

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

**Estudo da Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em Diferentes Concentrações de Lipídios e de Fontes Complexas de Nitrogênio**

**Sheila Cristiane Alves Ortiz**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka**

**SÃO CARLOS – SP**

**2005**

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

**Estudo da Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em Diferentes Concentrações de Lipídios e de Fontes Complexas de Nitrogênio**

**Sheila Cristiane Alves Ortiz**

Dissertação de mestrado 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 Mestre em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

**Orientador:**  
**Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka**

**São Carlos – SP**  
**2005**

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

O77ep

Ortiz, Sheila Cristiane Alves.

Estudo da produção de ácido clavulânico por  
*Streptomyces clavuligerus* em diferentes concentrações de  
lipídios e de fontes complexas de nitrogênio / Sheila  
Cristiane Alves Ortiz. -- São Carlos : UFSCar, 2005.  
88 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2005.

1. Fermentação. 2. Lipídios. 3. Ácido clavulânico. 4. Soja  
- produtos. I. Título.

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

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **SHEILA CRISTIANE ALVES ORTIZ** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 29 DE AGOSTO DE 2005.

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

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

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

*Olhos abertos*

*O longe é perto*

*O que vale é o sonho*

*(Desgarrados - Sérgio Napp/ Mário Barbará Dornelles)*

*Ao Gui*

*À minha Família*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores Dr. Carlos Osamu Hokka e Dr. Alberto Colli Badino Junior pela orientação.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica e em especial, Álvaro, Marcel, Luciana Futiwaki e Juliana, pela importante contribuição em algumas etapas desse trabalho.

Ao técnico Amadeus que esteve sempre disposto a ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa concedida.

Ao DEQ-UFSCar pela infra-estrutura fornecida.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>NOMENCLATURA</b> .....	<b>iv</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1. Antibióticos $\beta$ -Lactâmicos .....	3
2.2. Ácido Clavulânico.....	5
2.3. Biossíntese.....	6
2.4. <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	8
2.5. Regulação do Metabolismo Secundário .....	10
2.5.1. Regulação por Fonte de Nitrogênio .....	10
2.5.1.1. Metabolismo dos Aminoácidos e o Ciclo da Uréia .....	12
2.5.2. Regulação por Fonte de Fosfato .....	16
2.5.3. Regulação por Fonte de Carbono.....	16
2.5.3.1. Óleos como Fonte de Carbono.....	17
2.5.3.2. Metabolismo dos Lipídios .....	18
2.5.3.3. Lipases.....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1. Materiais.....	26
3.1.1. Microrganismo.....	26
3.1.2. Meios de Cultura .....	26
3.1.2.1. Meio de Cultura de Reativação.....	26
3.1.2.2. Meios de Cultura de Produção .....	27
A) Ensaio Preliminares em Mesa Incubadora Rotativa .....	27
B) Ensaio em Biorreator de Bancada.....	28
3.2. Equipamentos .....	29
3.2.1. Câmara Asséptica.....	29
3.2.2. Autoclaves.....	29
3.2.3. Ultrafreezer .....	29
3.2.4. Mesa Incubadora Rotativa .....	30
3.2.5. Centrífuga Refrigerada .....	30
3.2.6. Medidor de pH.....	30
3.2.7. Reômetro .....	30
3.2.8. Biorreator de Bancada .....	30
3.2.9. Cromatógrafo .....	31
3.3. Metodologia Analítica.....	31
3.3.1. Análise da Concentração de Ácido Clavulânico.....	31



A) Método Espectrofotométrico (Bird <i>et al.</i> , 1982).....	31
B) Método Cromatográfico (Foulstone e Reading, 1982).....	33
3.3.2. Análise de Glicerol .....	34
3.3.3. Avaliação do Crescimento Celular.....	34
3.3.4. Determinação da Concentração de Lipídios.....	35
3.3.5. Determinação de Carboidratos Totais .....	35
3.4. Procedimento Experimental.....	36
3.4.1. Ensaio em Mesa Incubadora Rotativa .....	36
3.4.2. Experimentos em Biorreator Convencional de Bancada.....	37
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
4.1. Ensaio em Mesa Incubadora Rotativa .....	39
A) Avaliação da Fonte e Concentração de Nitrogênio.....	39
4.1.1. Ensaio BS1 .....	39
4.1.2. Ensaio BS2 .....	40
4.1.3. Ensaio BS3 .....	42
4.1.4. Ensaio BS4 .....	45
4.1.5. Comparação dos ensaios BS1, BS2, BS3 e BS4.....	46
B) Avaliação da Concentração de Lipídios .....	47
4.1.6. Ensaio BS5 .....	48
4.1.7. Ensaio BS6 .....	49
4.2. Ensaio em Biorreator.....	50
4.2.1. Ensaio BF1.....	50
4.2.2. Ensaio BF2.....	51
4.2.3. Ensaio BF3.....	52
4.2.4. Ensaio BF4.....	54
4.2.5. Ensaio BF5.....	55
4.2.6. Ensaio BF6.....	56
4.2.7. Comparação dos Cultivos em Biorreator de Bancada.....	58
4.2.8. Correlação entre Concentrações de Farinha de Soja ( $C_{FS}$ ) e de Óleo de Soja ( $C_{OS}$ ) e Produção de Ácido Clavulânico .....	63
4.2.9. Modelagem Qualitativa do Processo de Produção de Ácido Clavulânico.....	65
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
<b>6. SUGESTÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>70</b>

---

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 2.1.</b>	Subgrupos de antibióticos $\beta$ -lactâmicos, exemplo de antibióticos e microrganismos produtores (Brakhage, 1998)	04
<b>Figura 2.2.</b>	Fórmula estrutural do ácido clavulânico	05
<b>Figura 2.3.</b>	Rota biossintética do ácido clavulânico e outros clavams (Elkins <i>et al.</i> , 2002)	08
<b>Figura 2.4.</b>	Degradação de aminoácidos (Voet <i>et al.</i> , 2000)	13
<b>Figura 2.5.</b>	Ciclo da uréia (Voet <i>et al.</i> , 2000)	15
<b>Figura 2.6.</b>	$\beta$ - oxidação da Acil-Coa graxa (Voet <i>et al.</i> , 2000)	22
<b>Figura 2.7.</b>	Reação de hidrólise do triacilglicerol catalisada por lipases (Stryer, 1996)	23
<b>Figura 2.8.</b>	Atuação da lipase (Muralidhar <i>et al.</i> , 2002)	24
<b>Figura 3.1.</b>	Curva de calibração para determinação da concentração de AC	32
<b>Figura 3.2.</b>	Esquema experimental para os cultivos em mesa incubadora rotativa	37
<b>Figura 3.3.</b>	Esquema experimental para os cultivos em biorreator de bancada	38
<b>Figura 4.1.</b>	Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ), carboidratos totais ( $C_{CT}$ ) e índice de consistência (K) do ensaio BS1	39
<b>Figura 4.2.</b>	Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e índice de consistência (K) do ensaio BS2	41
<b>Figura 4.3.</b>	Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e índice de consistência (K) do ensaio BS3	42
<b>Figura 4.4.</b>	Comparação dos resultados de concentração de ácido clavulânico pelos métodos de Bird <i>et al.</i> , (1982) e Foulstone e Reading, (1982)	43
<b>Figura 4.5.</b>	Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e índice de consistência (K) do ensaio BS4	45
<b>Figura 4.6.</b>	Perfis de concentração de AC pra os cultivos BS1, BS2, BS3 e BS4 em mesa incubadora rotativa	47
<b>Figura 4.7.</b>	Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e índice de consistência (K) do ensaio BS5	48
<b>Figura 4.8.</b>	Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e índice de consistência (K) do ensaio BS6	49

---

<b>Figura 4.9.</b>	Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ), índice de consistência (K) e concentração de oxigênio dissolvido (OD) do ensaio BF1	50
<b>Figura 4.10.</b>	Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ), índice de consistência (K) e concentração de oxigênio dissolvido (OD) do ensaio BF2	52
<b>Figura 4.11.</b>	Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ), índice de consistência (K) e concentração de oxigênio dissolvido (OD) do ensaio BF3	53
<b>Figura 4.12.</b>	Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ), índice de consistência (K) e concentração de oxigênio dissolvido (OD) do ensaio BF4	54
<b>Figura 4.13.</b>	Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e índice de consistência (K) do ensaio BF5	55
<b>Figura 4.14.</b>	Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e índice de consistência (K) do ensaio BF6	57
<b>Figura 4.15.</b>	Perfis dos índices de consistência (K) dos ensaios BF1, BF2, BF3, BF4, BF5 e BF6	58
<b>Figura 4.16.</b>	Perfis de concentração de ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) dos ensaios BF1, BF2, BF3, BF4, BF5 e BF6	59
<b>Figura 4.17.</b>	Perfis de consumo de lipídios ( $C_{LIP}$ ) dos ensaios BF1, BF2, BF3, BF4, BF5 e BF6	60
<b>Figura 4.18.</b>	Produtividade de AC dos ensaios BF1, BF2, BF3, BF4, BF5 e BF6	62
<b>Figura 4.19.</b>	Comparação entre os valores experimentais e calculados de $C_{ACmax}$	65

