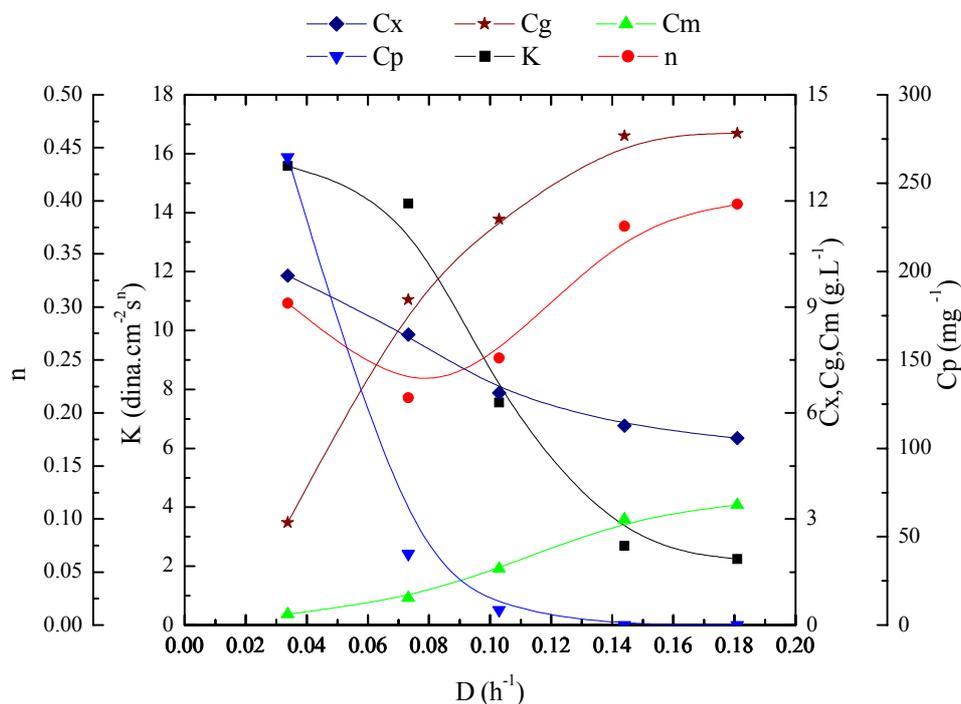


Figura 4-34: Variação dos parâmetros reológicos (K e n), concentração celular (Cx), concentração de glicerol (Cg), concentração de maltose (Cm) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C1 (MP1)

A velocidade de respiração calculada no experimento C1 (MP1) permaneceu na faixa de 0,012 a 0,030 mol.L⁻¹.h⁻¹, dependendo da taxa de diluição (D) na qual foi operado o reator (Figura 4-33). Tais valores são da mesma ordem de grandeza que os encontrados em experimentos em batelada realizados por Baptista-Neto (2000), que foi até 0,070 mol.L⁻¹.h⁻¹ para a velocidade de respiração.

Quanto à velocidade de formação de dióxido de carbono, os valores encontrados nesse experimento permaneceram na faixa de 0,015 a 0,025 mol.L⁻¹.h⁻¹.

Os valores de RQ permaneceram entre 0,9 a 1,2 mol_{CO2}.mol_{O2}⁻¹ (Figura 4-33). Tais valores são próximos aos encontrado por Royce e Thornhill (1992), 0,90 mol_{CO2}.mol_{O2}⁻¹, mas significativamente superiores quando comparados com os valores encontrados por Baptista-Neto (2000), que foram em média iguais a 0,76 mol_{CO2}.mol_{O2}⁻¹.

Quanto ao consumo de substrato, pode-se observar claramente pelo gráfico da Figura 4-34, que houve o consumo de maltose simultaneamente ao consumo de glicerol. Também pode ser observada uma concentração residual de glicerol de 2,9 g.L⁻¹ quando o reator foi operado na menor taxa de diluição (0,034 h⁻¹).

Em relação à concentração celular, o maior valor obtido foi de 10 g.L⁻¹ quando se operou o reator na menor taxa de diluição (maior tempo de residência). Cabe ressaltar que os valores de concentração celular, quando se operou o reator a uma taxa de diluição entre 0,144 e 0,181, foram aferidos através da equação 4.1.

Tabela 4-4: Valores das concentrações de células (Cx), de glicerol (Cg), de maltose (Cm) e de ácido clavulânico (Cp), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica do microrganismo (P_{eac}) obtidas nas cinco taxas de diluição do cultivo C1 (meio MP1).

| D (h ⁻¹) | C _x (g.L ⁻¹) | C _g (g.L ⁻¹) | C _m (g.L ⁻¹) | C _p (g.L ⁻¹) | P _{ac} (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹) | P _{eac} (mg.g _x ⁻¹ .h ⁻¹) |
|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|--|
| 0,034 | 9,88 | 2,90 | 0,31 | 264 | 8,93 | 0,904 |
| 0,073 | 8,22 | 9,20 | 0,77 | 40 | 2,94 | 0,358 |
| 0,103 | 6,57 | 11,48 | 1,59 | 9 | 0,89 | 0,135 |
| 0,144 | 5,64* | 13,84 | 2,99 | 0 | 0 | 0 |
| 0,181 | 5,29* | 13,92 | 3,40 | 0 | 0 | 0 |

*: determinados pela equação 4.1

Quanto à concentração de ácido clavulânico, o maior valor de concentração de ácido clavulânico (264 mg.L⁻¹) foi obtido quando se operou o reator na mais baixa taxa de diluição (0,034 h⁻¹). Observa-se pela Tabela 4-4, que a produtividade em ácido clavulânico bem como a produtividade específica do microrganismo apresentaram uma diminuição significativa com o aumento da taxa de diluição. Tal fato indica um efeito inibidor de algum nutriente presente no meio de alimentação, possivelmente de algum nutriente presente no extrato de malte.

Um experimento em batelada para a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, como mesmo meio de cultivo utilizando no experimento C1 (MP1), foi realizado por Rosa (2002). Nesse experimento obteve-se uma produtividade específica de 0,88 mg.g_x⁻¹.h⁻¹, ligeiramente inferior à obtida neste experimento (C1). Nesse trabalho, o mesmo autor obteve uma produtividade em ácido clavulânico de 10,41 mg.L⁻¹.h⁻¹ que é maior que a obtida no experimento C1 (8,93 mg.L⁻¹.h⁻¹).

Experimento C2

O gráfico da Figura 4-35 mostra os valores de velocidade global de respiração celular (R.Cx) e do quociente respiratório (RQ). No gráfico da Figura 4-36 são visualizados os valores obtidos por análise das amostras.

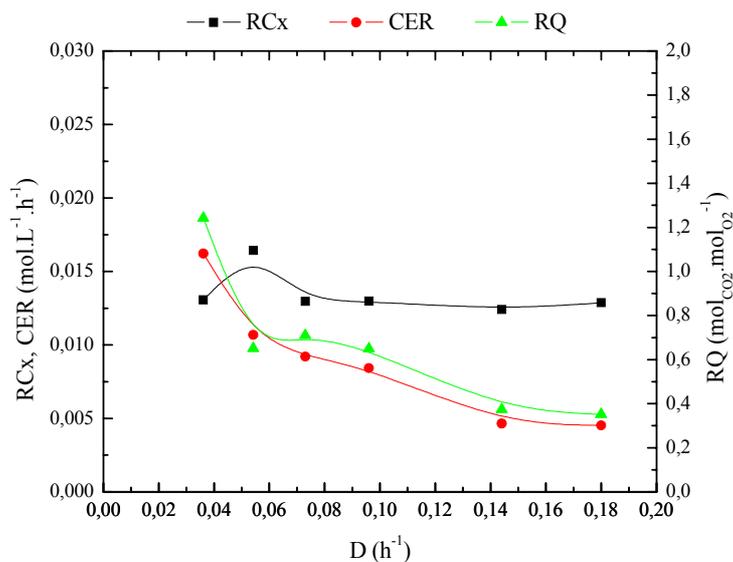


Figura 4-35: Variação das velocidades de respiração (RCx), velocidade de formação de CO₂ (CER) e quociente respiratório (RQ) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C2 (MP2)

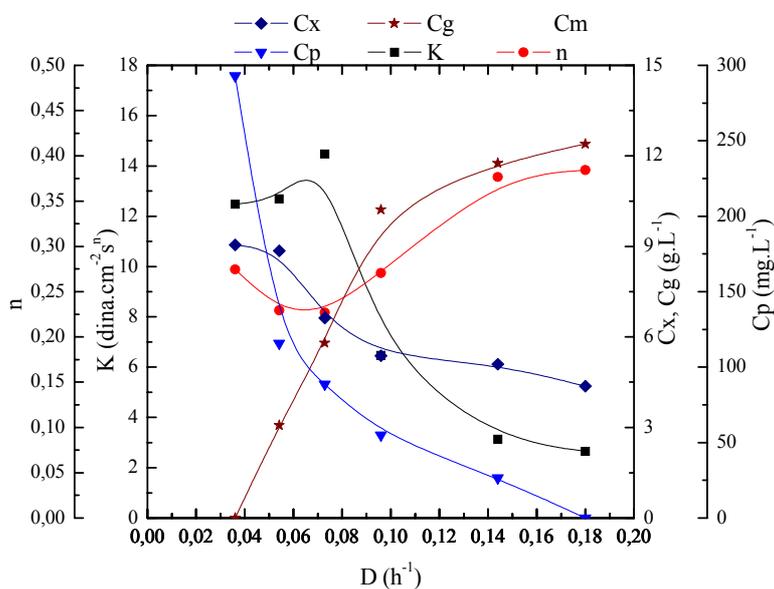


Figura 4-36: Variação dos parâmetros reológicos, concentração celular (Cx), concentração de glicerol (Cg) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C2 (MP2)

Os valores de velocidade de respiração celular (R.Cx) determinadas no experimento C2 permaneceram na faixa de 0,0125 a 0,0175 mol.L⁻¹.h⁻¹ (Figura 4-35),

cerca da metade do valor encontrado no experimento C1. Tal como observado na Figura 4-35, a velocidade de respiração depende da taxa de diluição, porém, quando se operou o reator a taxas de diluição entre 0,09 a 0,18 não se observou diferença significativamente na respiração celular.

Quanto à velocidade de formação de dióxido de carbono (CER), os valores encontrados nesse experimento permaneceram na faixa de 0,005 a 0,0175 mol.L⁻¹.h⁻¹. Esses valores foram um pouco inferiores àqueles obtidos no experimento C1.

Os valores de RQ obtidos neste experimento variaram de 0,3 a 1,3 mol_{CO2}.mol_{O2}⁻¹. Tais valores apresentaram uma faixa muito grande e significativamente diferentes dos valores de literatura já descritos.

A maior concentração celular obtida foi de 9,0 g.L⁻¹, valor pouco inferior ao obtido no experimento C1. No experimento C2 não foi detectado glicerol quando se operou o reator na menor taxa de diluição (0,034 h⁻¹), fato não observado no experimento C1 quando se operou o reator em uma taxa de diluição semelhante (0,036 h⁻¹).

A maior concentração de ácido clavulânico (Cp) obtida no experimento foi de 293 mg.L⁻¹, quando se operou o reator na menor taxa de diluição (0,036 h⁻¹). Tal valor foi superior ao obtido no experimento C1.

A Tabela 4-5 mostra os valores da concentração celular (Cx), de glicerol (Cg) e de ácido clavulânico, produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica (P_{eac}) para as seis taxas de diluição estudadas.

Tabela 4-5: Valores das concentrações de células (C_x), de glicerol (C_g) e de ácido clavulânico (C_p), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica do microrganismo (Pe_{ac}) obtidas nas seis taxas de diluição do cultivo C2 (meio MP2).

| D (h^{-1}) | C_x ($g.L^{-1}$) | C_g ($g.L^{-1}$) | C_p ($g.L^{-1}$) | P_{ac} ($mg.L^{-1}.h^{-1}$) | Pe_{ac} ($mg.g_x^{-1}.h^{-1}$) |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| 0,036 | 9,05 | 0,00 | 293 | 10,58 | 1,169 |
| 0,054 | 8,85 | 3,07 | 116 | 6,27 | 0,708 |
| 0,073 | 6,63 | 5,80 | 89 | 6,47 | 0,977 |
| 0,096 | 5,37 | 10,22 | 55 | 5,28 | 0,983 |
| 0,144 | 5,10 | 11,76 | 27 | 3,84 | 0,752 |
| 0,180 | 4,37 | 12,39 | 0 | 0,00 | 0,000 |

Quanto a produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}), observa-se na Tabela 4-5 que o maior valor ($10,58 \text{ mg.L}^{-1}.h^{-1}$) foi obtido quando se operou o reator na menor taxa de diluição ($0,036 \text{ h}^{-1}$). O valor observado foi superior ao encontrado no experimento C1. Diferentemente dos observados no experimento C1, os valores de produtividade em ácido clavulânico não apresentaram uma queda muito brusca quando se operou o reator em taxas de diluições entre $0,054$ a $0,096 \text{ h}^{-1}$. Tal fato pode ser atribuído às pequenas diferenças encontradas nos valores de produtividade específica entre taxas de diluições entre $0,036$ e $0,144 \text{ h}^{-1}$, ao contrário do observado no experimento C1.

Observou-se também que a produtividade máxima em ácido clavulânico (P_{ac}) desse experimento contínuo foi superior à obtida no experimento FS102 ($3,47 \text{ mg.L}^{-1}.h^{-1}$). Cabe ressaltar que o meio de cultivo utilizado no experimento C2 foi o mesmo utilizado no experimento FS102. Quanto ao maior valor da produtividade específica obtido nesse experimento (C2), o mesmo foi ligeiramente superior ao obtido no experimento FS102.

Experimento C3

O gráfico da Figura 4-37 mostra os valores de velocidade de respiração celular (R.Cx) e do quociente respiratório (RQ). E nos gráficos das Figuras 4-38 e 4-39 é possível visualizar os valores obtidos das análises das amostras.

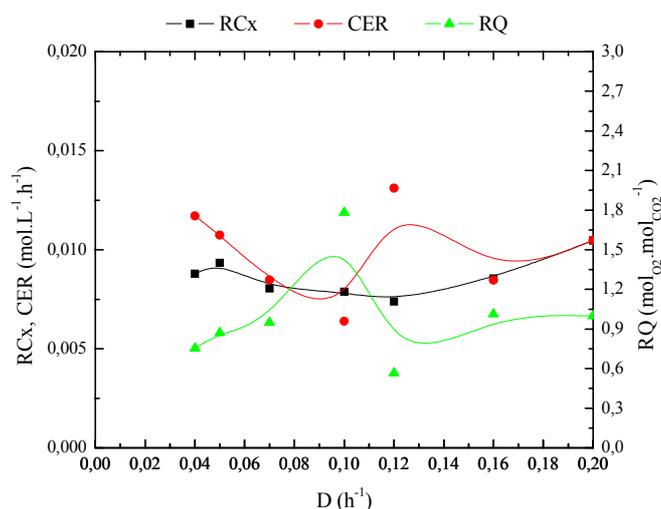


Figura 4-37: Variação das velocidades de respiração (RCx), velocidade de formação de CO₂ (CER) e quociente respiratório (RQ) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C3 (MP5)

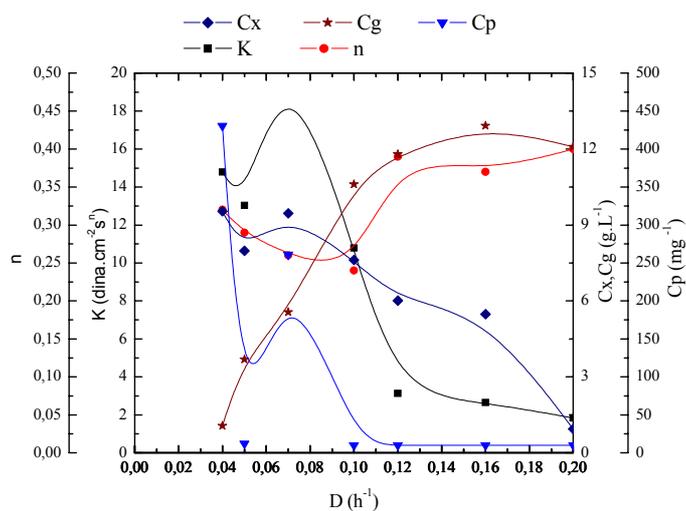


Figura 4-38: Variação dos parâmetros reológicos (K e n), concentração celular (Cx), concentração de glicerol (Cg) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C3 (MP5)

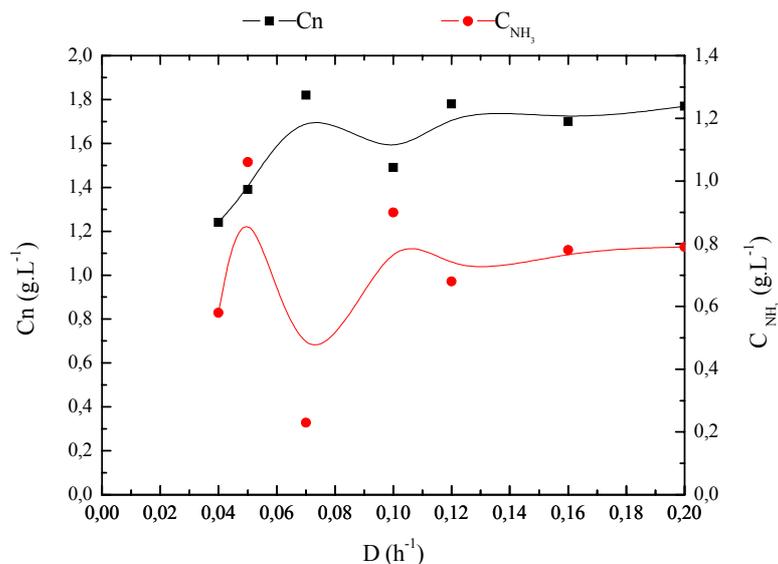


Figura 4-39: Variação da Concentração de nitrogênio orgânico (C_n) e de nitrogênio na forma de amônia (C_{NH_3}) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C3 (MP5)

As velocidades de respiração do experimento C3 permaneceram na faixa de 0,0075 a 0,0125 $mol.h^{-1}.L^{-1}$, a mesma faixa encontrada no experimento C2. Apesar da variação da taxa de diluição, houve pouca variação na velocidade de respiração do microrganismo.

Quanto à velocidade de formação de dióxido de carbono, os valores também permaneceram entre 0,015 a 0,005 $mol.L^{-1}.h^{-1}$. Tais valores também foram semelhantes aos obtidos no experimento C2.

Os valores de RQ permaneceram em uma faixa próximo a 1 $mol_{CO_2}.mol_{O_2}^{-1}$. Tais valores são próximos aos obtidos no experimento C1 e muito diferentes aos obtidos no experimento C2.

Em relação a maior concentração celular, o valor obtido foi em torno de 10 $g.L^{-1}$, sendo um pouco superior ao obtido no experimento C2 e inferior ao obtido no experimento C1.

Ao contrário do experimento C2, foi obtida uma concentração residual de glicerol na saída do reator de 1 $g.L^{-1}$. Também vale a pena ressaltar que o glicerol é

considerado um dos precursores do ácido clavulânico (MacGowan *et al.*,1998) e, por isso, efeito de limitação de glicerol na produção de ácido clavulânico também deve ser desconsiderado.

Observa-se no gráfico da Figura 4-39 que houve consumo da fonte de nitrogênio orgânico, nitrogênio na forma de proteínas ou aminoácidos, como fonte de carbono e de energia, mesmo havendo o consumo de glicerol para esse fim. O consumo da fonte de nitrogênio para a formação de energia é confirmado pela formação de amônia, composto resultante da degradação de aminoácidos para a produção de energia, detectada durante o cultivo.

Quanto à concentração de ácido clavulânico (C_p), o maior valor obtido foi de 430 mg.L^{-1} quando se operou o reator na menor taxa de diluição ($0,04 \text{ h}^{-1}$). Tal valor foi quase 50% maior que o obtido no experimento C2.

Observa-se que não houve produção quando se operou o reator numa taxa de diluição de 0,05. Cabe ressaltar que o reator foi operado nessa taxa de diluição depois de cerca de 500 horas de cultivo, sendo inclusive o último dos sete valores experimentais obtidos nesse experimento. Por isso o seu baixo valor pode estar associado à perda da capacidade produtiva do microrganismo ocasionada por alterações genéticas do *Streptomyces clavuligerus*. Ressalta-se que existem vários artigos em literatura descrevendo a instabilidade genética de actinomicetos tais como o de Bergter e Riesenber (1982) e o de Chen (1995).

Tabela 4-6Tabela 4-7: Valores de concentrações de células (C_x), de glicerol (C_g) e de ácido clavulânico (C_p), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica (Pe_{ac}) obtidas nas sete taxas de diluição do cultivo C3 (MP5).

| D (h^{-1}) | C_x ($g.L^{-1}$) | C_g ($g.L^{-1}$) | C_p ($mg.L^{-1}$) | P_{ac} ($mg.L^{-1}.h^{-1}$) | Pe_{ac} ($mg.g_x^{-1}.h^{-1}$) |
|----------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| 0,04 | 9,54 | 1,07 | 430,50 | 17,22 | 1,81 |
| 0,05 | 7,98 | 3,69 | 12,21 | 0,61 | 0,08 |
| 0,07 | 9,46 | 5,56 | 261,00 | 18,27 | 1,93 |
| 0,10 | 7,62 | 10,61 | 10,00 | 1,00 | 0,13 |
| 0,12 | 6,01 | 11,80 | 10,00 | 1,20 | 0,20 |
| 0,16 | 5,48 | 12,92 | 10,00 | 1,60 | 0,29 |
| 0,20 | 0,94* | 12,09 | 0,00 | 0,00 | 0,0 |

* determinado pela equação 4.1

Como observado na Tabela 4-6Tabela 4-7, a produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) foi de $18,27 \text{ mg.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, obtida quando se operou o reator a uma taxa de diluição de $0,07 \text{ h}^{-1}$, valor intermediário da faixa em que se operou o sistema, ao contrário dos experimentos C1 e C2.

Quanto à produtividade específica (Pe_{ac}), observou-se que o maior valor também foi obtido quando se operou o reator à taxa de diluição de $0,07 \text{ h}^{-1}$. Observou-se também que a produtividade específica desse experimento foi bem próxima à obtida no experimento FS202. Cabe ressaltar que os meios de cultura utilizados nesses dois experimentos, C3 e FS202, apresentaram mesma formulação (MP5).

O fato de se obter uma produtividade específica a uma taxa de diluição intermediária pode indicar a formação de algum produto do metabolismo do microrganismo que possa influenciar negativamente na velocidade de produção de ácido clavulânico. Também vale ressaltar que os valores de concentração de nitrogênio não foram bons devido a problemas de análise e, por isso, nenhuma conclusão sobre a sua influência no processo pôde ser tirada.

O experimento em batelada apresentou uma menor produtividade em ácido clavulânico quando comparada com a obtida nesse experimento. Tal fato confirma a

maior eficiência do processo contínuo em relação aos processos em batelada aqui apresentados.

Experimento C4

Os valores obtidos no estado estacionário do experimento C4 (MP5) são mostrados nos gráficos das Figuras 4-40, 4-41 e 4-42.

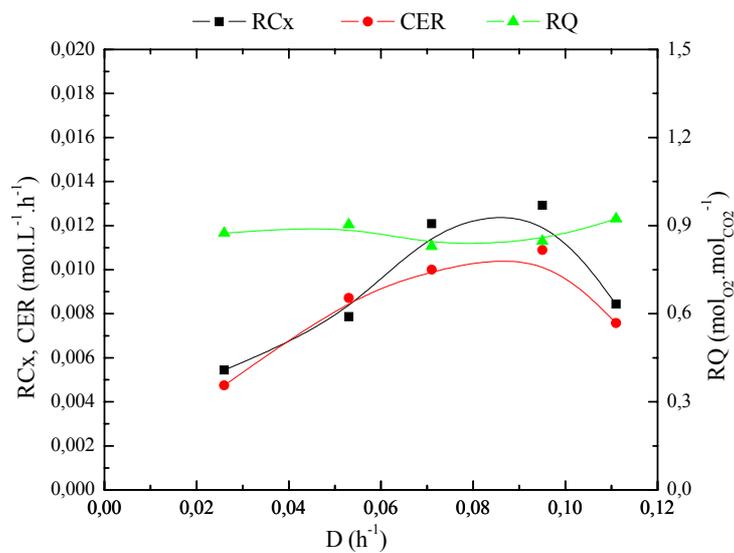


Figura 4-40: Variação da velocidade de respiração (RCx), velocidade de formação de CO₂ (CER) e quociente respiratório (RQ) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C4 (MP5)

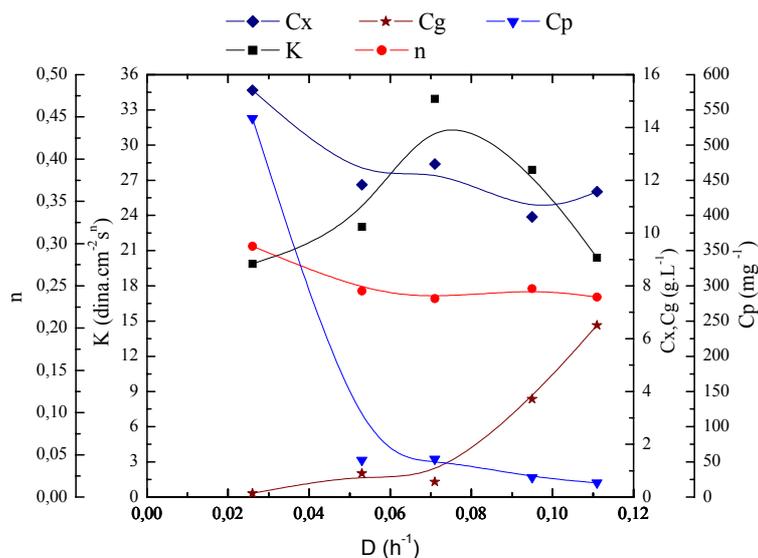


Figura 4-41: Variação dos parâmetros reológicos (K e n), concentração celular (Cx), concentração de glicerol (Cg) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C4 (MP5)

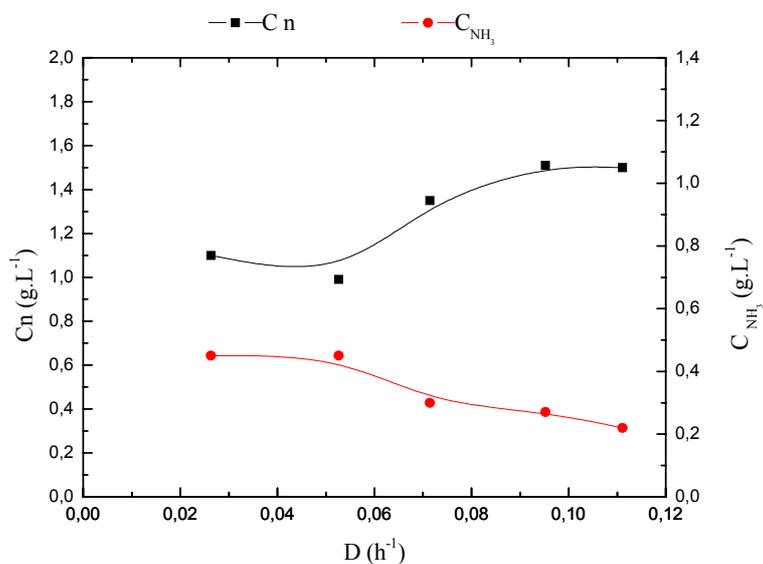


Figura 4-42: Variação da Concentração de nitrogênio orgânico (Cn) e de nitrogênio na forma de amônia (C_{NH3}) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C4 (MP5)

As velocidades de respiração do experimento C4 permaneceram na faixa de 0,004 a 0,013 mol.L⁻¹.h⁻¹, valores um pouco superiores aos encontrados no experimento C3 e C2. Diferentemente ao experimento C3, os valores de consumo de oxigênio

variaram com a taxa de diluição apresentando um máximo de $0,013 \text{ mol.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$ ($D=0,095 \text{ h}^{-1}$). Cabe ressaltar que os valores de respiração celular estão relacionados com a taxa de diluição (indiretamente com a velocidade de crescimento) e com a concentração celular.

As velocidades de formação de dióxido de carbono obtidas nesse experimento também permaneceram da faixa de $0,004$ a $0,010 \text{ mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, valores inferiores aos obtidos nos experimentos C2 e C3.

Os valores de RQ permaneceram em uma faixa próxima a $1 \text{ mol}_{\text{CO}_2}.\text{mol}_{\text{O}_2}^{-1}$ sendo semelhantes aos obtidos no experimento C3.

Quanto à concentração celular, o maior valor obtido foi em torno de 15 g.L^{-1} , sendo superior às obtidas nos experimentos C2 e C3 e na mesma faixa da obtida no experimento C1.

Também não foi detectado glicerol quando se operou o sistema em sua menor taxa de diluição, tal como observado no experimento C2.

Tal como observado no experimento C3, houve o consumo da fonte de nitrogênio orgânico (Samprosoy 90 NB) como fonte de carbono e energia, mesmo havendo o consumo de glicerol para esse fim. Nesse caso, os valores experimentais mostram uma tendência de consumo da fonte de nitrogênio orgânico, apontando para uma menor concentração desse nutriente quando se operou o reator na sua menor taxa de diluição.

Quanto à concentração de ácido clavulânico, o maior valor obtido foi de 534 mg.L^{-1} quando se operou o reator na menor taxa de diluição ($0,026 \text{ h}^{-1}$). Tal valor foi maior que ao obtido no experimento C3. Na Tabela 4-8 estão descritos os valores das concentrações de células, glicerol e ácido clavulânico e das produtividades volumétrica

e específica em ácido clavulânico nas cinco taxas de diluições nas quais foi operado o bioreatores.

Tabela 4-8: Valores da concentrações de células (C_x), de glicerol (C_g) e de ácido clavulânico (C_p), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica (Pe_{ac}) obtidas nas cinco taxas de diluição do cultivo C4 (MP5)

| D (h^{-1}) | C_x ($g.L^{-1}$) | C_g ($g.L^{-1}$) | C_p ($mg.L^{-1}$) | P_{ac} ($mg.L^{-1}.h^{-1}$) | Pe_{ac} ($mg.g_x^{-1}.h^{-1}$) |
|----------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| 0,026 | 15,41 | 0,15 | 538 | 14 | 0,91 |
| 0,053 | 11,83 | 0,90 | 53 | 2,8 | 0,24 |
| 0,071 | 12,62 | 0,58 | 54 | 3,8 | 0,30 |
| 0,095 | 10,61 | 3,71 | 28 | 2,6 | 0,25 |
| 0,111 | 11,57 | 6,51 | 20 | 2,2 | 0,19 |

Pelos valores descritos pela Tabela 4-8, a maior produtividade em ácido clavulânico foi de $14 \text{ mg.L}^{-1}.h^{-1}$, valor obtido quando se operou o sistema em sua mais baixa taxa de diluição, tal como observado nos experimentos C1 e C2. Cabe ressaltar que, apesar da maior concentração celular, o valor de produtividade em ácido clavulânico obtido nesse experimento foi menor que o valor obtido no experimento C3.

A produtividade específica do experimento C4 foi de $0,91 \text{ mg.g}_x^{-1}.h^{-1}$, valor inferior ao obtido no experimento C3. Essa baixa produtividade específica pode estar relacionada a algum produto oriundo do metabolismo do microrganismo que possa estar acumulando no caldo de cultivo devido aos valores mais baixos das taxas de diluição no qual foi operado o reator nesse experimento.

O valor de produtividade específica obtida nesse experimento foi inferior ao obtido no cultivo FS202 em batelada. Apesar da queda na produtividade específica, a produtividade em ácido clavulânico do experimento C4 foi maior que a obtida em batelada (FS202).

Experimento C7

Não foi realizado nesse experimento o balanço gasoso e por isso não há valores experimentais de respiração celular.

Os valores obtidos no estado estacionário do experimento C7 (MP5) são mostrados nos gráficos das Figuras 4-43 e 4-44.

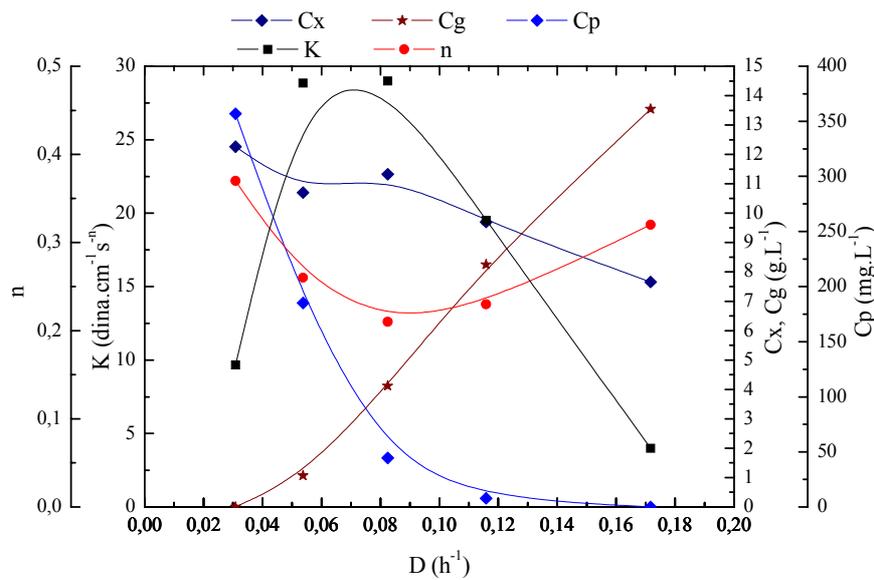


Figura 4-43: Variação dos parâmetros reológicos (K e n), concentração celular (Cx), concentração de glicerol (Cg) e concentração de ácido clavulânico (Cp) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C7 (MP5)

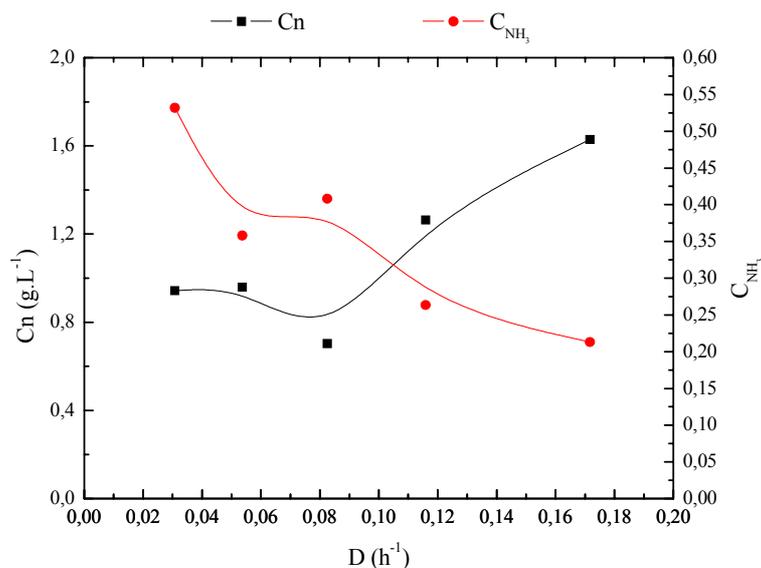


Figura 4-44: Variação da Concentração de nitrogênio orgânico (C_n) e de nitrogênio na forma de amônia (C_{NH_3}) com a taxa de diluição (D) durante o experimento C7 (MP5)

A maior concentração celular obtida foi em torno de $13 g.L^{-1}$ sendo um pouco inferior à obtida no experimento C4 e pouco superior a do experimento C3.

Também não foi encontrado glicerol quando se operou o reator em sua menor taxa de diluição, tal como observado no experimento C2 e C4.

Foi observado um consumo da fonte de nitrogênio orgânico como fonte de carbono e de energia. Tal como no experimento C4, o consumo da fonte de nitrogênio orgânico foi dependente da taxa de diluição.

Quanto à concentração de ácido clavulânico, o maior valor foi de $357 mg.L^{-1}$ obtido quando se operou o reator na menor taxa de diluição ($0,031 h^{-1}$). Tal valor foi menor que os obtidos no experimento C3 e C4. Na Tabela 4-9 estão descritos os valores das concentrações de células, glicerol e ácido clavulânico, as produtividades em ácido clavulânico e as produtividades específicas.

Tabela 4-9: Valores da concentração de células (Cx), de glicerol (Cg) e de ácido clavulânico (Cp), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica obtidas nas cinco taxas de diluição de C7 (MP5)

| D (h ⁻¹) | C _x (g.L ⁻¹) | C _g (g.L ⁻¹) | C _p (mg.L ⁻¹) | P _{ac} (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹) | Pe _{ac} (mg.g _x ⁻¹ .h ⁻¹) |
|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| 0,0308 | 12,26 | 0,00 | 356,90 | 11,0 | 0,90 |
| 0,0537 | 10,70 | 1,07 | 185,27 | 9,95 | 0,93 |
| 0,0825 | 11,32 | 4,12 | 44,54 | 3,67 | 0,32 |
| 0,1159 | 9,70 | 8,25 | 7,99 | 0,93 | 0,10 |
| 0,1717 | 7,66 | 13,54 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Pelos valores descritos na Tabela 4-9, a maior produtividade em ácido clavulânico obtida foi de 11 mg.L⁻¹.h⁻¹, quando se operou o sistema em sua mais baixa taxa de diluição. O valor de produtividade em ácido clavulânico foi inferior comparado com os obtidos nos experimentos C3 e C4.

A maior produtividade específica do experimento C7 foi de 0,93 mg.g_x⁻¹.h⁻¹, valor semelhante ao obtido no experimento C4 mas bem inferior àquele do experimento C3. Também cabe ressaltar que quando se operou o reator a uma taxa de diluição de 0,05 h⁻¹, também foi obtida uma produtividade específica semelhante.

Comparando com o experimento FS202, a produtividade específica em ácido clavulânico foi inferior. Ao contrário dos experimentos C3 e C4, a produtividade em ácido clavulânico nesse experimento (11mg.L⁻¹.h⁻¹) foi inferior à obtida no experimento FS202 (11,7 mg.L⁻¹.h⁻¹).

Comparação Entre os Experimentos Contínuos sem Reciclo Celular

Os cultivos C1, C2, C3, C4 e C7 foram realizados com meios de alimentação diferentes. O meio MP1 (vide tabela 3-2) foi utilizado no cultivo C1 e contém em sua composição 10 g.L⁻¹ tanto de Samprosoy 90NB como de extrato de malte. O meio MP2 foi utilizado no experimento C2 e difere do meio MP1 por não conter extrato de malte

em sua composição. Para os experimentos C3, C4 e C7 foi utilizado o meio MP5, que difere do meio MP2 por conter 20 g.L^{-1} de Samprosoy 90NB em sua composição.

Os gráficos das Figuras 4-44 e 4-45 comparam os valores de velocidade de respiração e os de velocidade de formação de dióxido de carbono (CER) obtidos nos experimentos C1, C2, C3 e C4.

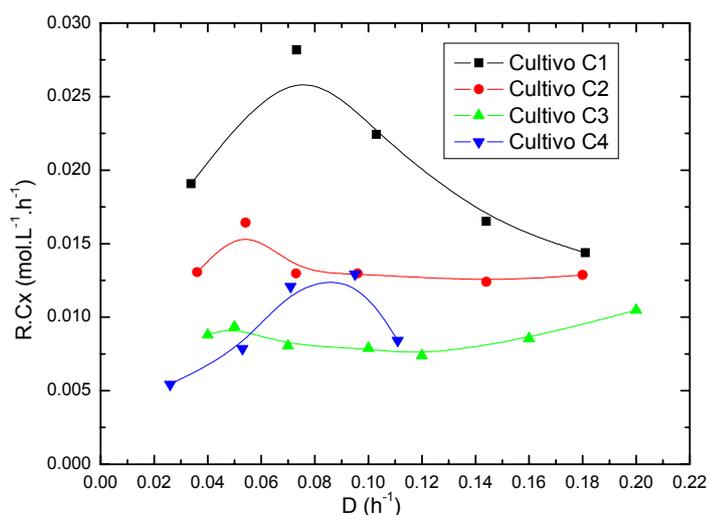


Figura 4-45: Variação das velocidades de respiração (R.Cx) com a taxa de diluição (D) nos experimentos C1, C2, C3 e C4.

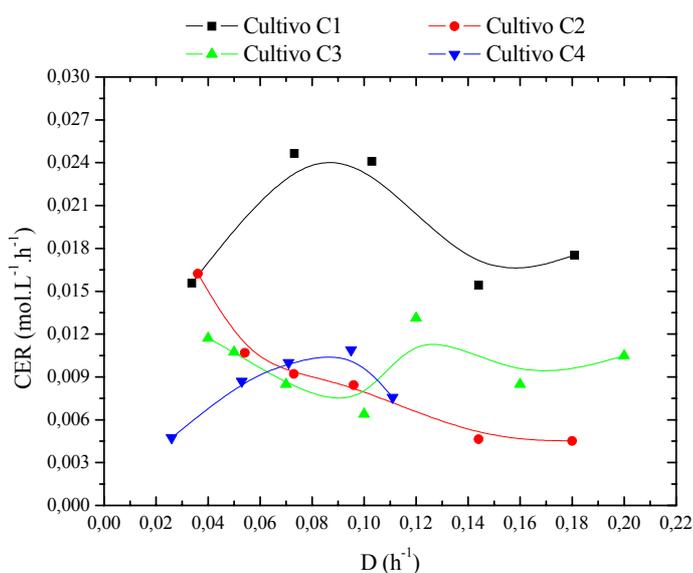


Figura 4-46: Variação das velocidades de formação de dióxido de carbono (CER) com a taxa de diluição (D) nos experimentos C1, C2, C3 e C4.