---

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 2.1.</b>	Alguns exemplos de ácidos graxos, com seus nomes comuns e fórmulas adaptada de Stryer (1996)	20
<b>Tabela 3.1.</b>	Meio de cultura para reativação do microrganismo	26
<b>Tabela 3.2.</b>	Meios de cultura de inóculo e produção para avaliação da fonte e da concentração de nitrogênio	27
<b>Tabela 3.3.</b>	Meios de cultura de produção para avaliação da concentração de óleo de soja utilizado como fonte de carbono.	28
<b>Tabela 3.4.</b>	Meios de cultura de produção para avaliação das concentrações da fonte de nitrogênio e de óleo de soja utilizado como fonte de carbono	29
<b>Tabela 4.1.</b>	Comparação entre valores de produção ( $C_{AC}$ ) e produtividade ( $P_{AC}$ ) máximas em AC publicados na literatura	63
<b>Tabela 4.2.</b>	Comparação entre os valores de $C_{ac_{max}}$ experimentais e calculados pela Equação 4.1	64

---

## NOMENCLATURA

$K$  = índice de consistência ( $\text{dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ )

$n$  = índice de comportamento de escoamento

Abs = Absorbância

AC = ácido clavulânico

MOPS = ácido morfolino propano sulfônico

$C_{AC}$  = concentração de ácido clavulânico ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$Ca_{C_{Max}}$  = concentração de ácido clavulânico máxima ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

$P_{AC}$  = produtividade em ácido clavulânico ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$C_{GLI}$  = concentração de glicerol ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$C_{LIP}$  = concentração de lipídios ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$C_{CT}$  = concentração de carboidratos totais ( $\text{g.L}^{-1}$ )

OD = Oxigênio dissolvido

$C_{FS}$ : concentração de farinha de soja ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$C_{OS}$ : concentração de óleo de soja ( $\text{g.L}^{-1}$ )

### Letras gregas

$\tau$  = tensão de cisalhamento ( $\text{dina.cm}^{-2}$ )

$\gamma$  = velocidade de cisalhamento ou gradiente de velocidade ( $\text{s}^{-1}$ )

$\lambda$  = comprimento de onda (nm)

## RESUMO

O ácido clavulânico (AC), produto do metabolismo secundário da bactéria filamentosa *Streptomyces clavuligerus*, é um potente inibidor de enzimas  $\beta$ -lactamases, sendo utilizado pela indústria farmacêutica em conjunto com outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, na formulação de medicamentos que diminuem a resistência de muitas bactérias patogênicas a estes antibióticos. Estudos de composição de meio de cultura, assim como o modo que cada componente é adicionado ao caldo é de vital importância nos processos fermentativos, tanto no que se refere à obtenção de alta produtividade do produto desejado, assim como na facilidade de manipulação, separação e purificação do produto final. Os lipídios apresentam-se como uma alternativa a ser utilizada em processos para produção de ácido clavulânico, uma vez que constituem uma fonte concentrada de energia lentamente assimilável pelos microrganismos. Quanto à fonte de nitrogênio, derivados de soja como farinhas e hidrolisados têm sido utilizados com sucesso na produção de AC, fornecendo precursores para biossíntese deste composto, no entanto, a quantidade adequada desse nutriente não foi ainda estabelecida em meios de cultura até o momento. O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo da composição do meio de cultura para produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em biorreator de bancada, utilizando fontes complexas de nitrogênio e lipídios como fonte de carbono suplementar. Em ensaios preliminares em mesa incubadora rotativa para determinação das concentrações da fonte/ teor de nitrogênio utilizando farinha de soja e Samprosoy 90NB nas concentrações 1,6, e 3,2 g.L<sup>-1</sup> de nitrogênio total e concentração de óleo de soja (16, 23 e 30 g.L<sup>-1</sup>), os resultados obtidos mostraram que quando as concentrações de óleo de soja e farinha de soja iniciais foram 23 g.L<sup>-1</sup> e 20 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, a produção de AC obtida foi 700 mg.L<sup>-1</sup> em 132 horas de cultivo, e que valores de pHs acima de 7,0 prejudicam o processo de produção. Nos ensaios em biorreator de bancada convencional, em condições de controle de pH por adição de ácido e base, todos os cultivos foram marcados pela alta produção e produtividade de AC ocorrendo aparente pequena degradação do produto. A composição de meio de cultura que gerou os melhores resultados de produção de AC nas seguintes condições: 800 rpm, 0,5 vvm e pH 6,8, foi o que apresentou farinha de soja e óleo de soja nas concentrações de 40 g.L<sup>-1</sup> e 16 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, na composição do meio de produção, alcançando a produção máxima de 906 mg.L<sup>-1</sup> de AC em 84 horas de cultivo.

## ABSTRACT

Clavulanic acid (CA), a secondary metabolite from *Streptomyces clavuligerus*, is a potent inhibitor of  $\beta$ -lactamases, being formulated by pharmaceutical industries with other  $\beta$ -lactams antibiotics to produce drugs that overcome the resistance to antibiotics of many pathogenic bacteria. Studies on culture medium composition, as well as how each component is added to the broth are essential for improving and developing fermentation processes both in obtaining high productivity, as well as in simplifying the separation and purification of the final product. The lipids become an interesting alternative to be used in CA production process, once they constitute a concentrated source of energy slowly assimilated by microorganisms. With relation to the nitrogen source, soybean derivatives, as flours and protein isolates, have been used successfully in the production of CA, by supplying precursors for its biosynthesis; however, the appropriate amount of this nutrient in culture media has not been properly established so far. The general objective of the present work was to study the culture medium composition on the improvement of CA production by *S. clavuligerus* in bench scale bioreactor, using complex nitrogen sources, and lipids as supplementary carbon source. In preliminary cultivations in shake flasks, the effects of nitrogen source and concentration, using soybean flour and Samprosoy 90NB (soybean protein isolate), were studied. The total nitrogen concentrations of 1.6 and 3.2 g.L<sup>-1</sup>, and soybean oil concentration of 16, 23 and 30 g.L<sup>-1</sup> were tested. The results obtained showed that, when the concentrations of soybean oil and initial soybean flour were 23 g.L<sup>-1</sup> and 20 g.L<sup>-1</sup>, respectively, the CA production obtained was 700 mg.L<sup>-1</sup> in 132 hours cultivation, and at pH values above 7.0 the production process was severely harmed. In conventional bioreactor cultivations, under pH control with acid or base addition, all the cultivations were marked by the high CA production and productivity, accompanied by small degradation of the product. The culture medium composition and cultivation conditions that generated best results, concerning CA production, were as follows: 800 rpm, 0.5 vvm and pH 6.8, soybean flour and soybean oil concentrations of 40 g.L<sup>-1</sup> and 16 g.L<sup>-1</sup>, respectively. Under these conditions, a maximum production of 906 mg.L<sup>-1</sup> of CA in 84 hours cultivation was obtained.

## 1. INTRODUÇÃO

A penicilina, um antibiótico descoberto por Fleming em 1929, representou um grande avanço no tratamento de várias doenças infecciosas causadas por bactérias, assim como suas limitações de uso impulsionaram os estudos para a descoberta de um amplo número de compostos com maior, mais estável e diferenciado espectro de ação antibacteriana. (Kurylowicz *et al.*, 1981).

Os compostos com atividade antibacteriana conhecidos atualmente podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química. Os  $\beta$ -lactâmicos compõem um importante e altamente valorizado grupo de antibióticos. São caracterizados pela presença de um anel  $\beta$ -lactâmico em sua estrutura, que lhe confere atividade antibacteriana e poucos efeitos colaterais.

A resistência de alguns microrganismos a estes antibióticos está relacionada com a capacidade de algumas bactérias produzirem  $\beta$ -lactamases, que clivam o anel  $\beta$ -lactâmico destituindo-os da atividade bacteriana.

A utilização de inibidores de  $\beta$ -lactamases, juntamente com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, é reconhecidamente uma estratégia para diminuir as concentrações mínimas de inibição para bactérias resistentes a estes antibióticos (Kurylowicz *et al.*, 1981).

Dentre os inibidores de  $\beta$ -lactamases conhecidos, o ácido clavulânico, (AC), produto do metabolismo secundário de *Streptomyces clavuligerus*, se destaca pela habilidade de inibir irreversivelmente uma grande gama de  $\beta$ -lactamases (Baggaley *et al.*, 1997).

Como ocorre com outros metabólitos secundários, a produção de ácido clavulânico depende do tipo e da quantidade das fontes de carbono, nitrogênio e fosfato presentes no meio de cultivo, que agem como fatores reguladores, assim como fatores de processo, tais como temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido (Maranesi *et al.*, 2005).

Conforme relatado por Aharonowitz e Demain (1978), *Streptomyces clavuligerus* possui a incapacidade de assimilar carboidratos simples como a glicose, necessitando de fontes de carbono alternativas para crescimento e produção de metabólitos secundários.



---

Os lipídios apresentam-se como uma alternativa a ser utilizada em processos para produção de ácido clavulânico, uma vez que constituem uma fonte concentrada de energia lentamente assimilável pelos microrganismos.

Ainda, quanto à fonte de nitrogênio, derivados de soja como farinha de soja e hidrolisados têm sido utilizados com sucesso na produção de AC, no entanto, a quantidade adequada desse nutriente não foi ainda estabelecida em meios de cultura até o momento.

Em face do apresentado, o presente trabalho teve como objetivo geral o estudo da composição do meio de cultura para produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em biorreator de bancada, utilizando fontes complexas de nitrogênio e lipídios como fonte de carbono suplementar.