Como observado nos gráficos das Figuras 4-45 e 4-46, tanto a velocidade de consumo de oxigênio como a velocidade de formação de dióxido de carbono foi maior no experimento C1. Tal fato pode estar relacionado à presença de extrato de malte no meio de cultivo. Nos outros experimentos, a respiração celular apresentou valores menores que $0,018 \text{ mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Apesar da maior concentração de Samprosoy 90 NB, os experimentos C3 e C4 apresentaram a mesma taxa de respiração bem como a de formação de dióxido de carbono quando comparadas às do experimento C2.

O gráfico da Figura 4-47 mostra os valores das velocidades de consumo de glicerol nos experimentos contínuos sem reciclo celular.

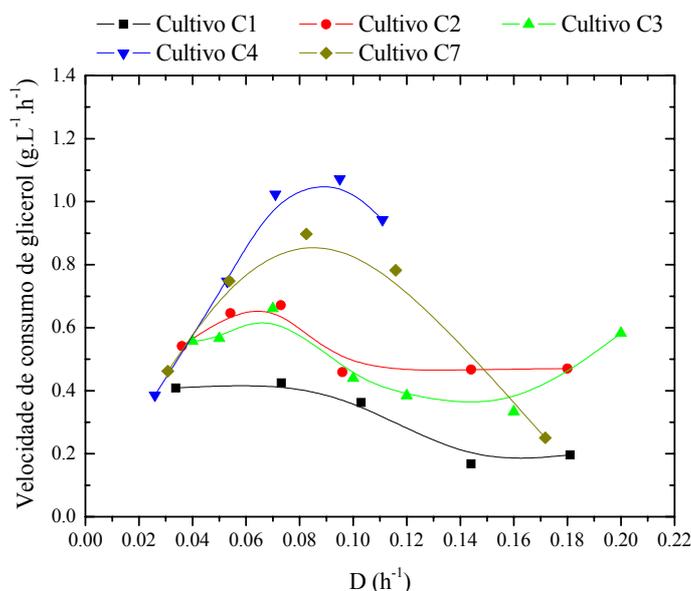


Figura 4-47: Variação da velocidade de consumo de glicerol com a taxa de diluição nos experimentos C1, C2, C3, C4 e C7

Pelo gráfico da Figura 4-47, as velocidades de consumo de glicerol foram menores no experimento C1. Cabe ressaltar que uma maior concentração celular foi observada nesse experimento e por isso uma maior velocidade de consumo de glicerol era esperada. Com isso, pode-se concluir que o consumo de nutrientes presentes no extrato de malte influenciou na velocidade de consumo de glicerol.

Quando comparados os valores dos experimentos C2 e C3 não se observam muitas diferenças nas velocidades de consumo de glicerol calculadas. Porém, os valores da velocidade de consumo de glicerol dos experimentos C4 e C7 foram superiores. Não se pode concluir se houve influência da concentração da fonte de nitrogênio na velocidade de consumo de substrato.

Os valores das maiores concentração celular ($C_{x_{\max}}$), concentração de produto ($C_{p_{\max}}$), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica (Pe_{ac}) dos experimentos contínuos sem reciclo celular (C1, C2, C3, C4 e C7) são apresentados na Tabela 4-10.

Tabela 4-10: Valores de $C_{x_{\max}}$, $C_{p_{\max}}$, P_{ac} , Pe_{ac} e a taxa de diluição (D_{Pac}) em que se obteve a maior produtividade volumétrica em ácido clavulânico dos experimentos contínuos sem reciclo celular

| Parâmetro | C1 (MP1) | C2 (MP2) | C3 (MP5) | C4 (MP5) | C7 (MP5) |
|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| $C_{x_{\max}}$ ($g.L^{-1}$) | 9,88 | 9,05 | 9,54 | 15,41 | 12,26 |
| $C_{p_{\max}}$ ($mg.L^{-1}$) | 265 | 293 | 430 | 538 | 357 |
| P_{ac} ($mg.L^{-1}.h^{-1}$) | 8,93 | 10,56 | 18,27 | 14,16 | 10,99 |
| Pe_{ac} ($mg.g^{-1}.h^{-1}$) | 0,904 | 1,17 | 1,93 | 0,92 | 0,93 |
| D_{Pac} (h^{-1}) | 0,034 | 0,036 | 0,07 | 0,026 | 0,0308 |

Observando-se os resultados da Tabela 4-10, os experimento C3, C4 e C7 apresentaram os melhores valores de produção de ácido clavulânico. Tal fato é devido ao meio alimentação utilizado. Nos experimentos C1 e C2 foi utilizado o meio MP1 e MP2, respectivamente, enquanto nos experimentos C3, C4 e C7 foi utilizado o meio MP5.

A produtividade específica obtido no experimento C1 foi inferior quando comparada com a do experimento C2. Esse fato indica um efeito negativo do extrato de malte no meio de cultivo. Quando se compara a produtividade específica do experimento C2 com a obtida no experimento C3 observa-se que seu valor é inferior,

indicando, dessa maneira, uma influência significativa da concentração da fonte de nitrogênio na produção de ácido clavulânico. Essas observações estão de acordo com os resultados obtidos no estudo sobre a comparação de meio de cultivo (item: Estudo sobre a composição do meio de cultura).

Nos ensaios C3, C4 e C7 as produtividades, bem como as concentrações de produto observadas foram maiores, confirmando os resultados obtidos em batelada para verificar a influência da concentração da fonte de nitrogênio (Samprosoy 90NB) no comportamento do processo. Poderia-se supor que um aumento maior na concentração de fonte de nitrogênio levaria a melhores produtividades. Porém, no caso do processo em batelada, a concentração de produto e produtividade média obtida foi menor quando se aumentou a concentração de Samprosoy 90NB no meio para 30 g.L^{-1} . Portanto optou-se por trabalhar com meio contendo 20 g.L^{-1} de Samprosoy 90NB nos cultivos contínuos com reciclo celular.

Os experimentos contínuos apresentaram, na maioria dos casos, maiores produtividades em ácido clavulânico quando comparado com aqueles dos experimentos em batelada. Cabe ressaltar que, na maioria dos experimentos contínuos, as concentrações máximas de produto foram inferiores a obtida no experimento em batelada.

Cultivos em batelada alimentada utilizando o meio MP2 foram realizados por Hirata (2003). Nesses cultivos, a maior produtividade em ácido clavulânico obtida ($8,8 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi menor que a obtida no experimento C2 ($10,6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), apesar da maior concentração de ácido clavulânico (404 mg.L^{-1}).

Teodoro *et al.* (2003) descreve cultivos em batelada alimentada utilizando o meio MP5. Nesse trabalho os autores obtiveram a maior concentração de ácido clavulânico em torno de 700 mg.L^{-1} . Apesar desse alto valor, a maior produtividade

descrita nesse trabalho ($13 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi inferior a obtida nos experimentos C3 e C4 (ver Tabela 4-10).

B. Experimentos Contínuos com Reciclo Celular.

Os valores experimentais das concentrações de células (Cx), glicerol (Cg), produto (Cp), nitrogênio orgânico (Cn) e amônia (C_{NH_3}) de todos os cultivos contínuos com reciclo celular são apresentados na Tabela 4-11.

Tabela 4-11: Valores experimentais das concentrações de células (Cx), de glicerol (Cg), de ácido clavulânico (Cp), de nitrogênio orgânico (Cn) e de amônia (C_{NH_3}) obtidos nos experimentos contínuos com reciclo celular (CR1, CR3, CR5 e CR6).

| Cultivo | θ_h (h) | θ_c (h) | Cx (g.L^{-1}) | Cg (g.L^{-1}) | Cp (mg.L^{-1}) | Cn (g.L^{-1}) | C_{NH_3} (g.L^{-1}) |
|---------|----------------|----------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---|
| CR1 | 11,8 | 28 | 19,50 | 0,00 | 261 | 0,80 | 0,25 |
| | | 20 | 19,97 | 0,00 | 136 | 0,78 | 0,36 |
| | | 15 | 19,48 | 0,23 | 3 | 0,74 | 0,47 |
| CR3 | 10,8 | 22 | 14,96 | 8,27 | 167 | 0,70 | 0,28 |
| | | 18 | 14,28 | 10,94 | 137 | 0,66 | 0,29 |
| CR5 | 18,0 | 36 | 20,96 | 0,48 | 414 | 0,56 | 0,79 |
| CR6 | 23,0 | 36 | 17,31 | 0,12 | 579 | 2,30 | 0,30 |

Pelos valores experimentais da Tabela 4-11, constata-se o aumento significativo na concentração de células dentro do reator, quando comparadas àquelas em sistema em batelada e contínuo sem reciclo celular. Os experimentos CR1 e CR5 apresentaram uma concentração de células acima de 20 g.L^{-1} enquanto os cultivos CR3 e CR6 apresentaram uma concentração de celular de 15 e 17 g.L^{-1} , respectivamente. No cultivo C4, observaram-se concentrações celulares próximos a 15 g.L^{-1} . Apesar dos altos valores de concentrações celulares obtidos no experimento C4, estes foram inferiores aos obtidos nos experimento CR1 e CR5.

Quanto ao consumo de substrato, não foram observados valores baixos de concentrações de glicerol no cultivo CR3. Quanto aos outros cultivos contínuos com reciclo celular (CR1, CR5 e CR6), a concentração de glicerol manteve-se em níveis

baixos devido à alta velocidade de consumo desse substrato, ocasionada pela alta concentração celular obtida nesses experimentos.

Em relação ao consumo de nitrogênio, observa-se que as concentrações de nitrogênio orgânico (na forma de proteínas, peptídeos e aminoácidos) obtidas nesses experimentos são menores que as obtidas nos cultivos contínuos sem reciclo celular. Tal fato deve-se ao alto consumo da fonte de nitrogênio pelo microrganismo ocasionado pela maior concentração celular obtida nos experimentos contínuos com reciclo celular. O cultivo CR6 apresentou uma concentração de nitrogênio orgânico alta, possivelmente devido a problemas na análise e, por isso, não foi considerada na comparação.

Quanto às concentrações de amônia, os valores obtidos nos experimentos contínuos com reciclo celular e sem reciclo celular foram próximos, exceto para o experimento CR5 que apresentou uma maior concentração desse subproduto. Devido a isso, não será considerada a sua influência na comparação dos cultivos contínuos com e sem reciclo celular.

As velocidades de consumo de oxigênio ($R.C_x$) bem com a de formação de dióxido de carbono (CER) foram calculadas somente no estado estacionário do experimento CR5 e os valores obtidos foram $0,016$ e $0,020 \text{ mol.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente. Esses valores são maiores que os obtidos para os experimentos contínuos sem reciclo celular em que foi utilizado o meio MP5 para a alimentação. As altas velocidades de formação de dióxido de carbono bem como de consumo de oxigênio obtidas nesse experimento são devidas às altas concentrações celulares e das condições de operação do reator.

Apesar dos maiores valores das velocidades de consumo de oxigênio e da formação de dióxido de carbono, o valor de RQ no estado estacionário foi de $1,7 \text{ mol}_{\text{CO}_2}.\text{mol}_{\text{O}_2}^{-1}$. O valor obtido nesse cultivo foi muito superior ao descrito em

literatura por Royce e Thonhill (1992) ($0,90 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{mol}_{\text{O}_2}^{-1}$) e por Baptista-Neto (2000) (média de $0,76 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{mol}_{\text{O}_2}^{-1}$).

Os valores de produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e de produtividade específica (Pe_{ac}) de cada experimento contínuo com reciclo celular estão descritos na Tabela 4-12.

Tabela 4-12: Valores das produtividades em ácido clavulânico (P_{ac}) e das produtividades específicas (Pe_{ac}) obtidos nos experimentos contínuos com reciclo celular.

| Cultivo | θ_h (h) | θ_c (h) | P_{ac} ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) | Pe_{ac} ($\text{mg} \cdot \text{g}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) |
|---------|----------------|----------------|---|--|
| CR1 | 11,8 | 28 | 22,10 | 1,13 |
| | | 20 | 11,51 | 0,58 |
| | | 15 | 0,28 | 0,01 |
| CR3 | 10,8 | 22 | 15,46 | 1,03 |
| | | 18 | 12,66 | 0,89 |
| CR5 | 18 | 36 | 23,00 | 1,10 |
| CR6 | 23 | 36 | 25,17 | 1,45 |

O gráfico da Figura 4-48 mostra a variação da concentração de produto (C_p) com os tempos de residência hidráulico (θ_h) e celular (θ_c). A variação da produtividade (P_{ac}) em ácido clavulânico com os tempos de residência hidráulico (θ_h) e celular (θ_c) é mostrado pelo gráfico da Figura 4-49.

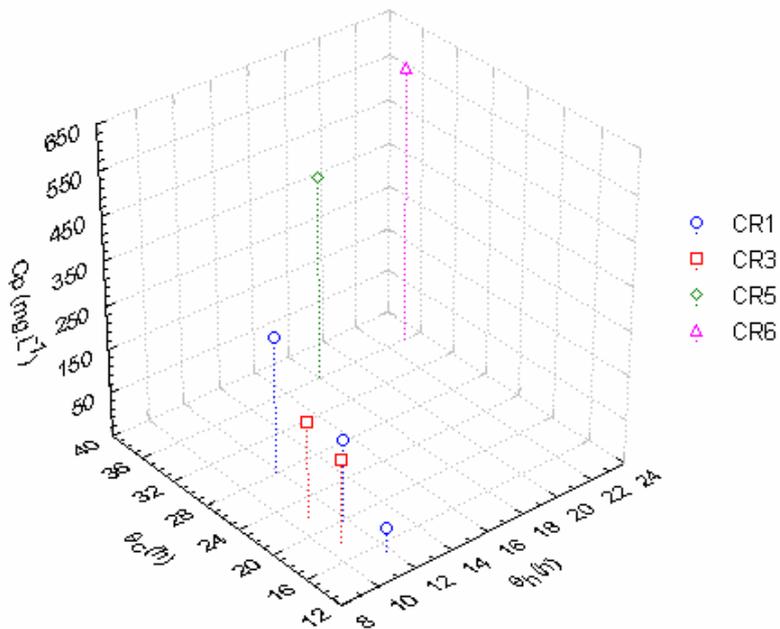


Figura 4-48: Variação da concentração de produto (C_p) com os tempos de residência hidráulico (θ_h) e celular (θ_c) nos cultivos contínuos com reciclo celular

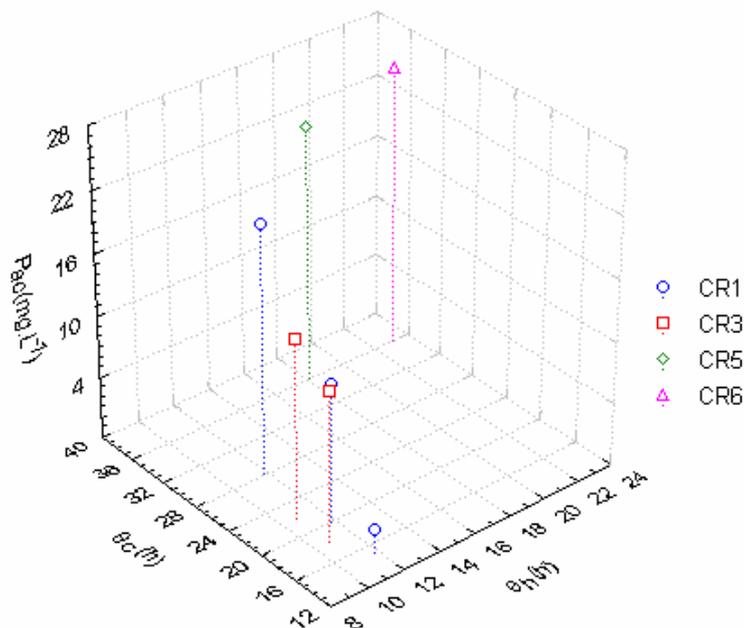


Figura 4-49: Variação da Produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) com os tempos de residência hidráulico (θ_h) e celular (θ_c) nos experimentos contínuos com reciclo celular

Pelos gráficos das Figuras 4-48 e 4-49, observa-se que os maiores valores de concentrações de produto bem como de produtividades em ácido clavulânico são

obtidos quando se opera o reator com altos tempos de residência celular e hidráulico. Os maiores valores da concentração de ácido clavulânico (579 mg.L^{-1}) bem como da produtividade em ácido clavulânico ($25,2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foram obtidos no experimento CR6, cujo tempos de residências hidráulico e celular foram de 23 e 36 horas respectivamente (vide Tabela 4-11). Cabe ressaltar que a maior produtividade específica ($1,45 \text{ mg.g}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$) também foi obtida no experimento CR6.

Comparação entre os Cultivos em Batelada e Contínuos sem e com Reciclo Celular

A Tabela 4-13 mostra os maiores valores de concentração celular ($C_{X_{\max}}$), concentração máxima de produto ($C_{p_{\max}}$), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica (Pe_{ac}) obtidos no cultivo FS202 e nos cultivos contínuos sem e com reciclo celular.

Tabela 4-13: Maiores valores de $C_{X_{\max}}$, $C_{p_{\max}}$, P_{ac} , Pe_{ac} obtidos nos experimentos em batelada, contínuos com e sem reciclo celular.

| Parâmetro | Batelada (FS202) | Contínuo sem reciclo | Contínuo com reciclo |
|--|------------------|----------------------|----------------------|
| $C_{X_{\max}} (\text{g.L}^{-1})$ | 11,92 | 15,4 (C4) | 20,96 (CR5) |
| $C_{p_{\max}} (\text{mg.L}^{-1})$ | 474 | 538 (C4) | 579 (CR6) |
| $P_{ac} (\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$ | 11,7 | 18,3 (C3) | 25,2 (CR6) |
| $Pe_{ac} (\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1})$ | 2,0 | 1,9 (C3) | 1,4 (CR6) |

Os valores de concentração celular descritos na Tabela 4-13 mostram que a utilização de cultivos contínuos com reciclo celular é eficiente para a realização de cultivos contínuos com alta concentração celular. O maior valor de concentração celular obtido no cultivo contínuo com reciclo foi superior aos valores obtidos nos experimentos em batelada (FS202) e contínuos sem reciclo.

Pelos valores da Tabela 4-13, observa-se que a produtividade volumétrica (P_{ac}) em ácido clavulânico do cultivo contínuo com reciclo celular também foi superior às obtidas nos experimentos em batelada e contínuo sem reciclo celular. A alta

concentração celular foi o principal motivo para o aumento na produtividade do processo.

Observou-se, também, que a produtividade específica ($P_{e_{ac}}$) nos experimentos contínuos sem reciclo celular e a obtida no cultivo batelada apresentaram valores próximos e superiores a produtividade específica obtida no cultivo contínuo com reciclo celular.

Teodoro *et al.* (2003) descrevem em seu trabalho uma produtividade em ácido clavulânico de $13 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, valor inferior aos obtidos nos cultivos contínuos com reciclo celular apesar dos autores obterem uma concentração de ácido clavulânico (700 mg.L^{-1}), valor superior aos obtidos nos cultivos contínuos com reciclo celular.

No cultivo C4 a maior concentração de ácido clavulânico foi obtida quando se operou o reator com tempo de residência de 38 horas. Nos cultivos CR5 e CR6, cultivos em que se obteve as maiores concentrações de ácido clavulânico, foi operado a um tempo de residência celular de 36 horas e em diferentes tempos de residência hidráulico, 18 e 23 horas para os cultivos CR5 e CR6, respectivamente. Os valores da concentração de ácido clavulânico, produtividade e produtividade específica dos experimentos C4, CR5 e CR6 estão descritos na Tabela 4-14.

Tabela 4-14: Valores das concentração de ácido clavulânico (C_p), produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) e produtividade específica ($P_{e_{ac}}$) dos experimentos C3, CR6 e CR5

| cultivo | θ_h (h) | θ_c (h) | $\frac{\theta_c}{\theta_h}$ | C_p (mg.L^{-1}) | P_{ac} ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) | $P_{e_{ac}}$ ($\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) |
|---------|----------------|----------------|-----------------------------|---------------------------------|--|--|
| C4 | 38 | 38 | 1 | 538 | 14,16 | 0,92 |
| CR6 | 23 | 36 | 1,6 | 579 | 25,17 | 1,45 |
| CR5 | 18 | 36 | 2 | 414 | 23 | 1,1 |

Pelos valores da Tabela 4-14, observa-se que a maior concentração de ácido clavulânico foi obtida quando se operou o reator a um tempo de residência hidráulico de

23 horas ($\theta_c=36h$). Também foi observado que a maior produtividade em ácido clavulânico bem como a maior produtividade específica foram obtidas quando se operou o reator nas mesmas condições, $\theta_h=23$ e $\theta_c=36h$. Com esses resultados, sugere-se que há uma condição de operação ótima entre as que foram utilizadas nos cultivos C4 e CR5.