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Antibióticos $\beta$ -Lactâmicos

Os compostos  $\beta$ -lactâmicos compreendem um importante e altamente valorizado grupo de drogas usadas no tratamento de doenças infecciosas. Eles incluem as penicilinas e cefalosporinas naturais e semi-sintéticas. Este grupo é caracterizado por possuir o anel  $\beta$ -lactâmico em sua estrutura, que lhe confere atividade antibacteriana.

O grupo dos  $\beta$ -lactâmicos pode ser dividido em cinco subgrupos, dependendo do segundo anel ligado ao anel  $\beta$ -lactâmico. Na Figura 2.1 estão demonstrados os subgrupos dos compostos  $\beta$ -lactâmicos, com os respectivos microrganismos produtores.

Atualmente os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos estão perdendo a sua eficiência no tratamento de várias doenças provocadas por bactérias, em função da resistência adquiridas por estas.

A resistência de muitas cepas bacterianas aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é freqüentemente devida a uma enzima produzida por elas que hidrolisa o anel  $\beta$ -lactâmico. A  $\beta$ -lactamase é produzida por cepas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformes*, *Mycobacterium sp.*) bem como Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiella aerogenes*, *enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*), algumas das quais produzem uma ou mais  $\beta$ -lactamases com variações nas propriedades químicas, físicas e enzimáticas (Kurylowicz *et al.*, 1981).

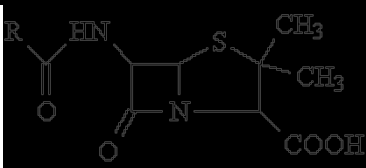
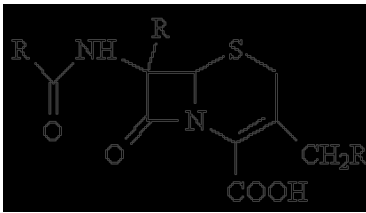
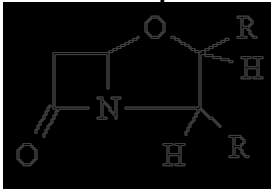
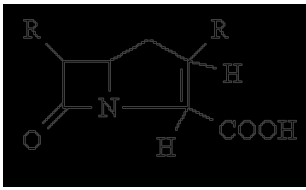
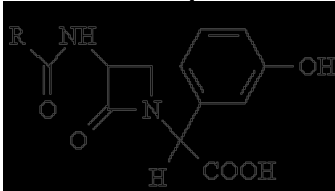
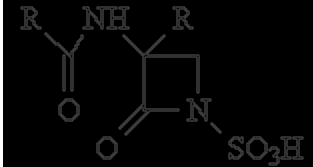
Classes dos $\beta$ -lactâmicos	Antibióticos	Microrganismos produtores
 <p><b>Penam</b></p>	Penicilinas	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>P. notatum</i> <i>Aspergillus nidulans</i>
 <p><b>Ceph-3-em</b></p>	Cefalosporinas Cefamicinas Cefabacinas	<i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Paelomyces persinucus</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i> <i>Nocardia lactamdurans</i> <i>Flavobacterium</i> sp. <i>Lysobacter lactamgenus</i>
 <p><b>Clavam</b></p>	Ácido clavulânico	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
 <p><b>Carbapenem</b></p>	Tienamicinas Ácido olivânico	<i>Streptomyces clavuligerus</i> <i>S. olivaceus</i> <i>Erwinia carotovora</i> <i>Serratia</i> sp.
	Nocardicinas	<i>Nocardia uniformis</i> Subsp. <i>Tsuyamanensis</i>
 <p><b>Monolactam</b></p>	Monobactams	<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Pseudomonas acidophila</i>

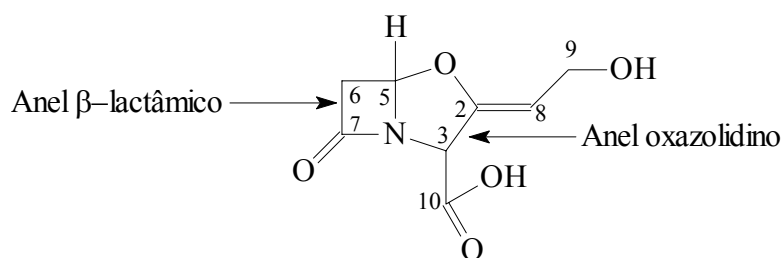
Figura 2.1. Subgrupos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, exemplo de antibióticos e microrganismos produtores (Brakhage, 1998)

Os compostos que inibem a atividade de  $\beta$ -lactamases são chamados bloqueadores ou inibidores. Ao reagir com o centro ativo da enzima, os inibidores a inativam e a destituem de sua ação sobre os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Kurylowicz *et al.*, 1981).

## 2.2. Ácido Clavulânico

Devido ao aumento da resistência de algumas bactérias aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ao longo dos anos, houve a necessidade de encontrar inibidores de  $\beta$ -lactamases para serem utilizados em conjunto com esses antibióticos visando melhorar a sua eficiência. Atualmente, pode-se citar como inibidores de  $\beta$ -lactamases o valclavan, as clavamicinas e o ácido clavulânico, sendo todos do subgrupo “clavam” do grupo dos  $\beta$ -lactâmicos (Baggaley *et al.*, 1997).

O ácido clavulânico é formado pelos anéis  $\beta$ -lactâmico e oxazolidino, tal como visto na Figura 2.2.



**Figura 2.2. Fórmula estrutural do ácido clavulânico**

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

De acordo com Butterworth (1984), o ácido clavulânico possui uma baixa atividade bactericida e é normalmente utilizado junto com outro antibiótico, geralmente uma penicilina. Com isso, o ácido clavulânico é encontrado em medicamentos na forma de sais de metais alcalinos, como o clavulanato de potássio, em conjunto com antibióticos, como a amoxicilina.

A amoxicilina, p-hidroxi- $\alpha$ -aminobenzilpenicilina, é um dos antibióticos mais largamente utilizados devido ao fato de que a resistência bacteriana ao medicamento é limitada e também é aplicado contra uma grande variedade de infecções bacterianas (Davidson, 1999). Ela é análoga à ampicilina e também apresenta um amplo espectro de atividade antibacteriana contra muitos organismos gram-positivos e gram-negativos. Como outros membros desta classe de antibióticos, a amoxicilina exerce sua atividade biológica inibindo a biossíntese da parede celular das células bacterianas. Infelizmente, a amoxicilina não é resistente à penicilinase ( $\beta$ -lactamase) de forma que ela não é efetiva contra bactérias produtoras destas enzimas segundo Davidson (1999).

Atualmente, a combinação de ácido clavulânico com amoxicilina é o mais bem sucedido exemplo do uso de tradicionais antibióticos  $\beta$ -lactâmicos sensíveis às  $\beta$ -lactamases juntamente com substâncias inibidoras dessas enzimas (Mayer e Deckwer, 1996).

### 2.3. Biossíntese

Devido à similaridade entre as estruturas químicas do ácido clavulânico e penicilinas e cefalosporinas, também produzidas por *Streptomyces clavuligerus*, foi sugerido inicialmente que estes antibióticos  $\beta$ -lactâmicos teriam um mesmo intermediário em comum (Butterworth, 1984).

Fawcet *et al.* (1976) *apud* Butterworth (1984), propôs que o tripeptídeo  $\delta$ (L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina seria o precursor direto da biossíntese das cefalosporinas e penicilinas, o que não pode ser aplicado ao ácido clavulânico devido às diferenças entre a sua estrutura e dos demais antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

Vários estudos têm sido realizados para a elucidação da rota biossintética do ácido clavulânico, tanto no que se refere aos precursores para formação dos anéis  $\beta$ -lactâmicos e oxazolidino, assim como as enzimas envolvidas na biossíntese.

Elson *et al.* (1984) *apud* Butterworth (1984), sugeriram que parte da estrutura do ácido clavulânico seria oriunda do ácido glutâmico, e o glicerol seria o precursor do anel  $\beta$ -lactâmico (carbonos C5, C6 e C7 da Figura 2.2), sem qualquer rearranjo intermediário dos três carbonos.

Gutman *et al.* (1985) propuseram que o ácido clavulânico seria oriundo da junção entre a molécula de ácido  $\beta$ -hidroxipropiônico e de um aminoácido apropriado, que poderia ser o ácido glutâmico ou a ornitina.

Romero *et al.* (1986) avaliaram a influência da arginina, do ácido glutâmico e da ornitina na produção de ácido clavulânico e sugeriram que os três carbonos do anel  $\beta$ -lactâmico seriam originários do glicerol e os carbonos C2, C3, C8, C9 e C10 seriam derivados da ornitina, podendo esta ser sintetizada a partir da arginina ou do ácido glutâmico através do ciclo da arginina.

Valentine *et al.* (1993) concluíram em seus trabalhos que os carbonos C2, C3, C8, C9 e C10 são derivados da arginina. Baseando-se no fato de que um microrganismo incapaz de produzir arginina, a partir da ornitina, não produz ácido clavulânico e concluíram então, que a arginina seria o último precursor biossintese de produção de ácido clavulânico.

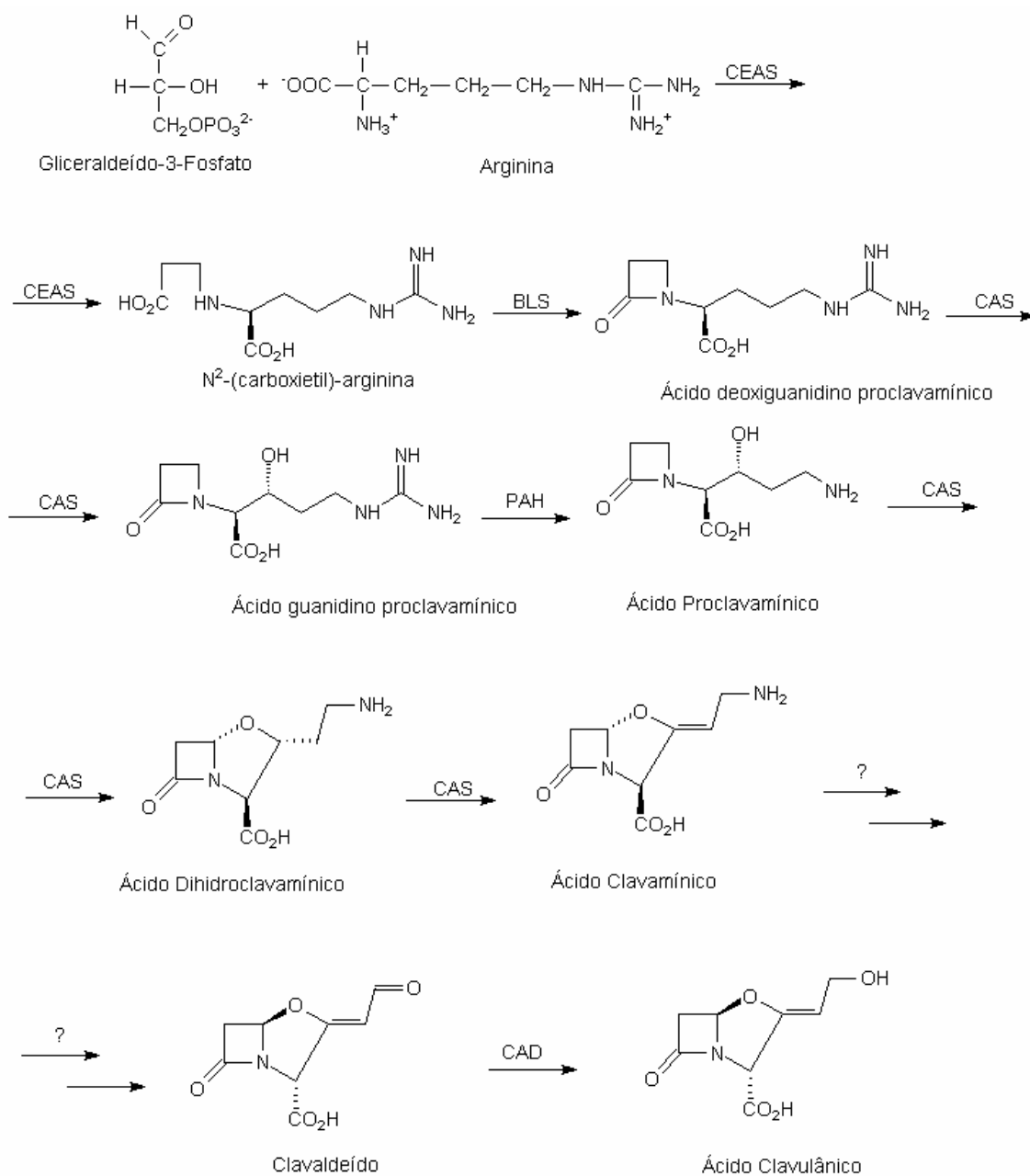
Ives e Bushell (1997) descreveram em seus trabalhos que os carbonos C5, C6 e C7 do ácido clavulânico seriam oriundos do piruvato, um produto resultante do metabolismo do glicerol.

Pitlik e Townsend (1997) sugerem em seus estudos que o piruvato seria o último precursor responsável pela formação dos carbonos C5, C6 e C7 ao invés do glicerol.

Bagalley *et al.* (1999), mostraram em seus estudos que a arginina é o precursor imediato do ácido clavulânico, juntamente com um composto de três carbonos, possivelmente um intermediário da via glicolítica.

Os primeiros passos da biossintese do AC foram finalmente elucidados em 1999, nos estudos de Jensen *et al.* (Patente US 08/134,018). Esses autores utilizaram combinações de técnicas genéticas e bioquímicas e descobriram os genes que codificam as enzimas envolvidas no início da biossintese. Em particular, a enzima carboxietilarginina sintetase (CEAS), envolvida na condensação da arginina e que utiliza o gliceraldeído 3- fosfato como substrato (Jensen *et al.*, 2000).

Na Figura 2.3 estão representados os precursores e as enzimas envolvidas na biossintese do AC conhecidos até o momento.



**Figura 2.3. Rota biossintética do ácido clavulânico e outros clavams (Elkins *et al.*, 2002)**

CEAS: N-carboxietilarginina sintase, BLS: β-lactam sintetase, CAS: clavaminato sintase, PAH: proclaminato amidino hidrolase, CAD: clavaldeído desidrogenase

## 2.4. *Streptomyces clavuligerus*

*Streptomyces clavuligerus* é uma bactéria filamentosa Gram-positiva, aeróbia estrita, pertencente ao grupo dos actinomicetos, é predominantemente encontrada no solo (Lechevalier, 1981), e a maioria das espécies do gênero *Streptomyces* cresce a uma temperatura de 28 a 45°C (Ballows *et al.*, 1991).

Esses microrganismos apresentam um ciclo de vida complexo, que inicia com a germinação de esporos, dando origem a um micélio vegetativo formado por hifas ramificadas (primárias) que penetram no substrato, metabolizando fontes orgânicas como polissacarídios, proteínas, lipídios e compostos aromáticos (Balows *et al.*, 1991) pela ação de enzimas extracelulares (Padilla, 1998 *apud* Pamboukian, 2003). Do micélio vegetativo é originado o micélio aéreo (hifas aéreas). As hifas aéreas passam por um processo de diferenciação morfológica que pode incluir septação e formação de esporos. Nessa fase, ativa-se o metabolismo secundário em que são produzidos principalmente antibióticos (Demain, 1989).

Romero *et al.* (1984) destacam que a característica mais importante da bactéria filamentosa *Streptomyces clavuligerus* é a sua capacidade de produzir antibióticos. Atualmente, sabe-se que esta bactéria é capaz de produzir cerca de 21 metabólitos secundários, incluindo vários compostos  $\beta$ -lactâmicos como a penicilina N, a cefamicina C, a desacetoxicefalosporina C e o ácido clavulânico.

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 (Balows *et al.*, 1991). Também não requerem vitaminas ou fatores de crescimento.

Os estreptomicetos, assim como outros actinomicetos, apresentam uma forma característica de instabilidade genética. Várias características, como formação de micélio aéreo e de esporos, produção de antibiótico e resistência, são irreversivelmente perdidas em uma frequência de 0,1 a 1% na progênie de colônias plaqueadas. A perda de função é resultado de deleção de grandes regiões de DNA (Lancini e Lorenzetti, 1993 *apud* Inoue, 2001).

O metabolismo geral dos actinomicetos pode estar relacionado com as condições de limitação de nutrientes dos solos, onde são frequentemente expostos a várias situações de desequilíbrio quanto à disponibilidade de nutrientes, variações de temperatura e dissecação. Em resposta as variações ambientais a que estão sujeitos, estes microrganismos desenvolveram estratégias como formação de esporos ou acúmulo de componentes de reserva, com o intuito de permitir sua sobrevivência sob estas condições. As substâncias de reserva servem como fonte de carbono e energia durante períodos de carência de nutrientes que normalmente predominam nestes ambientes (Alvarez *et al.*, 2002).



Os triacilgliceróis são excelentes materiais de reserva devido as suas propriedades hidrofóbicas, que permitem seu acúmulo em grandes quantidades na célula sem mudar a osmolaridade do citoplasma, e a oxidação dos triacilgliceróis produz um maior rendimento de energia em comparação com outros componentes de reserva tais como carboidratos e ácido polihidroxicarboxílico (PHA), desde que os átomos de carbono da metade acil dos triacilgliceróis estejam na sua forma reduzida (Alvarez *et al.*, 2002).

## **2.5. Regulação do Metabolismo Secundário**

As atividades metabólicas associadas ao crescimento celular compõem o metabolismo primário, onde os metabólitos produzidos (conhecidos como metabólitos primários) são principalmente enzimas, ácidos orgânicos e etanol, entre outros. No entanto, em muitos microrganismos, verifica-se a síntese de compostos não essenciais ao crescimento, os quais são produzidos no final da fase de crescimento ou durante a fase estacionária, esses compostos são denominados metabólitos secundários, sendo produzidos por diversos tipos de microrganismos (Vining, 1986).

A produção de metabólitos secundários geralmente é maior em condições de limitação de um ou mais nutrientes e os fatores envolvidos no controle do metabolismo secundário são complexos e de pouca compreensão (Demain e Fang, 1995).

A biossíntese de metabólitos secundários está intimamente relacionada ao metabolismo primário da célula produtora. Os precursores dos metabólitos secundários são, usualmente, metabólitos primários normais ou modificados (Martín e Liras, 1986).