O experimento CR6 foi operado a um tempo de residência celular de 36 horas (tal como no CR5) e a um tempo de residência hidráulico de 23 horas. Isso significa que as células em CR5 tiveram uma recirculação maior que no cultivo CR6. Esse fato pode ter provocado maiores danos às células em CR5, devido ao cisalhamento. Outro fator a se considerado é o maior acúmulo de metabólitos prejudiciais à produção de ácido clavulânico no cultivo CR5.

Cabe ressaltar que, como visto na Figura 4-3, o caldo de cultivo deixa o sistema completamente filtrado e por isso a etapa de separação celular pode ser descartada para separação do ácido clavulânico do produto. Também foi obtida uma maior produtividade em ácido clavulânico bem como uma maior concentração de produto, valor maior que a obtida em processos em batelada, por vezes utilizados na produção de antibióticos. Com isso, constata-se que o cultivo contínuo com reciclo celular é o modo de operação mais indicado no processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.

4.4. Tratamento Numérico dos Valores Experimentais

4.4.1. Resultado da Modelagem cinética

A. Modelo Considerando Somente um Substrato Limitante no Modelo Cinético de Crescimento Celular

Cinética de Crescimento Celular segundo Monod

Inicialmente foi utilizado o modelo de Monod para a modelagem cinética do crescimento celular no processo.

Os cálculos dos parâmetros $\mu_{\text{máx}}$ e K_s foram realizados utilizando os pontos dos experimentos C3, C4 e C7 e a equação 3-17. O gráfico da Figura 4-50 mostra o ajuste do modelo considerando todos os pontos dos três cultivos.

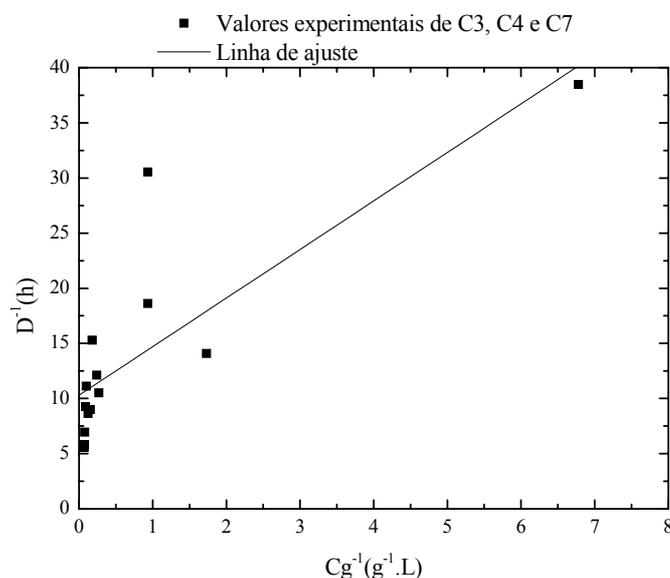


Figura 4-50: Ajuste de $\mu_{\text{máx}}$ e K_s do modelo de Monod pela equação 3-17 utilizando os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7.

Também foi realizado um ajuste do modelo aos valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7, separadamente. O gráfico da Figura 4-51 mostra as linhas de ajuste obtidas.

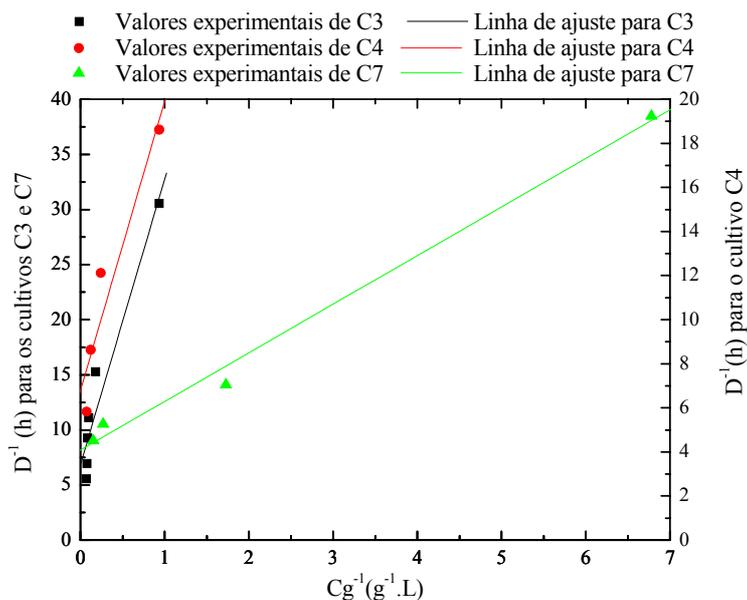


Figura 4-51: Ajuste de μ_{max} e K_s do modelo de Monod pela equação 3-17 para os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7 separadamente

Foi também realizado o cálculo de $Y_{X/G}$ para os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7, tanto separadamente (Figura 4-52) como em conjunto (Figura 4-53).

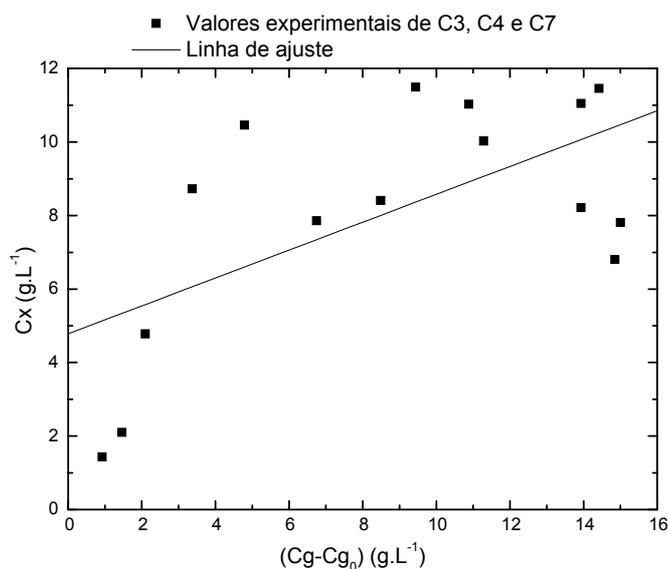


Figura 4-52: Determinação de $Y_{X/G}$ para todos os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7

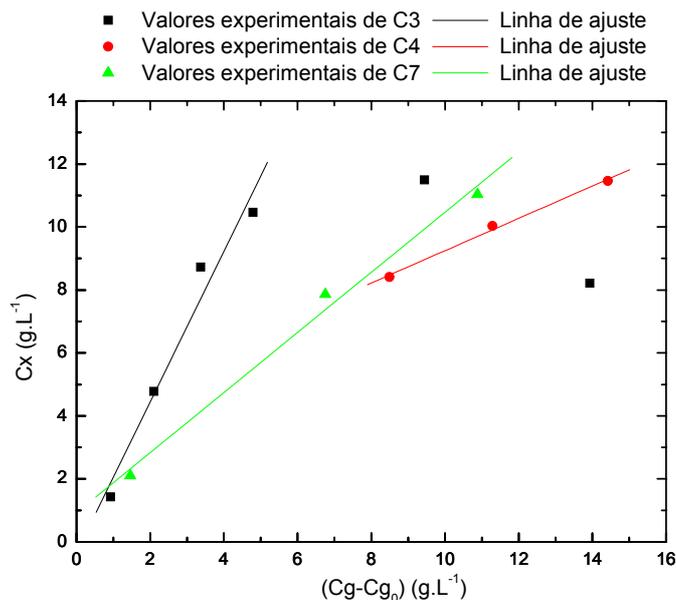


Figura 4-53: determinação de $Y_{X/G}$ para os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7 separadamente.

Pelos gráficos das Figuras 4-50 e 4-51 pode-se observar que o modelo baseado na cinética de Monod ajustou-se bem somente aos valores experimentais do cultivo C4. Os valores determinados dos parâmetros do modelo de Monod considerando os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7 tanto juntos como separadamente estão descritos na Tabela 4-15.

Quanto aos valores de $Y_{X/G}$, observa-se pelo gráfico da Figura 4-52 que os valores experimentais se apresentam muito dispersos e, por isso, não foi possível determinar o valor desse parâmetro. Observou-se um melhor ajuste quando se optou por ajustar os valores para cada um dos experimentos realizados. Os valores de $Y_{X/G}$ são apresentados na Tabela 4-15.

Tabela 4-15: Valores de $Y_{X/G}$, μ_{\max} , K_s e do coeficiente de correlação (R^2) para os cultivos C3, C4 e C7 juntos e separadamente.

| Cultivo | $Y_{X/G}$ ($\text{g}_x \cdot \text{g}_s^{-1}$) | μ_{\max} (h^{-1}) | K_s ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) | R^2 |
|-------------|--|----------------------------------|--|--------|
| C3 | 1,674 | 0,145 | 3,766 | 0,9627 |
| C4 | 0,513 | 0,122 | 0,539 | 0,9961 |
| C7 | 0,954 | 0,164 | 2,156 | 0,9518 |
| C3, C4 e C7 | 0,379 | 0,097 | 0,427 | 0,8199 |

Tal como observado na Tabela 4-15, quando se considerou todos os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7 em conjunto, não se obteve um bom ajuste do modelo aos valores experimentais. Observou-se também que o valor de $Y_{X/G}$ foi baixo quando comparado com o obtido por Baptista-Neto *et al.* (2000), que foi de $0,574 \text{ g}_x \cdot \text{g}_g^{-1}$. Por isso optou-se por considerar separadamente os valores experimentais.

Tal como observado na Tabela 4-15, o único conjunto de valores experimentais que apresentou um bom ajuste do modelo foi o obtido no cultivo C4. O valor de $Y_{X/G}$ determinado nesse experimento foi próximo ao de literatura.

Para os cultivos C3 e C7 o modelo apresentou um péssimo ajuste bem como valores de $Y_{X/G}$ muito elevados quando comparados com aqueles de literatura (Baptista-Neto *et al.*, 2000).

Com isso, foi considerado para a simulação, o modelo e os parâmetros ajustados aos valores experimentais do cultivo C4. A comparação entre o modelo proposto e os valores experimentais do cultivo C4 pode ser visualizado no gráfico da Figura 4-54.

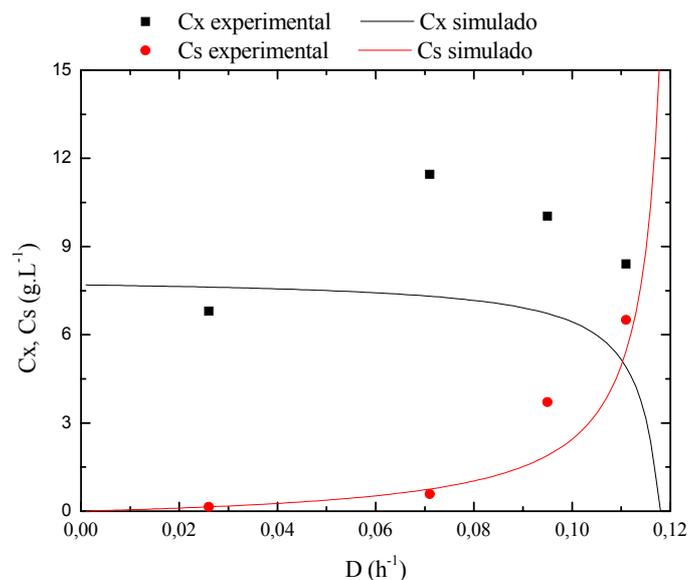


Figura 4-54: Comparação entre os valores experimentais do cultivo C4 com os valores simulados pelo modelo baseado na cinética de Monod

Apesar do bom ajuste, o modelo determina que a uma taxa diluição superior a $0,12 \text{ h}^{-1}$ ocorre à lavagem do reator. Tal fato não condiz com os outros experimentos contínuos sem reciclo celular no qual se operou o reator a taxas de diluição de até $0,20 \text{ h}^{-1}$. Com isso não pôde ser considerado o presente modelo para descrever o processo.

Por esse motivo, optou-se por não utilizar o modelo de Monod para descrever o crescimento do *Streptomyces clavuligerus*.

Cinética de Crescimento de Contois

Foi testado um modelo baseado na cinética de Contois para descrever o processo de crescimento de *Streptomyces clavuligerus*. Para o ajuste do modelo utilizou-se todos os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7. Os valores dos parâmetros μ_{\max} e K_x foram determinados utilizando o software STATISTICA versão 5.1. Após essa tentativa, foi realizado o ajuste do modelo aos valores experimentais dos

mesmos cultivos (C3, C4 e C7) separadamente. Os valores dos parâmetros determinados estão descritos na Tabela 4-16.

Tabela 4-16: Valores dos parâmetros do modelo baseado na cinética de Contois determinados a partir dos cultivos C3, C4 e C7 juntos e separadamente.

| Cultivo | μ_{\max} (h^{-1}) | K_x (g.L^{-1}) |
|-------------|----------------------------------|-----------------------------|
| C3 | 0,193 | 1,377 |
| C4 | 0,111 | 0,046 |
| C7 | 0,174 | 0,376 |
| C3, C4 e C7 | 0,167 | 0,600 |

Considerando que o valor de μ_{\max} tem que ser próximo a $0,2 \text{ h}^{-1}$, maior taxa de diluição no qual o reator foi operado, foram considerados somente os valores dos parâmetros ajustados aos valores experimentais do cultivo C3. O valor de $Y_{X/G}$ utilizado é o mesmo determinado para o modelo de Monod e descrito na Tabela 4-15.

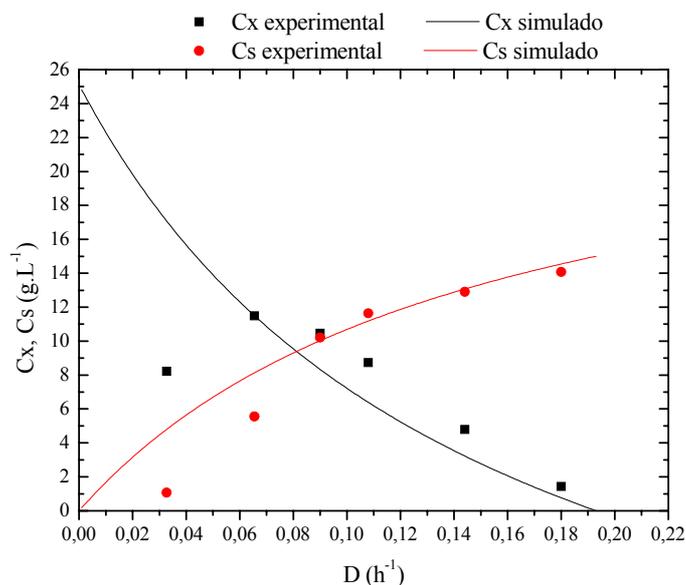


Figura 4-55: Comparação entre os valores experimentais do cultivo C3 com os valores simulados do modelo baseado na cinética de Contois

Tal como observado no gráfico da Figura 4-55, o modelo cinético não apresentou um bom ajuste aos valores experimentais.

O gráfico da Figura 4-56 compara os valores experimentais dos cultivos C4 e C7 com os valores simulados pelo modelo. Tal como se pode observar na Figura 4-56, o modelo de Contois considerando somente um substrato limitante não descreveu de forma satisfatória o processo de crescimento do *Streptomyces clavuligerus*.

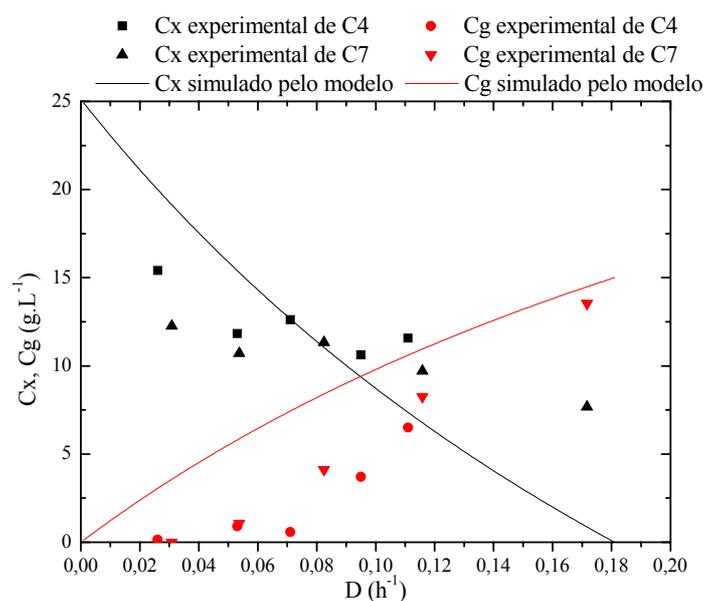


Figura 4-56: Comparação dos valores simulados pelo modelo de Contois com os valores experimentais de C4 e C7

Observa-se claramente, que apesar do modelo de Contois não apresentar um bom ajuste, este apresentou um melhor ajuste que o modelo baseado na cinética de Monod; considerando somente um substrato limitante. Por esse motivo, o modelo proposto neste trabalho, considerando dois substratos limitantes, baseou-se na cinética de Contois.

Devido aos ajustes não terem sido satisfatório, observou-se que além do glicerol há algum outro substrato que está influenciando na velocidade de crescimento do

microrganismo. Observando-se a composição do meio de cultura utilizado nos cultivos, considerou-se que o outro substrato para esse fim seria derivado do Samprosoy 90 NB.

Para a elaboração do modelo foi introduzida no trabalho a análise de nitrogênio e assim tentar elaborar o modelo fenomenológico para descrever o processo de crescimento do microrganismo.

B. Modelo Considerando dois Substratos

Foi proposto como modelo de crescimento a cinética de Contois no modelo, considerando-se dois substratos limitantes e independentes para descrever a velocidade de crescimento do microrganismo, segundo a equação 3-25.

A Tabela 4-17 mostra os valores dos parâmetros obtidos através do ajuste do modelo proposto aos valores experimentais dos experimentos C3, C4 e C7 juntos e separadamente.

Tabela 4-17: Valores dos parâmetros do modelo proposto ajustado aos valores experimentais de C3, C4 e C7 juntos e separadamente.

| Parâmetros | C3 | C4 | C7 | C3, C4 e C7 |
|--|-------|-------|---------------|---------------|
| $\mu_{\max 1} (\text{h}^{-1})$ | 0,150 | 0,129 | 0,119 | 0,112 |
| $\mu_{\max 2} (\text{h}^{-1})$ | 0,051 | 0,265 | 0,363 | 0,103 |
| $K_{X1} (\text{g}_g \cdot \text{g}_x^{-1})$ | 2,000 | 0,983 | 0,494 | 0,210 |
| $K_{X2} (\text{g}_N \cdot \text{g}_x^{-1})$ | 0,143 | 0,427 | 0,826 | 0,869 |
| $\eta_1 (\text{g}_g \cdot \text{g}_x^{-1})$ | 0,374 | 0,874 | -0,459 | -0,199 |
| $\eta_2 (\text{g}_N \cdot \text{g}_x^{-1})$ | 0,203 | 0,137 | 0,274 | 0,502 |
| $m (\text{g}_g \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$ | 0,049 | 0,049 | 0,078 | 0,068 |

Através dos valores mostrados pela Tabela 4-17, exclui-se os valores dos parâmetros que ajustou o modelo aos valores experimentais dos cultivos C7 e de todos os valores experimentais dos cultivos C3, C4 e C7 por apresentar valores de parâmetros negativo (η_1).

Os gráficos das Figuras 4-57 e 4-58 compara os valores simulados pelo modelo e os obtidos nos cultivos C4 e C3, respectivamente.