### **2.5.1. Regulação por Fonte de Nitrogênio**

As fontes de nitrogênio usualmente favoráveis ao crescimento, como os sais de amônio, apresentam efeito negativo sobre o metabolismo secundário (Fang e Demain, 1995). A presença de amônia ou íon amônio em quantidade suficientemente elevada, isto é, não limitante, reprime as enzimas envolvidas na assimilação de outras fontes de nitrogênio, tais como aminoácidos e uréia, entre outros (White, 1995).

Butterworth (1984) relata que a farinha de soja é o nutriente mais importante na biossíntese de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*.

Estudos realizados por Romero *et al.* (1984), indicam que concentrações acima de 10 mM de sais de amônio e ácido glutâmico reduziram a biossíntese de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. O uso de aminoácidos em meios de cultura foi sugerido para suprir as necessidades de nitrogênio do microrganismo.

Em 1986, os mesmos autores realizaram estudos sobre a adição de ácido glutâmico, arginina e ornitina em meios de cultura, onde se relata a baixa produção de ácido clavulânico na presença de ácido glutâmico, em contraste com uma melhor produção observada na presença de ornitina e arginina, em torno de 20 mg.L<sup>-1</sup>.

Lebrihi *et al.* (1992) estudaram a inibição da enzima valina desidrogenase por íons amônio, na produção do antibiótico espiramicina por *Streptomyces ambofaciens*, verificando que o aumento da concentração de íons amônio causava a inibição desta enzima, envolvida no catabolismo de valina, leucina e isoleucina, aminoácidos que fornecem precursores para a biossíntese do antibiótico em questão.

Mayer e Decker (1996) descreveram a utilização de meios de cultura com farinha de soja ou extrato de farinha de soja como fontes de nitrogênio, na produção de ácido clavulânico. Nos cultivos em que se utilizou extrato de farinha de soja, a produção teve início já na trofofase. Já nos cultivos em que se utilizou farinha de soja, esta fonte mais complexa de nitrogênio fez com que a produção se iniciasse mais tarde, no entanto, as concentrações finais de ácido clavulânico foram superiores.

Jones *et al.* (1997) descreveram a não ocorrência de produtos oriundos de metabolismo secundários em cultivos de *Streptomyces clavuligerus* quando este é realizado sob condições de limitação de nitrogênio.

Valentine *et al.* (1999) descrevem em seus estudos o acúmulo de uréia oriunda da biossíntese do AC, mas também de outras fontes e que a presença de amônia em quantidades elevadas reprime as enzimas envolvidas na produção de AC.

### 2.5.1.1. Metabolismo dos Aminoácidos e o Ciclo da Uréia

Os aminoácidos livres originam-se da degradação das proteínas celulares e, na sua maioria são desaminados por transaminação, que é a transferência do seu grupo amino a um  $\alpha$ -cetoácido para produzir o  $\alpha$ -cetoácido do aminoácido original e um novo aminoácido. O grupo acceptor predominante é o  $\alpha$ -cetogluturato, produzindo glutamato e o novo  $\alpha$ -cetoácido. As enzimas que catalisam a reação são as transaminases. O glutamato é desaminado oxidativamente produzindo amônia e regenerando o  $\alpha$ -cetogluturato para uso em reações adicionais (Voet *et al.*, 2000)

Os aminoácidos são degradados a compostos que podem ser metabolizados até  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , ou usados na glicogênese.

Os aminoácidos padrões podem ser divididos em dois grupos, tendo como base suas rotas metabólicas:

- a) Aminoácidos glicogênicos, os quais são degradados a piruvato,  $\alpha$ -cetogluturato, succinil-CoA, fumarato ou oxaloacetato, sendo, portanto, precursores da glicose
- b) Aminoácidos cetogênicos, os quais são degradados a acetil-CoA ou acetoacetato e podem, então, ser convertidos em ácidos graxos ou em corpos cetônicos

Alguns aminoácidos são precursores tanto de carboidratos como de corpos cetônicos. A demonstração dos principais produtos da degradação de aminoácidos está ilustrada na Figura 2.4.

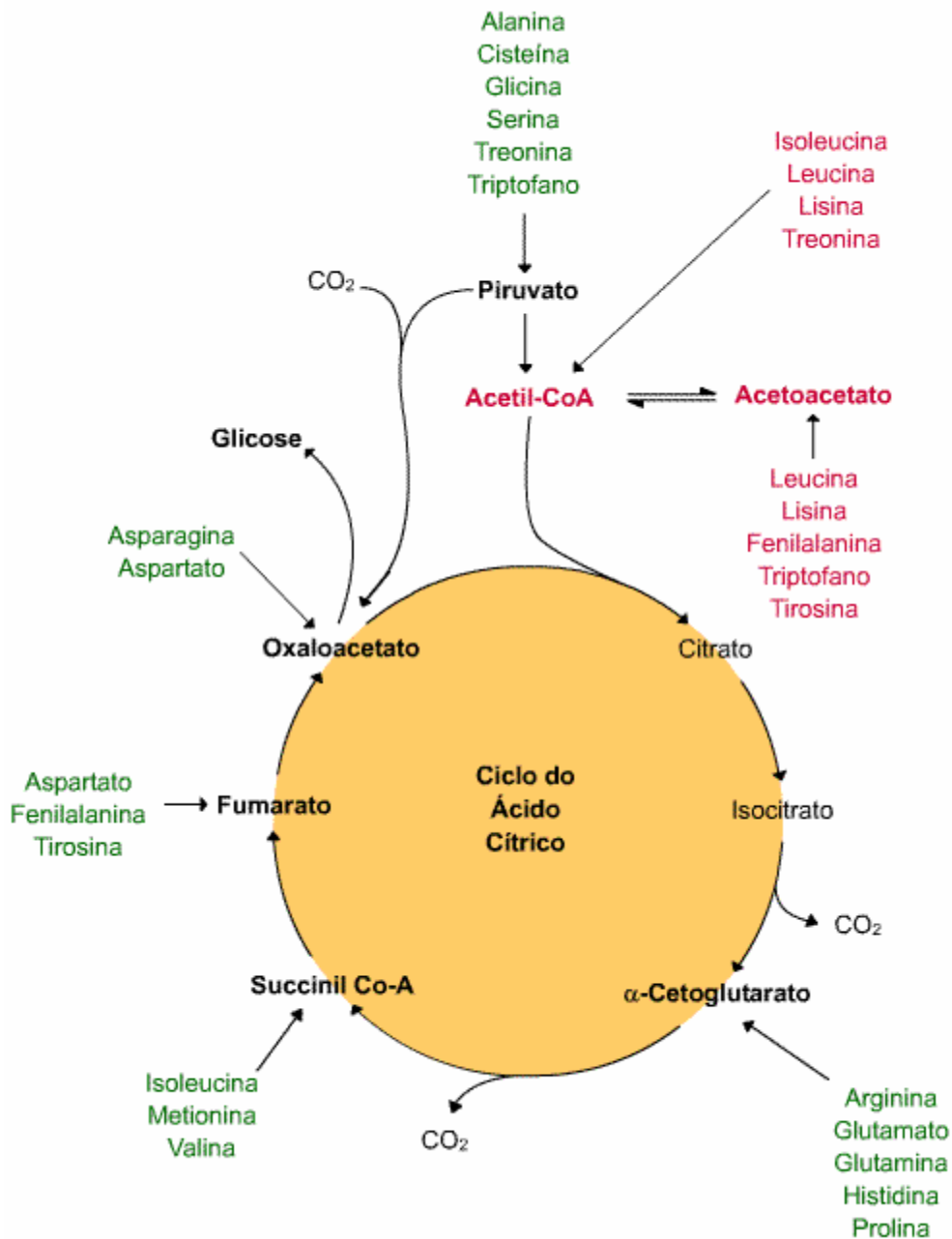


Figura 2.4. Degradação de aminoácidos (Voet *et al.*, 2000)

As principais vias do metabolismo de ácidos graxos e carboidratos, a  $\beta$ -oxidação e a glicólise, respectivamente, são gerais para todos os organismos, o que nem sempre acontece com o metabolismo dos aminoácidos em função de suas múltiplas e complexas rotas metabólicas.

No geral, os organismos vivos excretam o excesso de nitrogênio proveniente da quebra metabólica de aminoácidos valendo-se de uma entre três maneiras possíveis: podem

---

simplesmente excretar amônia; ou converter a amônia em produtos menos tóxicos, como a uréia e ácido úrico (Voet *et al.*, 2000).

No ciclo da uréia são convertidos dois grupos amino, um da amônia e outro proveniente do aspartato, e um átomo de carbono proveniente do CO<sub>2</sub> ao produto relativamente atóxico, que é a uréia, conforme demonstrado na Figura 2.5.

As atividades das enzimas do ciclo da uréia são controladas pelas concentrações de seus substratos, e quando uma delas se torna deficiente, o substrato correspondente é acumulado, aumentando a velocidade da reação deficiente de maneira que a velocidade de produção de uréia seja normal. No entanto, o acúmulo anômalo de substrato é aumentado ao longo de todas as etapas do ciclo até a amônia, resultando numa alta concentração desse composto. Já a ausência total de alguma enzima reguladora do ciclo da uréia é letal (Voet *et al.*, 2000).

O ciclo da uréia não é comum em procariotos e é requerido para remover a amônia das células nas concentrações em que esta é tóxica para as mesmas. Em 1996, Mendez e Hazell verificaram a presença e atividade das enzimas envolvidas no ciclo da uréia em suspensões celulares, preparados de lisados e membranas da bactéria *Helicobacter pylori*, sugerindo que esta bactéria usa o ciclo da uréia como um mecanismo efetivo para excretar o excesso de nitrogênio do interior delas.

Romero *et al.* (1986), reportaram a atividade de arginase em *Streptomyces clavuligerus*, sugerindo a existência do ciclo da uréia. Os autores indicam que o ciclo da uréia promove a biossíntese de arginina, que é usada como precursora na biossíntese de ácido clavulânico.

Valentine *et al.* (1999) detectaram o acúmulo de uréia em caldos de fermentação para produção de ácido clavulânico, e mencionaram a ocorrência de dois picos no perfil de pH durante os cultivos: primeiramente pela desaminação de aminoácidos que acarreta liberação de amônia, e o segundo pico corresponderia a desrepressão da enzima urease, que converte a uréia em amônia, elevando novamente o pH do meio de cultura.

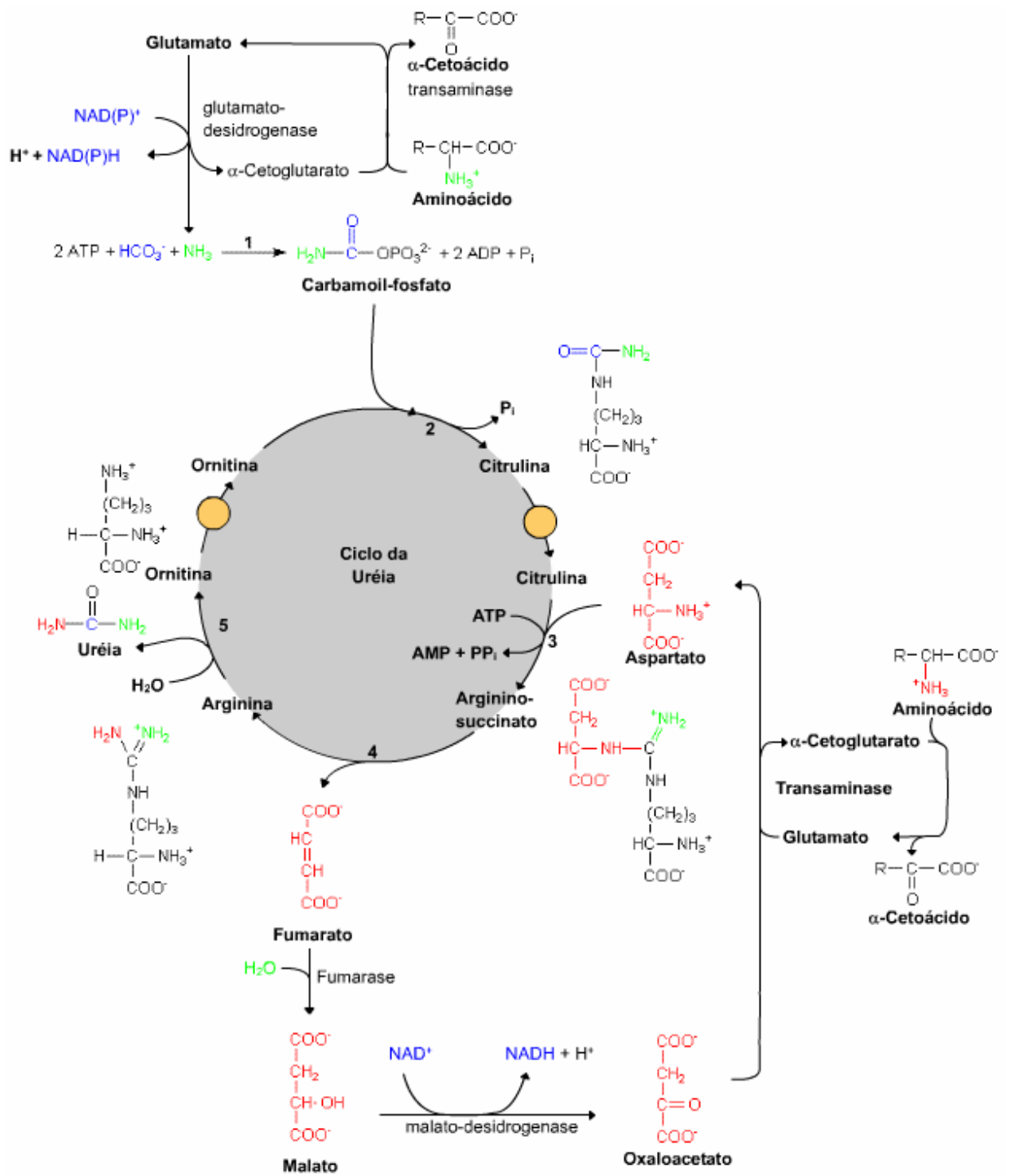


Figura 2.5. Ciclo da uréia (Voet *et al.*, 2000)

Enzimas: (1) carbamoyl-fosfato-sintetase, (2) ornitina transcarbamoylase, (3) arginino succinato-sintetase (4) arginino succinase e (5) arginase.

### 2.5.2. Regulação por Fonte de Fosfato

A importância da presença de fosfato no meio de cultura reside no fato de que este nutriente controla a síntese de ácidos nucleicos (DNA, RNA) e proteínas, o metabolismo de carboidratos, a respiração celular e os níveis de ATP (Martín, 1977 *apud* Inoue, 2001).

Geralmente a sua fonte principal são os fosfatos inorgânicos, mas os microrganismos também podem metabolizar alguns compostos orgânicos que contém fosfato (Moo-Young, 1985).

A presença de níveis elevados de fosfato no meio favorece o crescimento celular, influenciando de forma negativa a síntese de metabólitos secundários, limitando a síntese de indutores das vias biossintéticas de antibióticos.

Lebrihi *et al.* (1987) estudaram a influência do fosfato na produção de cefamicina C e ácido clavulânico e verificaram a repressão pelo fosfato, dos sistemas enzimáticos de biossíntese de ácido clavulânico e cefamicina C pelo fosfato.

### 2.5.3. Regulação por Fonte de Carbono

A glicose, que é uma eficiente fonte de carbono para crescimento microbiano, tem efeito negativo sobre a síntese de diversos metabólitos secundários (Vining, 1986). Fontes de carbono e energia de fácil assimilação favorecem o crescimento celular e os produtos do catabolismo acabam por reprimir as enzimas responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários (Drew e Demain, 1977). Polissacarídeos, oligossacarídeos e óleos constituem, freqüentemente, fontes de carbono mais eficientes para a produção destes metabólitos (Inoue, 2001).

Zhang e Demain, (1992) relatam que 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.

Diversos estudos têm sido realizados utilizando outras fontes de carbono e energia como o glicerol, óleos e amido para a síntese de antibióticos utilizando este microrganismo.

### 2.5.3.1. Óleos como Fonte de Carbono

Óleos são fontes de carbono de lenta assimilação, além de constituírem uma eficiente fonte de energia (Stanbury *et al.*, 1995).

Lipídios e óleos são considerados componentes essenciais do meio na indústria de antibióticos porque possuem propriedades naturais como antiespumantes, por apresentarem-se como uma fonte alternativa de carbono e, segundo Large *et al.* (1999), também podem aumentar a produção de metabólitos secundários.

Diversos pesquisadores tentaram elucidar a atuação dos óleos e seus ácidos graxos na produção de antibióticos.

Maccarty *et al.* (1955) estudaram os efeitos de óleos e ácidos graxos na produção de fungicromina por *Streptomyces cellulosae*. Ao realizarem experimentos em incubador rotativo, verificaram que quando o meio de cultivo apresentava glicose como fonte de carbono, a produção de antibiótico foi de aproximadamente 100 mg.L<sup>-1</sup> e quando utilizaram óleo de soja na mesma concentração, a concentração final de antibiótico foi de 1000 mg.L<sup>-1</sup>, no entanto, o uso simultâneo de óleo de soja e glicose resultou em uma concentração final de antibiótico de aproximadamente 2000 mg.L<sup>-1</sup>. Nos ensaios em fermentador, foi possível acumular produto somente quando foram utilizados glicose e óleo de soja, simultaneamente. Quanto aos ácidos graxos insaturados, os autores concluíram que o ácido linoléico e o ácido ricinoléico foram tóxicos nas condições empregadas e que somente o ácido oléico e seus ésteres foram efetivos na substituição do óleo de soja. Dentre os ácidos graxos saturados, apenas o ácido palmítico foi eficaz no aumento de produção, quando resultou num acúmulo de 600 mg.mL<sup>-1</sup> do antibiótico fungicromina.

Park *et al.* (1994a), estudaram a influência do óleo de soja na produção de cefamicina C por *Streptomyces sp* P6621, e observaram que elevadas concentrações iniciais de óleo de soja resultavam numa baixa produção, obtendo a máxima produção de cefamicina C (1,99 g.L<sup>-1</sup>) na menor concentração inicial de óleo estudada (7 g.L<sup>-1</sup>), que os autores relacionaram com o acúmulo de ácidos graxos livres no meio.