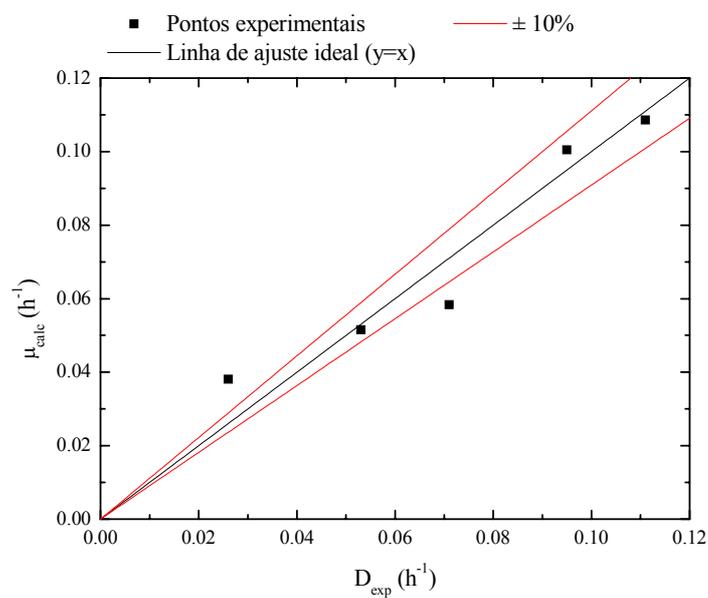


Figura 4-57 Comparação entre os valores obtidos de taxa de diluição (D) no experimento C4 e os valores de μ_{calc} , calculados pela equação 3-25.

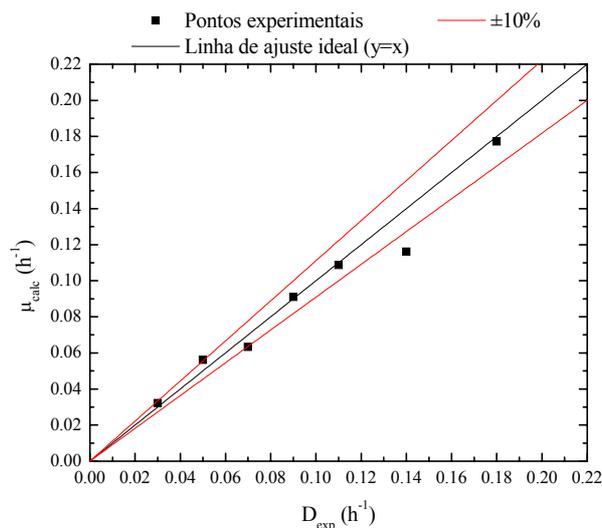


Figura 4-58: Comparação entre os valores de taxa de diluição (D) obtidos no experimento C3 e os valores de μ_{calc} , calculados pela equação 3-25.

Pelo gráfico da Figura 4-57, observa-se que o modelo não se ajustou muito bem aos valores experimentais e por isso optou-se por não utilizar esse conjunto de valores experimentais no ajuste do modelo. Tal fato pode ser confirmado através do gráfico da Figura 4-59 no qual se observa o péssimo ajuste do modelo aos valores experimentais da concentração de glicérol do cultivo C4.

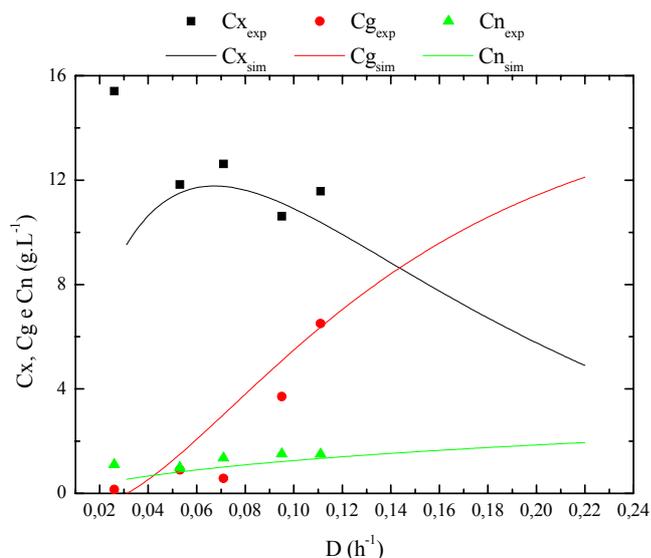


Figura 4-59: Comparação entre os valores experimentais do cultivo C4 com os valores simulados pelo modelo ajustado a esse cultivo

Após a determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento do microrganismo e de consumo dos substratos foram determinados os valores dos parâmetros do modelo de produção de ácido clavulânico. O gráfico da Figura 4-60 mostra o bom ajuste do modelo fenomenológico proposto.

Quanto ao modelo de produção de ácido clavulânico, cabe ressaltar que o modelo proposto por Baptista-Neto (2000) considera uma repressão pelo glicerol, o que não é evidenciado através dos resultados do experimento C3. A hipótese de repressão pelo substrato considerada por Baptista-Neto (2000) pode não ser correta e também não foi detectada no presente trabalho.

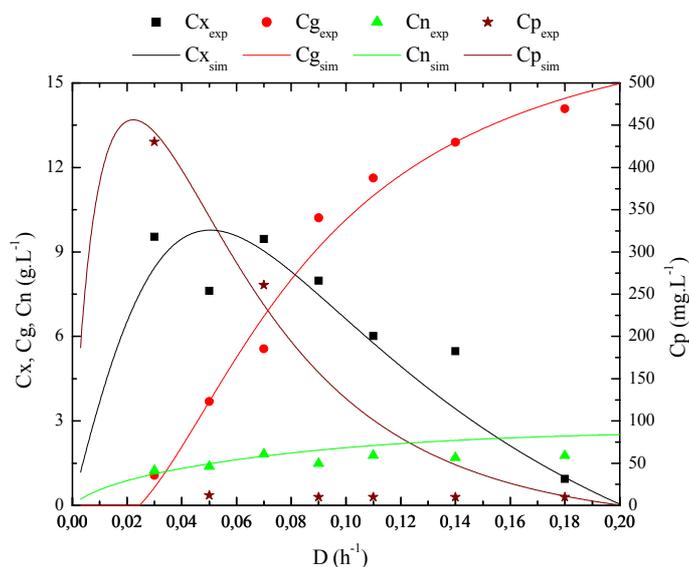


Figura 4-60: Comparação entre os valores experimentais do experimento C3 e os valores simulados pelo modelo proposto

A Tabela 4-17 mostra os valores dos parâmetros obtidos a partir dos pontos experimentais do experimento C3. Pelos parâmetros determinados, observou-se que se somando os dois valores da velocidade máxima específica de crescimento obtido pelo modelo proposto ($\mu_{m\acute{a}x1} + \mu_{m\acute{a}x2} = 0,201 \text{ h}^{-1}$) é um valor bem próximo ao obtido por Baptista-Neto (2000) em cultivos em batelada ($\mu_{m\acute{a}x} = 0,207 \text{ h}^{-1}$). Tal fato indica que a hipótese de limitação simultânea e independente por dois substratos no modelo proposto

é bem coerente, já que os valores dos parâmetros foram obtidos através de modelos e metodologias de ajustes de parâmetros diferentes.

Cabe salientar que os valores de η_1 e η_2 não estão relacionados aos coeficientes de rendimento de glicerol a células e o de rendimento de nitrogênio a células. Esses valores relacionam a velocidade de consumo de cada um dos substratos com a velocidade de crescimento celular. Os valores de $Y_{X/G}$ e de $Y_{X/N}$ foram calculados pela equação 3-24 como sendo $0,402\text{g}_x.\text{g}_g^{-1}$ e $4,69\text{g}_x.\text{g}_n^{-1}$, respectivamente. O alto valor de $Y_{X/N}$ deve-se ao fato de se ter utilizado somente valores de concentração de nitrogênio e não os valores de concentrações de peptídeos ou de aminoácidos. Quanto ao valor de $Y_{G/X}$, observa-se um valor pouco inferior ao obtido em literatura (Baptista-Neto, 2000).

Os valores dos parâmetros β e k_{dp} do modelo de produção de ácido clavulânico foram $2,27\text{mg}_p.\text{g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,017\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Pelo gráfico da Figura 4-61, observa-se que o modelo não simulou bem os valores experimentais dos experimentos C4 e C7.

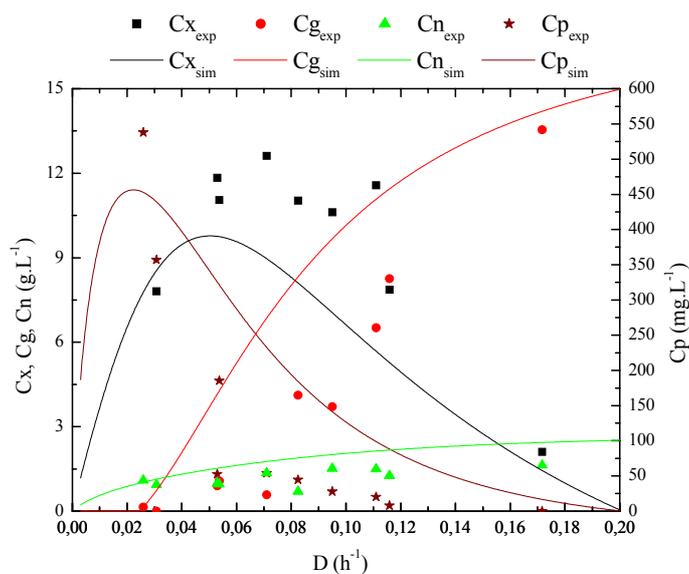


Figura 4-61: Comparação entre os valores experimentais dos experimentos C4 e C7 e os valores simulados pelo modelo proposto

Inicialmente deve-se considerar que o meio de cultura utilizado apresenta sólidos em suspensão devido à presença de Samprosoy 90NB, que não é solúvel. Desta forma, a determinação da concentração celular torna-se mais imprecisa.

Também se deve considerar a dificuldade de se manter o meio de cultura de alimentação homogêneo. Apesar de manter o meio de cultura em agitação constante, a dificuldade em manter homogênea um grande volume de meio de cultura (cerca de 13 L), quantidade necessária para a obtenção de um valor no estado estacionário, deve ser considerada. Com isso a concentração de nitrogênio no meio de alimentação pode variar ao decorrer do cultivo.

Cabe salientar que a análise de nitrogênio determina somente nitrogênio orgânico de substâncias solúveis e, portanto, uma quantidade de nitrogênio orgânico de substâncias insolúveis não é determinada. Por esse motivo há um certo erro na determinação da concentração de nitrogênio, principalmente quando se opera o reator a baixos tempos de residência, alta taxa de diluição, em que a concentração de substâncias insolúveis na saída do reator é maior.

Quanto ao modelo proposto para descrever a produção de ácido clavulânico, salienta-se que a produção de ácido clavulânico é muito sensível à concentração de nitrogênio e a não homogeneidade do meio de alimentação pode ser um fator a ser considerado para explicar o ajuste ruim do modelo aos valores experimentais.

Ainda que, ao contrário do que foi obtido por Baptista-Neto *et al.* (2000), um modelo baseado na cinética de Monod não apresentou um bom ajuste aos valores experimentais. Com isso, um modelo mais complexo que necessita de valores precisos de concentrações celulares bem como de concentrações de nitrogênio foi proposto.

Para uma boa determinação dos parâmetros da cinética de crescimento celular e de consumo de substrato através de cultivos contínuos sem reciclo celular, seria

conveniente a utilização de meios solúveis para evitar os problemas encontrados nesse trabalho.

C. Modelagem Cinética do Processo Contínuo com Reciclo Celular

O modelo cinético proposto para o processo contínuo sem reciclo celular foi aplicado ao processo contínuo com reciclo celular. Simulações das equações de balanço material foram realizadas, em que se utilizou os valores dos parâmetros cinéticos obtidos.

A Tabela 4-18 mostra os valores simulados pelo modelo proposto.

Tabela 4-18: Valores das concentrações de células (C_x), glicerol (C_g) e de produto (C_p) e das produtividades em ácido clavulânico (P_{ac}) e específicas ($P_{e_{ac}}$) simulados pelo modelo

| Cultivo | θ_h (h) | θ_c (h) | C_x ($g.L^{-1}$) | C_g ($g.L^{-1}$) | C_p ($mg.L^{-1}$) | P_{ac} ($mg.L^{-1}.h^{-1}$) | P_e ($mg.g^{-1}.h^{-1}$) |
|---------|----------------|----------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| CR1 | 11,8 | 28 | 17,31 | 3,84 | 386 | 32,71 | 1,89 |
| | | 20 | 13,57 | 5,61 | 303 | 25,68 | 1,89 |
| | | 15 | 10,44 | 7,19 | 233 | 19,75 | 1,89 |
| CR3 | 10,8 | 22 | 15,38 | 5,46 | 319 | 29,57 | 1,92 |
| | | 18 | 12,98 | 6,55 | 267 | 24,72 | 1,90 |
| CR5 | 18 | 36 | 14,61 | 1,43 | 457 | 25,39 | 1,74 |
| CR6 | 23 | 36 | 11,54 | 3,35 | 361 | 15,70 | 1,36 |

Comparando os valores experimentais descritos na Tabela 4-11 com os simulados pelo modelo, pode-se constatar que o modelo subestimou a concentração celular e superestimou a concentração de produto. Tal fato pode ser atribuído à taxa de manutenção que no modelo apresenta um valor relativamente elevado.

Quanto aos valores de produção, tal como observados nas Tabelas 4-10, 4-11 e 4-17, constata-se que o modelo também não foi capaz de descrever os valores de concentrações celulares e conseqüentemente os valores de produtividades em ácido clavulânico e específica. O valor simulado pelo modelo foi superior ao obtido nos

experimentos, possivelmente devido à produção de um metabólito que iniba a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.

Os gráficos das Figuras 4-62 e 4-63 apresentam os valores simulados de concentração de produto e de produtividade em ácido clavulânico com os tempos de residência hidráulico e celular.

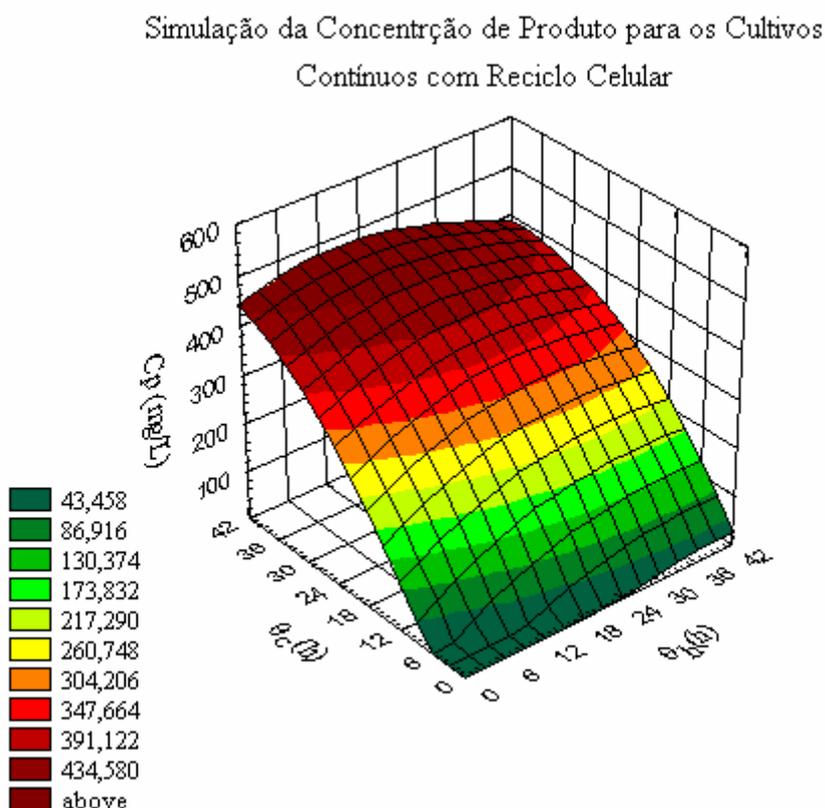


Figura 4-62: Variação da concentração de produto (C_p) com os tempos de residência hidráulico (θ_h) e celular (θ_c) simulados para os cultivos contínuos com reciclo celular

Os valores simulados pelo modelo, descritos pelo gráfico da Figura 4-63, mostram que quanto maior o tempo de residência celular (θ_c) maior a concentração de ácido clavulânico. Quanto ao tempo de residência hidráulico (θ_h), o modelo aponta para um máximo de concentração de produto quando se opera o reator com tempo de residência hidráulico em torno de 12 horas. Como visto na Tabela 4-14, o máximo é

obtido quando se opera com o tempo de residência hidráulico (θ_h) entre 6 e 18 horas e o maior valor experimental foi obtido quando se operou o sistema num tempo de residência hidráulico (θ_h) de 23 horas. Com isso, o modelo somente foi capaz de detectar a tendência mas não determinar o melhor valor.

Quanto à produtividade em ácido clavulânico, o gráfico da Figura 4-63 mostra que a maior produtividade ocorre quando se opera o reator com alto tempo de residência celular (θ_c) e um baixo tempo de residência hidráulico (θ_h). Tal fato não foi observado pelos valores experimentais obtidos, observado na Figura 4-49.

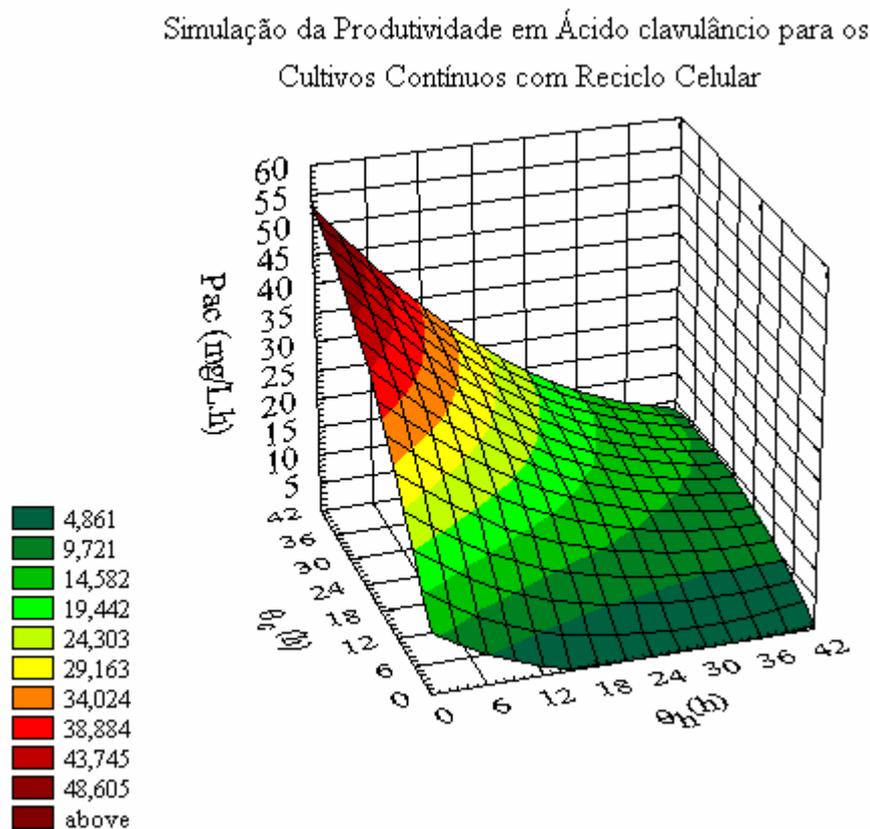


Figura 4-63: Variação da produtividade em ácido clavulânico (P_{ac}) com os tempos de residência hidráulico (θ_h) e celular (θ_c) simulados para os cultivos contínuos com reciclo celular

Tal como observado, o modelo cinético obtido não foi capaz de simular o processo com alta concentração celular. A cinética de crescimento celular necessita de um termo que considera a alta concentração celular para o ajuste do modelo aos valores

experimentais. Quando a concentração de ácido clavulânico, há a necessidade de considerar a inibição de algum produto oriundo do metabolismo do microrganismo e que o modelo descrito não considera.

4.4.2. Correlação entre os Parâmetros Reológicos e Concentração Celular

Os gráficos das Figuras 4-64 e 4-65 mostram os valores das características reológicas dos cultivos contínuos sem e com reciclo celular bem como o ajuste dos modelos descritos em literatura (Goudar *et al.*, 1999).