Park *et al.* (1994b) relatam que os produtos de decomposição do óleo de soja (glicerol e ácidos graxos insaturados) podem ser parcialmente consumidos pelas células e grande parte



é acumulada, agindo como inibidores na produção de Cefamicina C. Os autores identificaram o ácido linoléico como o mais tóxico para o microrganismo. Verificaram que concentrações de ácido linoléico acima de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  inibiam completamente o crescimento celular. Com isso, obtiveram uma linhagem mutante de *Streptomyces sp* com tolerância a concentrações maiores de ácido linoléico, verificando nos ensaios realizados uma produção 55% maior do que aquela resultante da linhagem selvagem.

Lee & Ho (1996), estudaram a utilização de várias fontes de carbono na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064), onde foi verificada uma maior produtividade de ácido clavulânico na presença de óleo de palma, como fonte de carbono e energia, na composição do meio de cultura.

Inoue (2001) estudou a influência da concentração inicial de óleo de soja e de seus principais ácidos graxos na produção de salinomicina através de fermentação submersa de *Streptomyces albus*. O autor constatou que nas condições iniciais empregadas (6,10,12% (p/v)), não foi verificada diferença significativa no crescimento celular e na concentração final do antibiótico, mas constatou que na concentração inicial de 6%, a quantidade de óleo consumido foi aproximadamente 16% menor em relação às demais concentrações iniciais, levando a um maior fator de conversão global de óleo em salinomicina.

Maranesi *et al.* (2005) estudou a influência de óleos vegetais (soja, milho e girassol) na produção de AC por *S. clavuligerus* em incubador rotativo verificando melhores resultados em termos de produção e produtividade em ácido clavulânico quando utilizou óleo de soja. Em seus experimentos, atingiu a produção de  $722 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido clavulânico em 120 horas de cultivo quando o meio de cultura continha  $23 \text{ g.L}^{-1}$  óleo de soja e glicerol como fonte de carbono suplementar.

### 2.5.3.2. Metabolismo dos Lipídios

Os lipídios são substâncias caracterizadas pela baixa solubilidade em solventes polares, e alta solubilidade em solventes apolares. São vulgarmente conhecidos como gorduras e suas propriedades físicas estão relacionadas com a natureza hidrofóbica de suas estruturas, sendo todos sintetizados a partir da acetil-CoA.

---

São encontradas diversas classificações para os lipídios na literatura especializada, entretanto, todas as classificações propostas baseiam-se em características comuns às diversas moléculas de lipídios existentes na natureza. Uma das classificações existentes seria quanto à presença ou não de ácidos graxos na sua composição.

Os lipídios com ácidos graxos em sua composição são saponificáveis, pois reagem com bases formando sabões. São as biomoléculas mais energéticas, fornecendo acetil-CoA para o ciclo de Krebs.

Os acilgliceróis (compostos com uma a três moléculas de ácidos graxos esterificados ao glicerol) e os fosfolipídios são os principais representantes deste grupo, seguidos por ceras, esfingolipídios e glicolipídios.

Os lipídios que não contêm ácidos graxos em sua composição não são saponificáveis. As vitaminas lipossolúveis e o colesterol são os principais representantes destes lipídios que não são energéticos porém desempenham funções fundamentais no metabolismo.

Os lipídios apresentam diversas funções biológicas: são elementos estruturais, atuam como modificadores de proteínas, constituem reserva energética e derivados de ácidos graxos atuam como hormônios ou mensageiros intracelulares (Stryer, 1996). Os triglicerídios constituem fonte de energia bastante concentrada, pois se encontram na forma anidra e em baixo grau de oxidação (Stryer, 1996). A combustão completa de um óleo típico leva à liberação de 8880 kcal/kg de óleo, enquanto a oxidação de glicose leva à liberação de 3722 kcal/kg (Bader *et al*, 1984).

Os ácidos graxos presentes nos sistemas biológicos apresentam, em geral, um número par de átomos de carbono, sendo mais comuns os ácidos graxos com 16 a 18 átomos de carbono (Stryer, 1996). Alguns exemplos são apresentados na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Alguns exemplos de ácidos graxos, com seus nomes comuns e fórmulas adaptada de Stryer (1996).

Átomos de Carbono	Ligações Duplas	Nome Comum	Fórmula
12	0	Ácido Láurico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14	0	Ácido Mirístico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16	0	Ácido Palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
18	0	Ácido Esteárico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
16	1	Ácido Palmitoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18	1	Ácido Oléico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18	2	Ácido Linoléico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18	3	Ácido Linolênico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
20	4	Ácido Araquidônico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

As propriedades dos ácidos graxos dependem do comprimento da cadeia, do seu grau de saturação e da presença ou não de ramificações. Os ácidos graxos insaturados apresentam menor ponto de fusão que os ácidos saturados com mesmo comprimento de cadeia. Os ácidos graxos de cadeia menor apresentam menor ponto de fusão, assim como os ácidos graxos de cadeia ramificada (White, 1995; Stryer, 1996).

A maioria dos triglicerídios naturais são mistos, isto é, apresentam dois ou três diferentes ácidos graxos por molécula.

Para que o lipídio seja utilizado como fonte de energia e carbono, é preciso que ocorra a hidrólise do triacilglicerol pela ação de lipases.

O glicerol liberado na hidrólise é fosforilado e oxidado à dihidroxiacetona fosfato, que então é isomerizado à gliceraldeído 3-fosfato. Este é um intermediário da vias glicolítica e glicogênica. Então o glicerol pode ser convertido à glicose ou piruvato, desde que em presença de enzimas apropriadas. O processo inverso também pode ocorrer, glicerol e intermediários glicolíticos são prontamente interconvertidos (Voet *et al.*, 2000).

Os ácidos graxos liberados na hidrólise do triacilglicerol são degradados numa seqüência de quatro reações, conhecida como  $\beta$ -oxidação.

Primeiramente ocorre a ativação do ácido graxo, numa reação ATP-dependente, catalisada pela acil-coA sintetase, formando a Acil-CoA graxa.

---

A Acil-CoA graxa formada é então degradada via  $\beta$ -oxidação, conforme demonstrado na Figura 2.6. A degradação ocorre de 2 em 2 carbonos e o produto obtido pode ser submetido a ciclos subseqüentes até que se complete a oxidação.

A primeira reação da degradação é a oxidação da Acil-CoA graxa catalisada pela flavoenzima Acil-CoA desidrogenase, levando a formação do enoil-CoA com uma ligação dupla trans entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$ .

O próximo passo é a hidratação da dupla ligação entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  pela enoil-CoA hidratase para formar a L-3-hidroxiacil-CoA.

A reação de oxidação pela L-3-hidroxiacil desidrogenase converte o grupo hidroxila do carbono  $\beta$  num grupo cetônico com geração de NADH.

Na última reação da  $\beta$ -oxidação, ocorre a clivagem entre os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  numa reação de tiólise com CoA, catalisada pela  $\beta$ -cetoacil-Coa tiolase para formar acetil-CoA e uma nova Acil-CoA contendo dois carbonos a menos que no início da  $\beta$ -oxidação.

Ácidos graxos insaturados (tais como o oléico) são submetidos às mesmas reações até que se forme o cis- $\Delta^3$  enoil-CoA que é então isomerizado a trans- $\Delta^2$  enoil-CoA pela ação de hidratase específica (Meirelles, 1997).