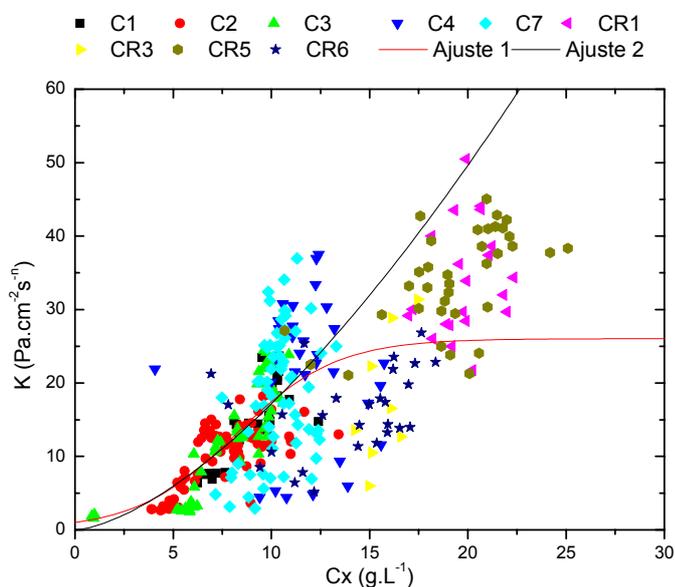


Figura 4-64: Valores do parâmetro reológico K com a concentração celular e o ajustes do modelo da lei da potência (eq. 2-21, ajuste 1) e da correlação proposta por Goudar *et al.* (1999) (eq. 2-22, ajuste 2) para todos os ensaios contínuos

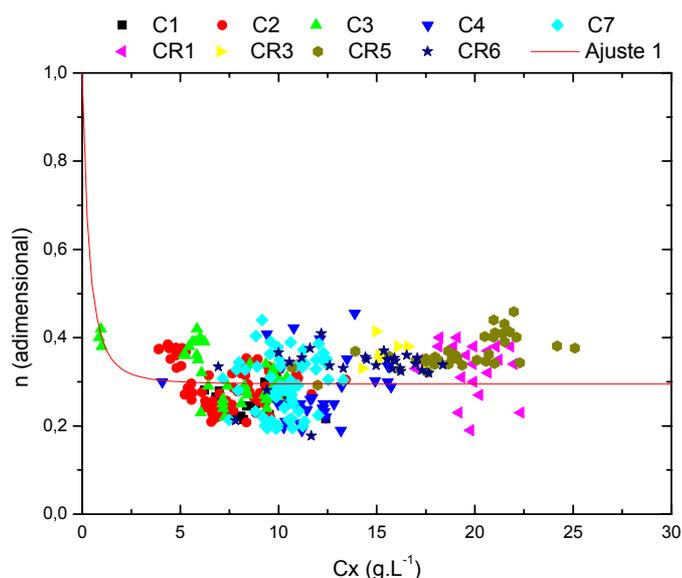


Figura 4-65: Valores do parâmetro reológico (n) com a concentração celular (C_x) e o ajuste da equação da logística (eq. 2-23, ajuste 1) descrita por Goudar *et al.* (1999) para todos os ensaios contínuos

Tal como se pode observar pelo gráfico da Figura 4-64, os valores de K nos cultivos contínuos com reciclo celular foram de cerca de 2 vezes superiores aos valores encontrados nos cultivos contínuos sem reciclo de células.

Também cabe ressaltar que concentrações celulares também foram 2 vezes superiores nos cultivos contínuos com reciclo celular o que explica os maiores valores de K encontrados nesses cultivos. Tal fato é muito importante, pois os valores de K também estão relacionados à vitalidade celular indicando, dessa maneira, que o processo bem como o aumento na concentração não está influenciando na estabilidade celular.

Tentou-se ajustar o modelo da lei da potência (eq 2-19) e a equação proposta por Goudar *et al.* (1999) aos valores experimentais obtidos. Tal como pode ser observado pelo gráfico da Figura 4-64, ambas as equações descrevem razoavelmente o comportamento do parâmetro K com a concentração celular sendo ambas aconselhadas

para a estimativa de K a partir da concentração celular (Cx), ou vice versa, dentro da faixa estudada.

Quanto aos valores do parâmetro reológico n, os valores se mantiveram na faixa de 0,20 a 0,40. Tal como visto no gráfico da Figura 4-65, a equação da logística proposta por Cross *et al.* (1965 apud Goudar *et al.*, 1999) mostrou-se eficiente para correlacionar n com a concentração celular.

Cabe ressaltar que não foram consideradas nas correlações utilizadas, as vitalidades celulares bem como as morfologias do microrganismo. Como propoem alguns trabalhos como o Rilley *et al.* (2000).

Os valores dos parâmetros das equações 2-21, 2-22 e 2-23 ajustados aos valores experimentais estão descritos na Tabela 4-19.

Tabela 4-19: Valores dos parâmetros das correlações entre os valores dos parâmetros reológicos K e n com os valores de concentração celular.

| Número da Equação | Parâmetro | Valor |
|-------------------|--|--------|
| 2-21 | p_1 (dina.s ⁿ .cm ⁻² .L ^{p2} .g ^{p2}) | 0,505 |
| | p_2 (adimensional) | 1,531 |
| 2-22 | K_O (dina.s ⁿ .cm ⁻²) | 1,010 |
| | K_F (adimensional) | 26,037 |
| | c (L.g ⁻¹) | 0,392 |
| 2-23 | n_f (adimensional) | 0,294 |
| | d (L.g ⁻¹) | 1,049 |
| | e (adimensional) | 2,656 |

Com os valores dos parâmetros determinados das equações 2-21, 2-22 e 2-23 obtem-se as equações 4-2, 4-3 e 4-4.

$$K = 0,505 \cdot Cx^{1,531} \quad (4-2)$$

$$K = \frac{1,010 \cdot e^{0,392 \cdot Cx}}{1 - \frac{1,010}{26,037} (1 - 1,010 \cdot e^{0,392 \cdot Cx})} \quad (4-3)$$

$$n = 0,294 + \frac{1 - 0,294}{1 + (1,049 \cdot Cx)^{2,656}} \quad (4-4)$$

4.4.3. Resultados de Velocidade de Respiração Específica (R)

Os gráficos das Figuras 4-66, 4-67, 4-68 e 4-69 mostram os valores experimentais da velocidade específica de respiração celular (R) com a taxa de diluição para os experimentos C1 (MP1), C2 (MP2), C3 (MP5) e C4 (MP5), respectivamente.

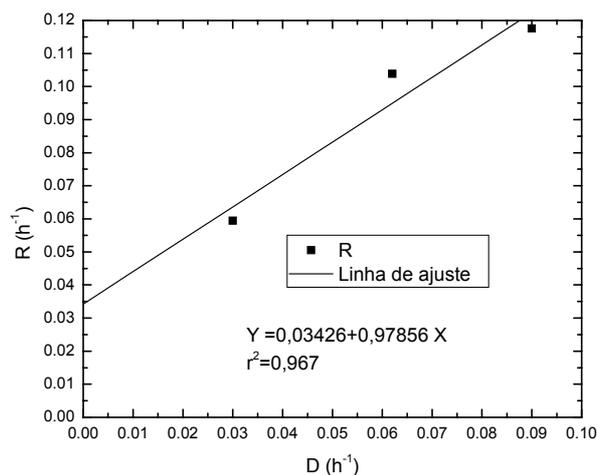


Figura 4-66: Valores experimentais da velocidade específica de consumo de oxigênio (R) com a taxa de diluição (D) para a determinação dos parâmetros de respiração do experimento C1 (MP1)

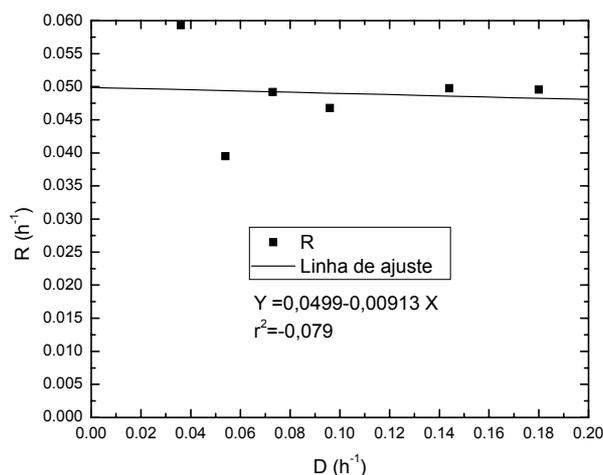


Figura 4-67: Valores experimentais da velocidade específica de consumo de oxigênio (R) com a taxa de diluição (D) para a determinação dos parâmetros de respiração do experimento C2 (MP2)

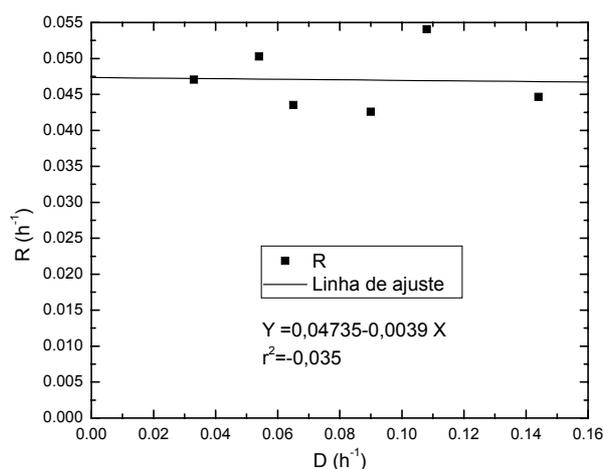


Figura 4-68: Valores experimentais da velocidade específica de consumo de oxigênio (R) com a taxa de diluição (D) para a determinação dos parâmetros de respiração do experimento C3 (MP5)

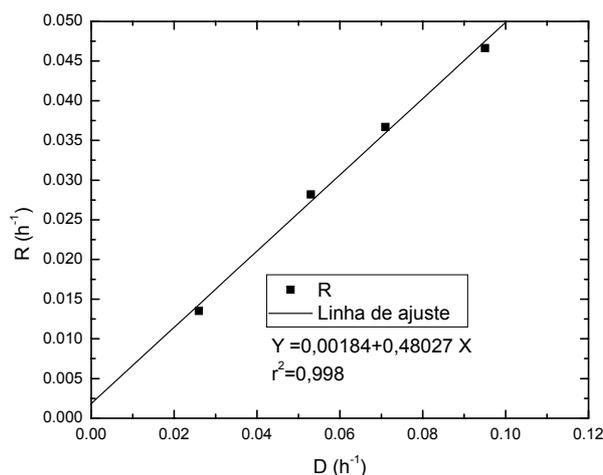


Figura 4-69: Valores experimentais da velocidade específica de consumo de oxigênio (R) com a taxa de diluição (D) para a determinação dos parâmetros de respiração do experimento C4 (MP5)

Os valores experimentais dos experimentos C2 e C3 foram ruins e por isso não foi possível a determinação dos parâmetros de respiração desses dois experimentos. Quanto aos experimentos C1 (MP1) e C4 (MP5) os ajustes foram bons, obtendo-se os valores dos parâmetros descritos na Tabela 4-20.

Tabela 4-20: Valores dos parâmetros de respiração celular dos experimentos C1 e C4

| Parâmetro | Experimento C1 (MP1) | Experimento C4 (MP5) |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|
| $Y_{x/o}$ (g.g ⁻¹) | 1,021 | 2,08 |
| m_o (h ⁻¹) | 0,03426 | 0,00184 |

Observa-se pelos valores da Tabela 4-20 que a constante de manutenção (m_o) obtida no experimento C1(MP1) foi cerca de 20 vezes maior que a obtido no experimento C4 (MP5). Também se observou que o coeficiente rendimento de oxigênio a células ($Y_{x/o}$) foi maior no experimento C4, o que indica que uma maior quantidade de oxigênio para formar 1 g de células no experimento C1. Nesse caso, pode-se afirmar que o extrato de malte está influenciando significativamente a velocidade de consumo de oxigênio.

4.4.4. Correlação para a Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La})

O gráfico da Figura 4-70 mostra a variação dos valores de k_{La} com a viscosidade aparente (μ_{ap}), bem como o ajuste da correlação proposta, descrita pela equação 3-34, aos pontos experimentais.

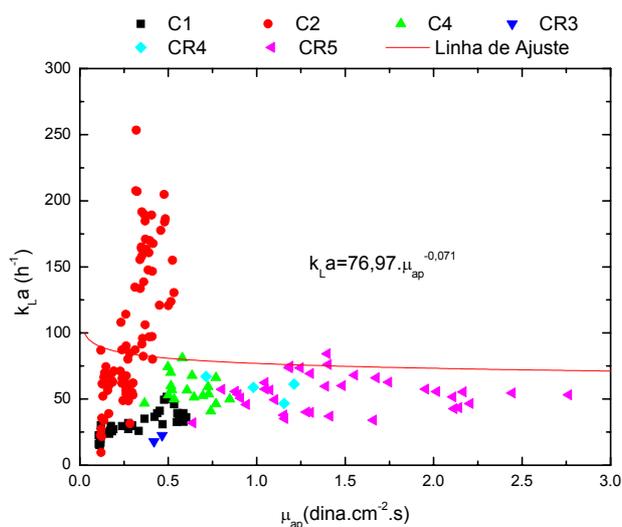


Figura 4-70: Valores de k_{La} em função da com a viscosidade aparente (μ_{ap}) para os cultivos realizados

Os valores das constantes α_1 e β_1 obtidos para a correlação proposta (equação 3-34) foram 76,97 e 0,071 respectivamente. Tal correlação é útil para prever valores de k_{La} em cultivos de *Streptomyces clavuligerus*.

Tal como pode-se observar pelo gráfico da Figura 4-70, os valores de k_{La} não apresentaram diferenças significativas apesar dos maiores valores de viscosidade aparente obtidos nos cultivos contínuos com reciclo celular.

Com os valores de k_{La} obtidos, pode-se concluir que não houve problemas de transferência de oxigênio durante os cultivos contínuos com reciclo celular.

5. Conclusões

Um problema encontrado no presente trabalho que deve ser destacado foi na determinação de um valor preciso de concentração celular em meios contendo sólidos em suspensão. Cabe salientar que o Samprosoy 90 NB é solubilizado no decorrer do cultivo o que impossibilita descontar o valor resultante de massa seca obtida durante um cultivo, de um valor inicial.

Com o objetivo de se obter valores precisos de concentração celular, foram realizados experimentos utilizando meio solúvel para obter valores experimentais de concentração celular, parâmetros reológicos e quantidade de dióxido de carbono formada. A concentração celular foi correlacionada com os valores dos parâmetros reológicos, consumo de glicerol e quantidade de dióxido de carbono formada. Apesar de tudo, as correlações propostas não forneceram valores precisos de concentração celular.

Na comparação dos processos, foi necessário fixar o máximo de fatores possíveis para determinar qual é o melhor processo para a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Um dos fatores fixado foi o valor de pH, que apresentou uma forte influência no crescimento e produção do microrganismo em questão. Com isso conclui que o melhor valor de pH para realizar os cultivos é 6,8.

Também foi realizado no presente trabalho, um estudo do meio de cultivo na produção de ácido clavulânico. Inicialmente foi realizado um estudo sobre a influência de sais no meio de cultivo em mesa incubadora rotativa. Porém os valores obtidos podem ter sido equivocados, pois quando se realizaram experimentos em fermentador, o resultado obtido em “shaker” não foi confirmado. Tal fato pode ser atribuído na incapacidade de se controlar o pH em mesa incubadora rotativa e o tampão MOPS permitir uma variação em seu valor que influa na velocidade de produção. Por essa

razão, optou-se por realizar experimentos em fermentador para determinar as melhores concentrações de extrato de malte e de Samprosoy 90 NB no meio de cultivo.

Os cultivos em fermentador confirmaram que quanto maior a concentração de Samprosoy 90 NB, maior a velocidade de produção de ácido clavulânico. Também foi observado, nos mesmos experimentos, que o período em que o microrganismo mantém a sua produção diminui com o aumento da concentração da fonte de nitrogênio. Considerando esses fatos optou-se por utilizar um meio de cultivo contendo 20 g.L⁻¹ de Samprosoy 90 NB.

Também foi verificado que o extrato de malte exerce uma influência negativa na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Foi observado, nos experimentos realizados para estudar a influência do pH no meio de cultivo, bem como no experimento C1, que o extrato de malte foi consumido simultaneamente ao glicerol. Comportamento semelhante foi descrito por Peacock *et al.* (2003) em que se observou o consumo de óleo juntamente com glicose em cultivos de *Streptomyces lividans*.

Em relação ao glicerol, não foi possível detectar um efeito de inibição por esse substrato na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.

Quanto à manutenção do microrganismo, notou-se que a liofilização de células vegetativas é uma boa alternativa na manutenção da linhagem de *Streptomyces clavuligerus* por um longo período de tempo. A conservação do microrganismo em criotubos, células vegetativas suspensas em uma solução crioprotetora (glicerol 10% m/v) a -70°C para a realização do trabalho, mostrou-se bem prática e eficiente, porém a perda da capacidade produtora de alguns lotes de criotubos após cerca de 6 meses de sua preparação é um fato que deve ser considerado e observado.

O modelo proposto apresentou um ajuste razoável aos valores experimentais de somente um dos três experimentos contínuos. Cabe salientar que a dificuldade de se

obter bons valores da concentração celular bem como manter a homogeneidade do meio de alimentação pode explicar a dificuldade de ajustar o modelo aos valores experimentais. Apesar de tudo, o modelo mostrou-se capaz de simular o crescimento do *Streptomyces clavuligerus* bem como a sua produção.

O modelo proposto não se ajustou aos valores experimentais obtidos nos cultivos contínuos com reciclo celular. Uma maior concentração celular e a inibição da produção de ácido clavulânico por algum produto oriundo do metabolismo do microrganismo deveria ter sido considerados no modelo cinético.

Quanto aos parâmetros reológicos do caldo de cultivo, o modelo da lei da potência (2-21) e a equação da logística (2-22) proposta por Goudar *et al.* (1999) mostraram-se satisfatórios para determinar os valores de K a partir da concentração celular. A equação de Cross *et al.* (1965 apud Goudar *et al.*, 1999) também se mostrou satisfatória para determinar os valores de n a partir da concentração de células. Cabe salientar que, para correlacionar a concentração celular com os valores de K e n , foram utilizados todos os valores experimentais dos cultivos contínuos e, por isso, erros na determinação da concentração celular, características morfológicas do microrganismo e a vitalidade celular não foram consideradas, o que pode explicar as dispersões existentes dos valores experimentais.

Apesar de se operar o sistema com concentrações celulares mais elevadas, os valores de k_{La} não apresentaram grandes variações, indicando que não há uma diminuição significativa na transferência de oxigênio após um determinado valor de μ_{ap} . Também foi determinado, com os valores dos experimentos contínuos, uma correlação entre a viscosidade aparente com o valor de k_{La} .

Para a realização dos cultivos contínuos com reciclo celular, optou-se por separar as células através de um módulo de microfiltração. A utilização da

sedimentação para a separação celular necessitaria de um tempo muito elevado e a utilização do filtro centrífuga não apresentou bons resultados e um estudo mais detalhado desse equipamento seria necessário. Quanto ao processo de microfiltração, a sua facilidade de operação, baixo tempo para separar as células e, principalmente, a obtenção de um caldo permeado límpido foram decisivos na sua escolha para a separação celular.

Os experimentos contínuos, de um modo geral, apresentaram uma maior produtividade em ácido clavulânico quando comparado com os cultivos em batelada. Quanto à produtividade específica, o processo contínuo com reciclo celular apresentou um menor valor quando comparado com o processo contínuo sem reciclo e o processo em batelada. Inicialmente, pode-se supor que o processo de separação celular pode estar influenciando a produtividade específica devido ao seu modo de operação, que pode provocar perda de viabilidade celular.

Por fim, foi observada uma maior concentração de produto bem como uma maior produtividade nos cultivos contínuos com reciclo celular. Tal fato sugere que processos contínuos com reciclo celular podem ser uma alternativa promissora no aumento da produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.

6. Sugestões

Para trabalhos futuros sugere-se:

- 1) Realização de cultivos contínuos sem reciclo celular utilizando meios solúveis para a determinação do modelo cinético de crescimento do microrganismo.
- 2) Estudar a estratégia de controle de pH para maximizar a produção de ácido clavulânico.
- 3) Identificação de supostos produtos que influam na velocidade global de produção de ácido clavulânico.
- 4) Utilização de técnicas de análise de imagens para acompanhar a morfologia bem como a estabilidade celular em cultivos contínuos com reciclo celular
- 5) Estudar técnicas alternativas para a separação celular tal como a utilização do “Filtro centrífuga” e de hidrociclone para a separação celular.
- 6) Estudo mais detalhado sobre a composição do meio de cultivo para ser utilizado na alimentação do reator bem como no processo em batelada.
- 7) Implementação de um sistema de controle do nível do reator bem como as vazões de entrada de meio e de retirada de caldo de cultivo.
- 8) Estudo para a identificação de um suposto composto que possa influir negativamente na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.
- 9) Estudo de processo com 2 biorreatores, sendo o segundo com reciclo celular com segundo biorreator; o primeiro promoveria o crescimento celular e o segundo a produção de ácido clavulânico.

7. Referências Bibliográficas

ABRAHAM, E. C.; CHAIN, E.; Nature, v.146, p. 837, 1940

ALBÆK, T.; REESLEV, N.; JESSEN, B.; ERIKSEN, S. H.; Acid protease and formation of multiple forms of glucoseamylase in batch and continuous cultures of *Aspergillus niger*, Enzyme and Microbial Technology, v. 30, p. 410-415, 2002.

ALEKSIEVA, P.; PEEVA, L.; Investigation of acid proinase biosynthesis by th fungus *Humicola lutea* 120-5 in airlift bioreactor, Enzyme and Microbial Technology , v. 26, p. 402-405, 2000.

ALEXANDER, M., Introduction to soil microbiology, 2^a edição ,New York, John Wiley & Sons, 1977, 467p.

ARAÚJO, M.L.G.C.; GIORDANO, R.C. AND HOKKA, C.O., Comparative studies on cephalosporin C production process with free and immobilised cells of *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, Chemical Engineering Science, v.51, 2835-2840, 1996.

ARAÚJO, M. L. G. C.; Estudo cinético do processo de produção de cefalosporinas C com células livres e imobilizadas de *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, 1996, Tese (Doutorado), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.

BADINO JR, A. C.; BARBOSA, M.; BELLUZZO, R. P.; HOKKA, C. O., Caracteriação reológica e verificação da influência da massa celular na reologia de caldos de fermentação com *Penicillium chrysogenum* e *Cephalosporium acremonium*. Revista Brasileira de Engenharia, v.11, n. 1, p43-60, 1994.

BADINO JR, ALBERTO C., Reologia, Consumo de Potência e Transferência de Oxigênio em cultivo descontínuo de *Aspergillus awamri* NRRL 3112, 1997, 182p., Tese (Doutorado), Departamento de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

BADINO JR, ALBERTO, FACCIOTTI, M. C. R.; SCMIDELL, W.; Volumetric oxygen transfer coefficients (k_La) in batch cultivations involvinmg non-Newtonian broths, Biochemical Engineering Journal, v.8, p111-119, 2000.

BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J., Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and another clavans, Natural Product Report, v.14, nº 4 , p.309-333, 1997.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F., Biochemical Engineering Fundamentals. 2^a edição, New York: McGraw-Hill, 1986.

BAAL, P.; GEDDES, A.; ROLINSON, G.; Amoxycillin clavuanate: an assessment after 15 years of clinical application, Journal of Chemotherapy, v. 9, p.167-198, 1997

BALLOWS, A.; The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, v. 1, 2^a edição, New York, Springer-Verlag, 1992

BAPTISTA-NETO, A.; Estudos cinéticos e reológicos do processo descontínuo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, 2000, 156p., Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.

BAPTISTA-NETO, A.; GOUVEIA, E.R.; BADINO-JR, A. C.; HOKKA, C. O.; Phenomenological Model of the Clavulanic Acid Production process utilizing *Streptomyces clavuligerus*, Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 17, nº 04-07, p. 809-818, 2000.

BELMAR-BEINY, M. T; THOMAS, C. R., Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: Effect of stirrer speed in batch fermentation, Biotechnology and Bioengineering, v.37, p456-462, 1991.

BERG, A. C.; HOLST, O.; MATTIASSON, B.; Continuous culture with complete cell recycle: Cultivation of *Pseudomonas cepacia* ATCC 29351 os salicylate for production of salicylate hydrosylase, Applied Microbiology and Biotechnology, v. 30, p. 1-4, 1989.

BERGTER, F.; RIESENBERG, D.; Morphological and biochemical Properties of *Streptomyces hygroscopicus* grown in chemostat, Folia Microbiologica, v. 27, p.303-307, 1982.

BERSANETTI, P. A.; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O.; ARAÚJO, M. L. G. C.; Estudo cinético de hidrólise do ácido clavulânico, In: XIII SINAFERM, 2000, Teresópolis-RJ, anais do XII SINAFERM, 39.1-39.6, 2000.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S.; Biochemical Engineering, New York, Marcel Dekker, 1997.

BRAÑA, A. F.; HU, S-S; DEMAIN, A. L., Involvement of aeration in carbon source regulation of cephem antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, Biotechnology Letters, v.5, n. 12, p791-794, 1983.

BRASS, J. M., HOEKS, F. W. J. M. M.; ROHNER, M., Applications of modelling techniques for the improvement of industrial bioprocess, Journal of Biotechnology, v.59, p.63-72, 1997.

BRIGIDI, P.; GONZÁLES-VARA, A. R.; ROSSI, M.; MATTEUZZI, A.; Study of stability of recombinant plasmids during the continuous culture of *Bacillus stearothermophilus* NUB3621 in nonselective medium; Biotechnology and Bioengineering, v. 52, n. 5, p. 507-514; 1997.

BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J. D.; READING, C.; ROINSON, G. N., Naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity, The Journal of Antibiotics, v.29, n.6, p.668-669, 1976.

BUSH, K., Antimicrob. Agents Chemother, v.33, p.259-271, 1989.

BUTTERWORTH, D., Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: Vandamme, E.J., Biotechnology of Industrial Antibiotics, New York, Marcel Dekker, v.22, p.225-235, 1984.

BUTTNER, P. R.; BROWN, M.; OLIVER, S. G.; Improvement of antibiotic titers from *Streptomyces* bacteria by interactive continuous selection; Biotechnology and Bioengineering, v. 49, p.185-196. 1996.

CÁNOVAS, M.; MAIQUEZ, J.; DE DIEGO, T.; BUENDÍA, B.; ESPINOSA, G.; IBORRA, J. L.; Membrane cell retention systems for continuous production of L-carnitine using *Proteus sp.*, Journal of Membrane Science, v. 214, p. 101-111, 2003.

CHANG, HO NAM, YOO, IK-KEUN; KIM, B. S.; High Density Cell Culture By Membrane-Based cell Recycle, Biotechnology advances, v.12, p.467-487, 1994.

CHEN, C. W.; The unstable ends of *Streptomyces* linear chromosomes: a nuisance without cures?, Trends in Biotechnology, v. 13, nº 5, p. 157-160, 1999.

CHU, W-B. Z.; Constantinides, A., Modelling, optimisation, and computer control of the cephalosporin C fermentation process, Biotechnology and Bioengineering, v.32, p.277-288, 1988.

COLLET, C.; ADLER, N.; SCHWITZGUÉBEL, J. P.; PÉRINGER, P.; Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose, International Journal of Hydrogen Energy, v. 29, p. 1479-1485, 2004.

COLOMBAN, A.; ROGER, L., BOYAVAL, P.; Production of propionic acid of whey permeate by sequential fermentation, ultrafiltration, and cell recycling, Biotechnology and Bioengineering, c. 42, 1091-1098, 1993.

CRAIG, W. A.; Introduction Respir. Med., 2001, 95 (suppl A): S2-4.

CROSS, M. M.; Rheology of non-Newtonian fluids: a new flow equation for pseudoplastic fluids, J. Colloid Sci, v.20, p. 417-437, 1965.

CROWLEY; PATRICK J.; Pharmaceutical compositions, número da patente USpto 4,441,609, 1984.

CRUZ, A. J., SILVA, A. S., ARAUJO, M. L. G. C., GIORDANO, R. C.; HOKKA, C. O., Modeling and optimization of cephalosporin C production bioprocess in a fed-batch bioreactor with invert sugar as substrate, Chemical Engineering Science, v.54, p.3137, 1999.

DEFRANCE, L.; JAFFRIN, M. Y.; GUPTA, B.; PAULLIER, P.; GEUGEY, V.; Contribution of various constituents of activated sludge to membrane bioreactor fouling, Bioresource Technology, v.73, p.105-112, 2000.

DEMIRTAS, M. U.; KOLHATKAR, ARATI; KILBANE, J. J.; Effect of aeration and agitation on growth rate of *Thermus thermophilus* in batch mode, Journal of Bioscience and Bioengineering, V. 95, n. 2, p. 119-117, 2003.

ELSON, S. W.; OLIVER, R. S.; BYCROFT, B. W.; FARUK, E. A.; Studies on the biosynthesis of clavulanic acid III- Incorporation of DL-3,4¹³C₂-glutamic acid, Journal of Antibiotic, v. 35, p. 81-86, 1982.

EROSHIN, V. K.; SATROUDINOV, A. D.; DEDYUKHINA, E. G.; CHISTYAKOVA, T. I.; Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* with growth-coupled lipid synthesis, Process Biochemistry, v. 35, p. 1171-1175, 2000.

FANG, A.; DEAMIN; A. L.; Dependence of nitrogen- and phosphorous-regulation of β -lactam antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus* on aeration level, Journal of Industrial Microbiology, v. 15, p. 407-410, 1995.

FAZELI, M. R.; COVE, J. H.; BAUMBERG, S.; Physiological factors affecting streptomycin production by *Streptomyces griseus* ATCC 12475 in batch and continuous culture; FEMS Microbiology Letters; v. 126; p.55-62, 1995.

FAWCETT, P. A.; USHER, J. J.; ABRAHAMS, E. P.; Aspects of cephalosporin and penicillin biosynthesis, Proceedings of Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganism, Academic Press, London: 129-138.

FILE JR, T. M.; JACOBS, M. R.; POOLE, M. D.; WYNNE, B.; Outcome of treatment of respiratory tract infections due to *Streptococcus pneumoniae*, including drug-resistant strains, with pharmacokinetically enhanced amoxicillin/clavulanate; International Journal of Antimicrobial Agents, v. 20, p. 235-247, 2002.

GOUDAR, C. T.; STREVETT, K. A.; SHAH, S. N., Influence of microbial concentration on rheology of non-Newtonian fermentation broths, Applied Microbiology Biotechnology, v.51, p310-315, 1999.

GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA-NETO, A.; AZEVEDO, A. G.; BADINO, A. C.; HOKKA, C.O., Improvement of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in medium containing soybean derivative, World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.15, n^o 5, p.623-627, 1999.

GOUVEIA, E.R., Desenvolvimento do Processo de Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, 2001, 156p., Tese (Doutorado), Departamento de Engenharia Química, Univesidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP

GUDI, R. D.; SHAH, S. L.; GRAY, M. R., Multirate state and parameter estimation in an antibiotic fermentation by delayed measurements, Biotechnology and Bioengineering, v.44, p.1271-1278, 1994.

GUTMAN, A. L.; RIBON, V.; BOLTANSKI, A., Incorporation of β -hydroxypropionate into the β -lactam residue of clavulanic acid, Journal of the Chemical Society, Chemical Communication, N.22 , p.1627-1629, 1985.

HENRIKSEN, C. M.; CHRISTENSEN, L. H.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; Growth energetics and metabolic fluxes in continuous culture of *Penicillium chrysogenum*; Journal of Biotechnology; v. 45, p.149-164, 1996.

HIRATA, D. B.; Produção de Ácido clavulânico em batelada alimentada por *Streptomyces clavuligerus* e extração em sistema de 2 fases aquosas, 2003, 104 p., Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.

HOJO, O.; Estudo sobre a Produção Contínua de Etanol em Sistema com Reciclo Utilizando-se Levedura Flocculante, 1990, 95p., Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.

HOJO, O.; HOKKA, C. O.; SOUTO MAIOR, A. M.; Ethanol production by flocculant yeast strain in CSTR type fermentation with cell recycling; Applies Biotechnology and Biotechnology, v.77-79; p. 535-545; 1999.

HOEKS, F. W. J. M. M.; KULLA, H.; MEYER, H.-P.; Continuous cell recycle process for L-carnitine production: performance, engineering and downstream processing aspects compared with discontinuous processes; Journal of Biotechnology; v. 22; p. 117-128; 1992.

HOLST, O.; HANSSON, L.; BERG, A. C.; MATTIASSON, B.; Continuous culture with complete cell recycle to obtain high cell densities in product inhibited cultures: Cultivation of *Streptococcus lactis* for production of superoxide dismutase, Applied Microbiology Biotechnology, v. 23, p. 10-14, 1985.

INOUE, S.; NISHIZAWA, Y.; NAGAI, S.; Stimulation of streptomycin formation by *Streptomyces griseus* grown in a phosphate deficient culture; J. Ferment. Technol., v. 60, n° 5, p. 417-422, 1982.

ISHIZAKI, A.; TAKASAKI, S.; FURUTA, Y.; Cell-Recycled fermentation of glutamate using a novel cross-flow filtration with constant air supply, Journal of Fermentation and Bioengineering, v.76, n° 4, 316-320, 1993.

IVES, P. R.; BUSHELL, M. E., Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, Microbiology, v.143, p.3573-3579, 1997.

JONES, C.; THOMPSON, A.; ENGLAND, R., Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.13, p.633-636, 1997.

KIRK S, AVIGNONE-ROSSA CA, BUSHELL ME; Growth limiting substrate affects antibiotic production and associated metabolic fluxes in *Streptomyces clavuligerus*; Biotechnology Letters; v. 22; n° 22; 1803-1809; 2000.

KIN, E. Y.; YOO, Y. J.; Analysis of broth rheology with cell morphology in *Cephalosporium* fermentation, Biotechnology technology, v.6., n. 6, p 501-506, 1996.

LAFFORGUE-DELORME, C.; DELORME, C.; GOMA, G.; Continuous Alcoholic Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* Recycle by Tangential Filtration: Key Points fo Process Modelling; Biotechnology Letters, v.16 (7), p.741-746, 1994.

LARGE, K. P.; ISON, A. P.; WILLIAMS, D. J., The effects of agitation rate on liquid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, Journal of Biotechnology, v.63, p.111-119, 1998.

LEBRIHI, A.; GERMAIN, P.; LEFEBVRE, G., Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. Applied Microbiology. Biotechnology, v.26, p.130-135, 1987.

LEE, P. C.; HO, C. C., Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* in palm-oil medium. World. Journal Microbiology Biotechnology, v.12, p.73-75, 1996.

LEE, S. D.; PARK, S. W.; OH, K. K.; HONG, S. I.; KIM, S. W.; Improvement for the production of clavulanic acid by mutant *Streptomyces clavuligerus*, Letters in Applied Microbiology, v. 34, nº 5, p. 370-375, 2002.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., Tecnologia das Fermentações, v.1, São Paulo-EDUSP, 1975, 285p.

LIU, HONG-BING; CHUI, KA-SHUN; CHAN, CHI-LEONG; TSANG, CHUN-WAI; LEUNG, YUN-CHUNG; An efficient heat-inducible *Bacillus subtilis* bacteriophage ϕ 105 expression and secretion system for the production of the *Streptomyces clavuligerus* β -lactamase inhibitory protein (BLIP), Journal of Biotechnology, v. 108, p. 207-217, 2004.

MACGOWAN, S. J.; BYCROFT, B. W., SALMOND, P. C.; Bacterial production of carbapenems and clavans: evolution of β -lactam antibiotic pathways, Trends in Microbiology, v. 6, n. 5, p203-208, 1998.

MANELIUS, A., HOLST, O.; Cultivation of *Thermoanaerobium brockii* in continuous culture with complete cell recycling, Letters in Applied Microbiology, vol. 24, p.384-388, 1997.

MATSUMURA, M.; IMANAKA, T.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H.; Modeling of Cephalosporin C Production and its Application of Fed-Batch Culture, Journal of Fermentation Technology, v.59, nº 2; p.115-123, 1981.

MAYER, A.F.; DECKWER, W.-D., Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations. Applied Microbiology. Biotechnology, v.45, p.41-46, 1996.

MCINTYRE, J. J.; BULL, A. T.; BUNCH, A. W.; Vancomycin Production in Batch and Continuous Culture, Biotechnology and Bioengineering, v. 49, 412-420, 1996.

MØLLER, K.; SHARIF, M. Z.; OLSSON, L.; Production of fungal α -amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivation, Journal of Biotechnology, v. 111, p. 311-318, 2004.

MINKEVICH, I. G.; SATROUTDINOV, A. D.; DEDYUKHINA, E. G.; CHISTYAKOVA, T. I.; EROSHIN, V. K.; Degradation of EDTA by a chemostat culture of bacterial strain DSM 9103, Process Biochemistry, v. 38, p. 1559-1564, 2003.

MONTES, J. F.; CATALÁN, J; GALÁN, M. A.; Prediction of k_{La} in yeast broths, Process Biochemistry, v.34, p. 549-555, 1999.

MONTESINOS, J. L., GORDILLO, M. A., VALERO, F., LAFUENTE, J., SOLÁ, C.; VALDMAN, B., Improvement of lipase productivity in bioprocesso using a structured mathematical model, Journal of Biotechnology, v.52, p.207-218, 1997.

MOO-YOUNG, M., Comprehensive biotechnology: The principles, applications & regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine, v.1, Oxford, U.K., Pergamon Press, 1985, 688p..

MORCEL, C.; BIEDERMANN, K.; Coupling of fermentation and microfiltration for α -amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens*, FEMS Microbiology Reviews, v. 14, 57-62, 1994.

MOREIRA, R. M. S., Produção de ácido clavulânico em biorreator agitado mecanicamente, 1998, 129p., Dissertação (Mestrado), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ..(Dissertação).

MOSTAFA, N. A.; Production of acetic acid and glycerol from salted and dried whey in a membrane cell recycle bioreactor, Energy Conversion and Management, v. 42, p. 1133-1142, 2001.

MUKHERJEE, K. J.; DEB, J. K.; RAMACHANDRAN, K. B.; Studies on maintenance of vector pBK2 in *Corynebacterium acetoacidophilum* by co-culture experiments in a continuous bioreactor, Enzyme and Microbial Technology, v.18, 555-560, 1996.

MÜLLER, C.; SPOHR, A. B.; NIELSEN, J.; Role of substrate concentration in mitosis and hyphal extension of *Aspergillus*, Biotechnology and Bioengineering, v. 67, n^o 4, 2000.

NABAIS, A. M. A. E FONSECA, M. M. R., Improved process for clavulanic acid production, número da patente WO0005397, 2000.

- NEELY, A. N.; HOLDER, I. A.; Antimicrobial resistance, Burns, v.25, p17-24, 1999.
- NETZNER, A. B.; FEEHS, R. H.; RAMOS, L. H.; OTTO, R. E.; FUTHILL, J. B.; Agitation of viscous Newtonian and non newtonian fluids; A. I. Ch. E. J.; v.7, n.1, p3-9, 1961
- NEU, H. C.; Science, v. 257, p.1064-1073, 1992.
- NISHIWAKI, A.; Analysis of a two-stage fermentation with cell recycling for continuous acetic acid production, Journal of Fermentation and Boiengineering, v.83, n° 6, 565-570, 1997.
- NISHIZAWA, Y.; MITANI, Y.; TAMAI, M.; NAGAI, S.; Ethanol production by cell recycling with hollow fibers; Journal Fermentation Technology; v. 61; n. 6; p. 599-605; 1983.
- PARADKAR, A. S.; AIDOO, K. A.; JENSEN, S. E.; A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, Molecular Microbiology, v. 27, n° 4, p. 831-843, 1998.
- PARK, Y. S.; TODA, K.; Simulation study on bleed effect in cell-recycle culture of *Acetobacter acet.*, Journal of Gen. Appl. Micro., v. 36, p. 221-233, 1990.
- PEACOCK, L.; WARD, J.; RATLEDGE, C.; DICKINSON, F. M.; ISON, A.; How *Streptomyces lividans* uses oils and sugars as mixed substrate, Enzyme and Microbial Technology, v. 32; p. 157-166, 2003.
- PEREIRA JÚNIOR, N.; Informação verbal, eq-UFRJ, 1996
- PITLIK, J.; TOWNSEND, C. A., The fate of [2,3,3-²H₃,1,2-¹³C₂]-D,L-glycerate in clavulanic acid biosynthesis, Chemical communication, N.2 , p.225-226, 1997.
- POSTEN, C. H.; COONEY, C. L.; Growth of Microorganisms; In: Rehm, H.-J.; Reed, G.; Pühler, A.; Stadler, P.; Biotechnology, v1, 1^a ed., Weinhein(Alemanha), VCH, p.113-159,1993.
- PRUESS, D. L.; KELLETT, M., Ro 22-5417, A new clavam antibiotic from *Streptomyces clavuligeru*, The Journal of Antibiotics, v.36, N.3, 208-212, 1983.

REIMANN, A.; BIEBL, H.; DECKWER, W.-D.; Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling, Applied Microbiology Biotechnology, v.49, 359-363, 1998.

RIUS, N. AND DEMAIN, A. L., Regulation of lysine ϵ -aminotransferase by carbon source and lack of control by phosphate in *Streptomyces clavuligerus*, Applied Microbiology and Biotechnology, v.48, p.735-737, 1997.

RODRIGUES, J. A. D., Contribuição ao estudo cinético da fase de crescimento do processo de produção de penicilina, 1992, 114p., Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo

ROLLINS, M. J.; JESEN, S. E.; WOLFE, S. WESTALKE, D. W. S.; Effect of aeration on antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus*, Journal Industrial Microbiology, v.3, p357-364, 1998b.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J. F., Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*., Applied Microbiology. Biotechnology., v.20, p.318-325, 1984.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J. F., Utilization of ornithine and arginine as specific precursors of clavulanic acid. Applied. Environment. Microbiology, v.52, p.892-897, 1986.

ROMERO, J.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P.; DEMAIN, A. L.; RIUS, N., Partial purification, characterisation and nitrogen regulation of the lysine ϵ -aminotransferase of *Streptomyces clavuligerus*, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v.18, p.241-246, 1997.

ROSA, J. C.; Influência das Condições de Transferência de O₂ na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, 2002, 97p., Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.

ROUBOS, J. A.; KRABLEN, P.; DE LATT, WTAM, RARLUSKA, R.; HEIJNEN, J. J.; Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivation; Biotechnology Progress, v. 18, n. 3, p.451-457, 2002.

ROYCE, P. K.; THORNHILL, N. F.; Analysis of noise and bias in fermentation oxygen uptake rate data, Biotechnology and Bioengineering, v. 40, p. 634-637, 1992.

SPIZEK, J.; TICHY, P., Some aspects of overproduction of secondary metabolites, Folia Microbiologica, v.40, N.1, p.43-50, 1995.

SHULER, M. L.; KARGI, F.; Bioprocess Engineering, 1^aed, v.1, New Jersey, Prentice-Hall, Inc; p. 477, 1992.

TAKAMATSU, S.; RYU, D. D. Y.; New recirculation bioreactor-separator combination system for continuous bioconversion and separation of products; Enzyme Microbiology Technology; v. 10, p. 593-600, 1988.

TARBUCK, L.A.; NG, M.H.; LEIGH, J.R.; TAMPION, J., Estimation of the progress of *Streptomyces clavuligerus* fermentations for improved on-line control of antibiotic production, In: Modelling and control of biotechnological process , Noordwijkerhout 1985.

TAYLOR, F.; KURANTZ, M. J., GOLDBERG, N.; CRAIG JR.; J. C.; Control of Packed column Fouling in the Continuous Fermentation and Stripping of Ethanol, Biotechnology and Bioengineering, v.51, p. 33-39, 1996.

TEODORO, JULIANA C.; BAPTISTA-NETO, ÁLVARO; BADINO JR, ALBERTO COLLI; Influência da Velocidade de Alimentação de Glicerol na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em Batelada Alimentada, 2003, In: XIV SINAIFERM, anais do XIV SINAIFERN, Florianópolis, Santa Catarina.

TERRIEN, C.; KOTRA, L. P.; SANSCHAGRIN, F.; MOBASHERY, S.; LEVESQUE, R. C.; Evaluation of inhibition of the carbenicillin-hydrolyzing β -lactamase PSE-4 by the clinically used mechanism-based inhibitors, FESB Letters, v 470, p285-292, 2000.

THIRKETTLE, J. E.; BALDWIN, J. E.; EDWARDS, J.; GRIFFIN, J. P.;SCHOFIELD, C. J.; The origin of the β -lactam carbons of clavulanic acid; Chemical communication, n. 11, p1025-1026, 1997.

TROVATI, J.; Produção de etanol a partir do amido utilizando levedua e amiloglicosidase coimobilizadas em gel de pectina; 2002, 96p.; Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.

VALENTINE, B. P.; BAILEY, C. R.; DOHERTY, A.; MORRIS, J.; ELSON, S. W.; BAGGALEY, K. H.; NICHOLSON, N. H., Evidence that arginine is a later metabolic intermediate than ornithine in the biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus.*, Journal of Chemical Society, Chemical Communications, v.15, p.1210-1211, 1993.

WANG, YONG-HUA; REN, JIE; DONG, MEI-LING; LIANG, DONG; XU, AN-LONG; Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*, Process Biochemistry, a ser publicado, 2004.

WARREN, S. J.; KESHAVARZ-MOORE, E.; AYZI SHAMLOU, P.; LILLY, M. D.; THOMAS, C. R.; DIXON, K., Rheologies and Morphologies of three actinomycetes in submerged culture, Biotechnology and Bioengineering, v.45, p80-85, 1995.

WITHERS, J. M.; WIEBE, M. G.; ROBSON, G. D.; OSBORNE, D.; TURNER, G.; TRINCI, P. J.; Stability of recombinant protein production by *Penicillium chrysogenum* in prolonged chemostat culture, FEMS Microbiological Letters, v. 133, p. 245-251, 1995.

XAVIER, A. M. R. B., GONÇALVES, L. M. D. ; MOREIRA, J. L.; CARRONDO, M. J. T.; Operational patterns affecting lactic acid production in ultrafiltration cell recycle bioreactor, Biotechnology and Bioengineering, v.45, 320-327, 1995.

YAMANE, T.; Bioreactor Operation Modes. In: Ansejo, J. A.; Merchuck, J. C.; Bioreactor System Design, v. 21, New York, Marcel Dekker, p.479-510, 1994.

YEGNESWARAN, P. K.; GRAY, M. R.; WESTLAKE, D. W. S.; Effects of reduced oxygen on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. Biotechnology Letters, v.10, n.7, p479-484, 1988.

YEGNESWARAN, P. K.; GRAY, M. R. AND THOMPSON, B. G., Experimental simulation of dissolved fluctuation in large fermentors: Effect on *Streptomyces clavuligerus*, Biotechnology and bioengineering, v.38, p 1203-1209, 1991.

ZHANG, J.; DEMAIN, A. L., Regulation of ACV synthetase activity in the beta-lactam biosynthetic pathway by carbon source and their metabolites, Archives of Microbiology, v.158, p.364, 1992.

APÊNDICE A

Método de Kjeldahl para análise de Nitrogênio

1: Etapa de digestão da amostra

Nesta etapa todo o nitrogênio orgânico na forma de peptídeos, proteínas e aminoácidos são convertidos em nitrogênio na forma amoniacal.

O procedimento adotado para a digestão da amostra é o seguinte:

1. Inicialmente pesou-se 1,2g de catalisador (mistura contendo $\text{CuSO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ e Na_2SO_3 na proporção de 1:4) e adicionou-o no tubo de Kjeldahl
2. Adicionou-se nos tubos de Kjeldahl cerca de 15 a 25 ml de amostra para garantir uma quantidade mínima de 10 mg de nitrogênio no tubo.
3. Colocou duas vezes o volume de amostra de H_2SO_4 nos tubos de Kjeldahl
4. Aqueceu a mistura a uma temperatura de cerca de 400°C , em um digestor da Büchi modelo 435, até a mistura ficar clara, cerca de umas três horas após o início do processo.

Após a realização destas etapas todo o nitrogênio na forma orgânica vai se encontrar na forma de sulfato de amônio. Cabe ressaltar que o íon amônio (NH_4^+), presente em meios ácidos, não é volátil e por isso a alta temperatura de digestão não interfere na análise.

2: Etapa de determinação da concentração de nitrogênio amoniacal

Nesta etapa há a determinação dos íons amônio presentes na solução digerida por ácido sulfúrico bem como na amostra para a determinação da concentração de amônia. Como a separação da amônia da amostra ocorre por uma destilação por araste a vapor, deve-se garantir que o pH da amostra seja alcalino o suficiente para que o nitrogênio na forma de íons amônio (NH_4^+) seja convertido totalmente em amônia (NH_3), que é volátil. As etapas para a determinação da concentração de nitrogênio são as seguintes:

1. Colocaram-se os tubos de Kjeldahl no equipamento destilador (Büchi modelo 323) que é fechado para evitar perda de amônia.
2. Colocou-se para e recolher o destilado 100 ml de solução a 2% de ácido bórico. O ácido bórico é utilizado para manter o meio ácido, e assim manter o nitrogênio arrastado pelo vapor da destilação na forma de íons amônio.
3. Adiciona-se a amostra cerca de uns 20 ml de água para diluir o ácido sulfúrico residual.
4. Adiciona-se a amostra solução com concentração de 32% de hidróxido de sódio até ela ficar escura. O volume adicionado é de cerca de 50 ml.
5. Realizou-se uma destilação por arraste a vapor da amostra por cerca de 6 minutos para separar o nitrogênio do resto da amostra.
6. Após este período fez uma titulação com ácido clorídrico padronizado, cerca de 0,1 M, para a determinação da concentração de nitrogênio.
7. Após a titulação da amostra determinou a sua concentração de nitrogênio através da equação A-1:

$$C_{NH_3} = \frac{V_{HCl} \cdot N}{V_{amos}} \cdot 14 \quad (A-1)$$

onde: C_{NH_3} => concentração de amônia na amostra

V_{HCl} => volume de ácido adicionado

N => concentração molar do ácido

V_{amos} => volume da amostra digerida ou para determinação da concentração de amônia

A análise de nitrogênio pelo método de Kjeldahl foi realizada para o caldo livre de células para determinar as concentrações de amônia e nitrogênio orgânico no caldo de cultivo.

APÊNDICE B

Método do Balanço Gasoso para a Determinação da Respiração celular, Velocidade de Formação de Dióxido de Carbono, Cálculo de RQ e Determinação de $k_L a$

O método do balanço gasoso se baseia no balanço de massa de oxigênio e de dióxido de carbono na fase gasosa para se determinar os parâmetros de respiração. A partir de medidas das frações molares de oxigênio (Y_{O_2}) e de dióxido de carbono (Y_{CO_2}) do gás efluente do biorreator e da vazão molar de gás na alimentação (ϕ_e) é possível determinar parâmetros importantes relacionados com a velocidade global de respiração celular demanda de oxigênio pela respiração celular ($R.Cx$) e a velocidade de formação de dióxido de carbono (CER), pelas equações que seguem.

$$R \cdot Cx = \frac{\phi_e Y_{O_2}^e - \phi_s Y_{O_2}^s}{V} \quad (B-1)$$

$$CER = \frac{\phi_e Y_{CO_2}^s - \phi_s Y_{CO_2}^e}{V} \quad (B-2)$$

onde: $\phi_e \Rightarrow$ vazão molar do gás de alimentação (mol.h^{-1})

$\phi_s \Rightarrow$ vazão molar do gás de saída (mol.h^{-1})

$Y_{O_2}^e \Rightarrow$ fração molar de oxigênio na corrente de entrada

$Y_{O_2}^s \Rightarrow$ fração molar de oxigênio na corrente de saída

$Y_{CO_2}^e \Rightarrow$ fração molar de CO_2 na corrente de entrada

$Y_{CO_2}^s \Rightarrow$ fração molar de CO_2 na corrente de saída

$V \Rightarrow$ volume de reação (L)

A vazão molar do gás de alimentação (ϕ_e) pode ser medida por intermédio de um fluxômetro de massa. Já, a vazão do gás de saída (ϕ_s) pode ser calculada a partir da

vazão molar do gás de alimentação (ϕ_e) e das composições dos gases de entrada e saída do fermentador de acordo com a equação B-3.

Supondo que o ar de alimentação do reator esteja seco (20,95% de O_2 , 79% de N_2 e 0,05% de outros gases) e que o gás efluente seja uma mistura de O_2 , CO_2 e N_2 , uma vez conhecidas as composições de O_2 e CO_2 na corrente de saída, pode-se calcular a fração molar correspondente ao N_2 ($Y_{N_2}^s$) da seguinte forma:

$$Y_{N_2}^s = 1 - Y_{O_2}^s - Y_{CO_2}^s \quad (B-3)$$

O balanço molar para o nitrogênio (gás inerte) fornece:

$$\phi_s = \frac{0,79 \phi_e}{1 - Y_{O_2}^s - Y_{CO_2}^s} \quad (B-4)$$

Uma vez conhecidas a vazão molar de alimentação de ar (ϕ_e), as frações molares de O_2 ($Y_{O_2}^s$) e de CO_2 ($Y_{CO_2}^s$) na corrente de saída e o volume de reação (V), pode-se determinar a velocidade global de respiração ($R \cdot Cx$), utilizando a equação B-1.

O quociente respiratório (RQ), definido pela relação entre a quantidade de CO_2 gerada pela quantidade de O_2 consumida no processo, é quantificado de acordo com a equação B-5.

$$RQ = \frac{Y_{CO_2}^s \cdot \phi_s}{\phi_e Y_{O_2}^e - \phi_s Y_{O_2}^s} \quad (B-5)$$

Para o cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) utilizou a equação B-6.

$$K_{La} = \frac{R \cdot Cx}{C_{O_2}^* \left(1 - \frac{\%OD}{100\%}\right)} \quad (B-6)$$

onde: $C_{O_2}^*$: concentração de saturação de oxigênio dissolvido

As frações molares de dióxido de carbono e de oxigênio na corrente de entrada foram consideradas 0 e 20,95% respectivamente.

A concentração de saturação de oxigênio dissolvido é obtida através da lei de Henry dada pela equação B-7

$$C_{O_2}^* = H \cdot Y_{O_2}^e \cdot P \quad (B-7)$$

onde: H: constante de Henry

P: pressão no reator

A pressão do reator utilizado foi de 700 mmHg e a constante de Henry utilizada ($0,0270 \text{ atm} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$) foi obtida através da interpolação de valores tabelados em livro texto (Shuler e Kargi, 1992).

APÉNDICE C

Lista de trabalhos apresentados em congresso desde agosto de 2000

- Baptista-Neto, Álvaro de; Teodoro, Juliana Conceição; Cassiano Filho, Luiz Cláudio Macedo; Badino Júnior, Alberto Colli; Hokka, Carlos Osamu; Comparação entre processo contínuo com e sem reciclo celular e batelada na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, In: XV Congresso Brasileiro de Engenharia química, 2004, Curitiba, Paraná, anais do XV COBEQ
- Teodoro, J. C; Baptista Neto, A.; Badino Júnior, A. C.; Efeitos da alimentação do meio suplementar na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em batelada alimentada, In: XV Congresso Brasileiro de Engenharia química, 2004, Curitiba, Paraná, anais do XV COBEQ
- Baptista Neto, Álvaro de; Hirata, Daniela Battaglia; Cassiano Filho, Luiz Cláudio Macedo; Belão, Carolina; Badino Júnior, Alberto Colli; Hokka, Carlos Osamu. Estudo da Produção de Ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em Processo Batelada, Batelada Alimentada e Contínuo. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003, Florianópolis, anais do XIV SINAFERM, 2003.
- Baptista Neto, Álvaro de; Hirata, Daniela Battaglia; Cassiano Filho, Luiz Cláudio Macedo; Badino Júnior, Alberto Colli; Hokka, Carlos Osamu. Influência da Fonte de Nitrogênio na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003, Florianópolis, anais do XIV SINAFERM, 2003.
- Barsi, Fabrício V; Baptista Neto, Álvaro de; Badino Júnior, Alberto Colli. Estimativa de concentração celular em suspensões de *Streptomyces clavuligerus* em meios de cultura com insolúveis. In: V Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2003, Rio de Janeiro. Anais do V COBEQ-IC. 2003.
- Belão, Carolina; Baptista Neto, Álvaro de; Badino Júnior, Alberto Colli. Influência das condições de cultivo na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em batelada alimentada. In: V Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2003, Rio de Janeiro. anais do V COBEQ-IC. 2003.
- Maranesi, Gabriela L; Baptista Neto, Álvaro de; Badino Júnior, Alberto Colli. Estudo da Influência de óleos vegetais sobre a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. In: V Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2003, Rio de Janeiro. Anais do V COBEQ-IC. 2003.
- Baptista-Neto, Álvaro de ; Rosa, João Carlos; Hokka, Carlos Osamu; Badino Júnior, Alberto Colli; Influência do pH na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, In: XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Natal, RN, 2002; Anais do XIV COBEQ, 2002

- Rosa, João Carlos; Badino Júnior, Alberto Colli; Baptista-Neto, Álvaro de; Hokka, Carlos Osamu; Influência da concentração de oxigênio dissolvido e das condições de cisalhamento na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, In: XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Natal, RN; Anais do XIV COBEQ, 2002
- Baptista Neto, Álvaro de; Hirata, Daniela Battaglia; Hokka, Carlos Osamu; Badino Júnior, Alberto Colli; Influência dos Sais na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, In: I Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia, 2001, São Paulo, São Paulo, anais do I SBBiotec, 2001.
- Baptista Neto, Álvaro de; Hokka, Carlos Osamu; Badino Júnior, Alberto Colli, Simulação do Processo de Produção de Ácido Clavulânico em Cultivos Contínuos com Reciclo Celular, In: 4ª Jornada Científica da UFSCar, 2001, São Carlos, anais do 4a Jornada Científica de UFSCar, 2001
- Gouveia, Ester Ribeiro; Baptista-Neto, Álvaro de; Badino Júnior, Alberto Colli; Hokka, Carlos Osamu. Comparação da Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* Utilizando Meios de Cultura Sintéticos e Complexos. In: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2000, Águas de São Pedro, anais do XIII COBEQ, 2000.
- Gouveia, Ester Ribeiro; Baptista Neto, Álvaro de; Badino Júnior, Alberto Colli; Hokka, Carlos Osamu. Influência de Diferentes Combinações de Fontes Complexas de Nitrogênio na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. In: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2000, Águas de São Pedro, anais do XIII COBEQ, 2000.
- Gouveia, Ester Ribeiro; Baptista Neto, Álvaro de; Badino Júnior, Alberto Colli; Hokka, Carlos Osamu. Studies on the Rheology and Oxygen Mass Transfer in the Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus*. In: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2000, Águas de São Pedro, anais do XIII COBEQ, 2000.
- Baptista Neto, Álvaro de; Gouveia, Ester Ribeiro; Badino Júnior, Alberto Colli; Hokka, Carlos Osamu. Phenomemological Model of The Clavulanic Acid Production Process Utilizing *Streptomyces clavuligerus*. In: XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2000, Água de São Pedro, anais do XIII COBEQ, 2000
- Baptista Neto, Álvaro de; Gouveia, Ester Ribeiro; Badino Júnior, Alberto Colli; Hokka, Carlos Osamu. Influência na Concentração de Glicerol na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. In: XIII Simpósio Nacional de Fermentações, 2000, Teresópolis. Anais do XIII SINAFERM; 2000.

Artigos Publicados em Periódicos desde agosto de 2000

- Gouveia, Ester Ribeiro; Baptista Neto, Álvaro de; Hokka, Carlos Osamu; Badino Júnior, Alberto Colli. Optimisation of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. Biotechnology Letters, v. 23, n. 2, p. 157-161, 2001.
- Baptista Neto, Álvaro de; Gouveia, Ester Ribeiro; Badino Júnior, Alberto Colli; Hokka, Carlos Osamu. Phenomenological Model of the Clavulanic Acid Production Process Utilizing *Streptomyces clavuligerus*; Brazilian Journal of Chemical Engineering, Campinas-SP, v. 17, n. 04-07, p. 809-818, 2000.
- Gouveia, Ester Ribeiro; Hokka, Carlos Osamu; Badino Júnior, Alberto Colli. Studies on the Rheology and Oxygen Mass Transfer in the Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, Campinas-SP, v. 17, n. 04-07, p. 827-834, 2000.

Artigos aceitos para publicação desde agosto de 2000

- Maranesi, Gabriela L.; Baptista-Neto, Álvaro de; Hokka, Carlos Osamu; Badino Junior, Alberto Colli; Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064; World Journal of Microbiology and Biotechnology, www.kluveronline.com/isen/0959-3993
- Baptista Neto, Álvaro de; Hirata, Daniela Battaglia; Cassiano Filho, Luiz Cláudio Macedo; Bellão, Carolina; Badino Júnior, Alberto Colli; Hokka, Carlos Osamu; Studies on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous process, Brazilian Journal of Chemical Engineering, Campina-SP,
- Rosa, João Carlos; Baptista Neto, Álvaro de, Hokka, Carlos Osamu; Badino-Júnior, Alberto Colli; Influence of Dissolved Oxygen and Shear Conditions on Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus*, Bioprocess and Biosystems Engineering, no prelo
- Baptista-Neto, A.; Teodoro, J. C.; Cassiano Filho, L. C. M.; Badino A. C.; Hokka, C. O.; Comparisons between continuous cultivation with and without cell recycle and batch process for production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*, Brazilian archives of Biology and Technology, no prelo

APÉNDICE D

Composição do Samprosoy 90 NB

A composição do Samprosoy 90 NB está destricta na Tabela D-1

Tabela D-1: Composição do Samprosoy 90 NB.

| | |
|----------------------|---------------------------------|
| Nitrogênio Total (%) | 14,72 |
| Proteína hidrolizada | 92% |
| Aminoácidos | Concentração mg.g ⁻¹ |
| Alanina | 37,0 |
| Arginina | 71,0 |
| Ácido Aspartico | 107,0 |
| Cisteína | 12,0 |
| Ácido Glutâmico | 180,0 |
| Glicina | 0,0 |
| Histidina | 24,0 |
| Isoleucina | 38,0 |
| Leucina | 69,0 |
| Lisina | 57,0 |
| Fenilalanina | 48,0 |
| Metionina | 12,0 |
| Prolina | 47,0 |
| Serina | 50,0 |
| Treolina | 32,0 |
| Triptofano | 9,0 |
| Tirosina | 36 |
| Valina | 40,0 |