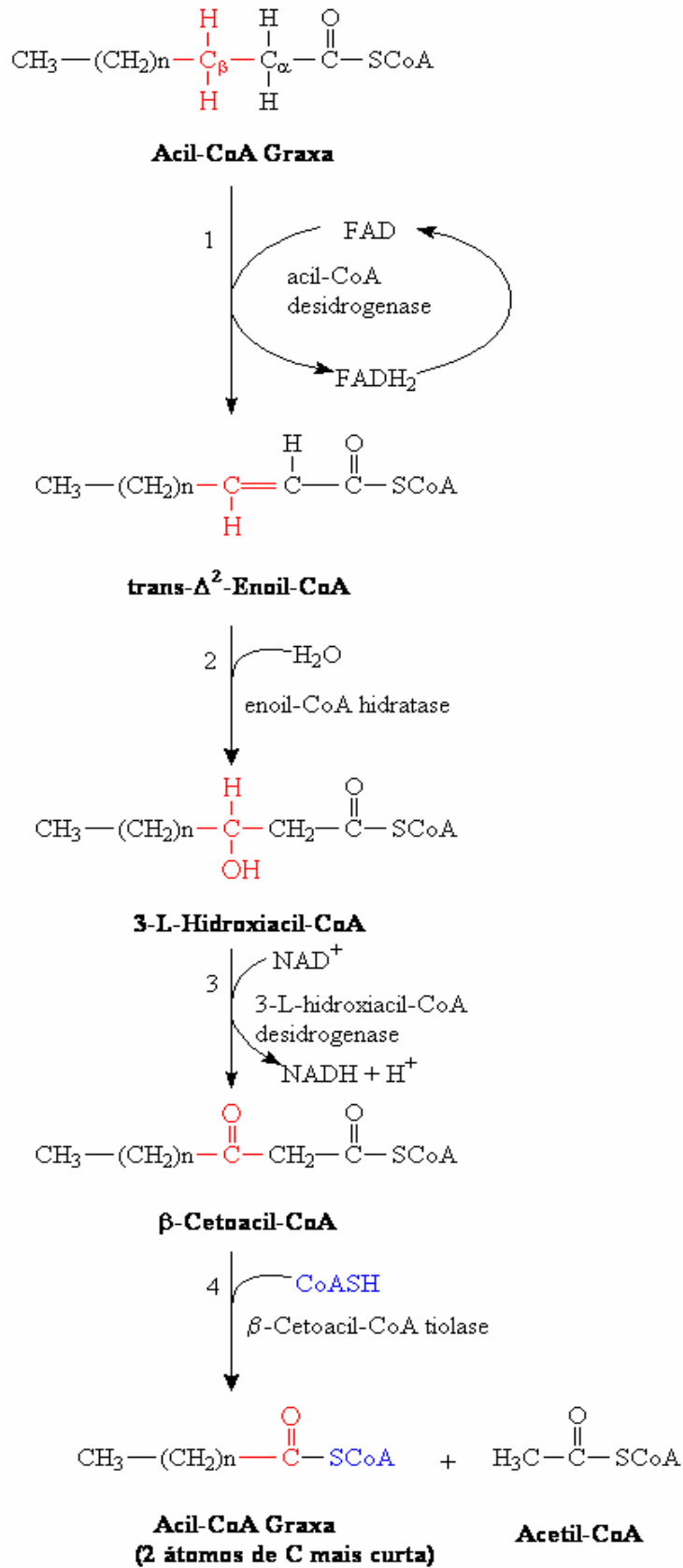
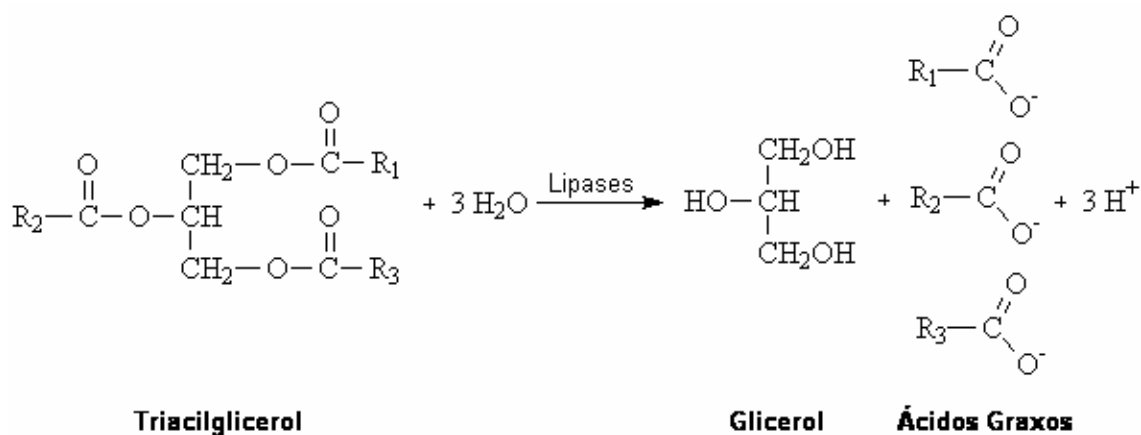


Figura 2.6. β- oxidação da Acil-Coa graxa (Voet et al., 2000)

### 2.5.3.3. Lipases

Para investigar a ligação entre os lipídios exógenos na fermentação e os precursores na síntese de antibióticos é preciso obter informações sobre as enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídios.

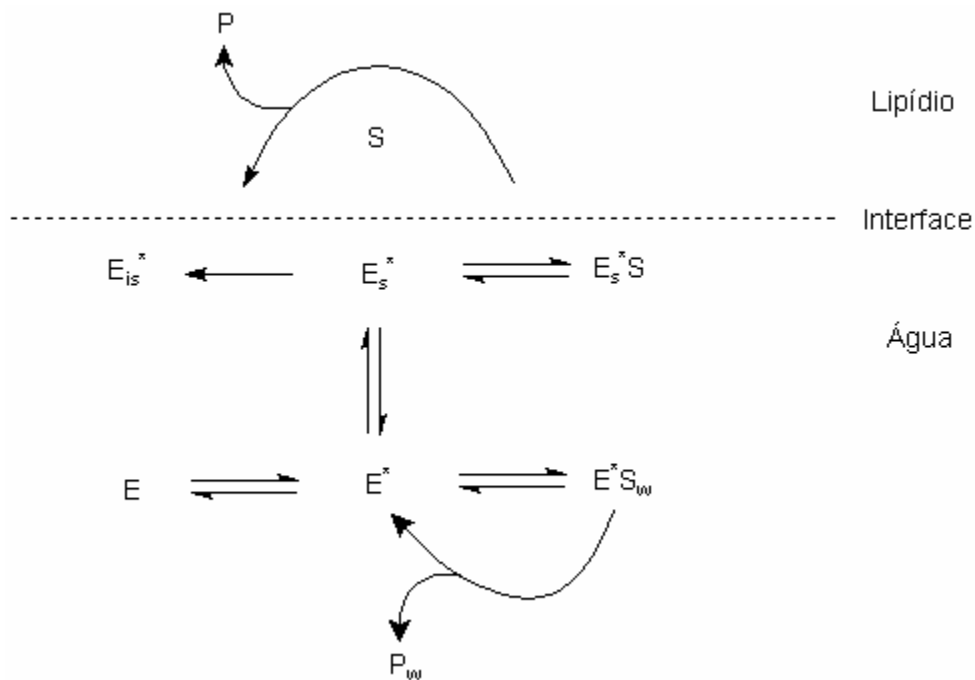
Lipases (glicerol éster hidrolase EC 3.1.1.3) são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis de cadeias longas de ácidos graxos, formando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Brocherhoff e Jensen, 1974, *apud* Meirelles, 1997).



**Figura 2.7. Reação de hidrólise do triacilglicerol catalisada por lipases (Stryer, 1996)**

Uma vez incorporados pelas células, os ácidos graxos entram no ciclo de  $\beta$ -oxidação para liberar acetil ou propionil coenzima A (CoA), que são precursores na formação de muitos antibióticos. Ainda, tal processo de hidrólise libera gradativamente moléculas de glicerol, que são consumidas como fonte de carbono e energia sem a ocorrência de repressão catabólica (Large *et al.*, 1999).

As lipases atuam na interface óleo – água, onde o primeiro substrato (S) reage com a enzima ( $E_s^*$ ) num passo de acilação para formar uma acil-enzima ( $E^*$ ) e o primeiro produto (P). O segundo substrato ( $S_w$ ), que geralmente é a água, então reage com a acil-enzima numa etapa de desacilação para formar o produto ( $P_w$ ) e a enzima livre. A representação da atuação das lipases está expressa na Figura 2.8.



**Figura 2.8. Atuação da lipase (Muralidhar *et al.*, 2002)**

(E: lipase dissolvida inativa; E\*: lipase dissolvida ativa; E<sub>s</sub>\*: lipase adsorvida ativa; E<sub>is</sub>\*: lipase adsorvida inativa; S<sub>w</sub>: substrato solúvel em água; S: substrato insolúvel em água; E\*xS<sub>w</sub> e E<sub>s</sub>\*S: complexos lipase-substrato; P<sub>w</sub> e P: produto na fase aquosa e lipídica, respectivamente).

Devido as lipases agirem na interface óleo-água, a velocidade de hidrólise é uma função direta da área superficial da interface. Em microrganismos onde a atividade da lipase está associada à célula, a interface seria a própria superfície celular e os ácidos graxos poderiam ser transportados diretamente para o interior da célula. Sob estas condições, não haveria acúmulo de ácidos graxos no caldo fermentativo, reduzindo os problemas de toxicidade.

O pH ótimo de atuação das lipases microbianas é entre 5,6 e 8,5 (Alford & Pierce, 1961), e a maioria das lipases tem temperatura ótima entre 30 e 40°C. Nos ensaios de Large *et al.* (1999), foi verificada a máxima atuação da lipase de *Streptomyces clavuligerus* em pH 7,4, sob condições de temperatura constante a 28°C.

Em termos de química enzima-substrato, a atividade das lipases pode ser dividida em tiposeletividade (habilidade para hidrolisar um tipo particular de éster de ácido graxo), regioseletividade (habilidade para hidrolisar grupos éster carboxílicos nas posições sn-1 e sn-3 quando comparadas com a posição sn-2) e estereoseletividade (habilidade para diferenciar dois enantiômeros num substrato racêmico).

Os mecanismos envolvidos na indução da atividade das lipases foram amplamente estudados (Gilbert *et al.*, 1991). Sabe-se que, qualquer que seja o microrganismo envolvido ou a localização da lipase, a fonte de carbono é essencial para a atividade da enzima, estimulando ou inibindo esta atividade. Gilbert *et al.* (1999) relata ainda que na composição do meio de cultura, a fonte de carbono a base de lipídios mostrou-se necessária para a produção de lipases, embora seu papel na síntese e estimulação destas enzimas não seja ainda bem entendido.

Nos estudos de Large *et al.* (1999), a atividade das lipases em *Streptomyces clavuligerus* foi detectada somente na presença de óleos. Os estudos ainda mostraram que se somente lipídio for usado como fonte de carbono, a atividade das lipases é detectada imediatamente, diferentemente da situação na qual o meio de produção não contém óleos, em que nenhuma atividade foi detectada, sugerindo, assim, que óleos induzem a síntese ou estimulam a atividade das lipases.

Peacock *et al.* (2003), também verificaram esse comportamento em cepas de *Streptomyces lividans* quando estudaram a produção do antibiótico *actinorhodin* utilizando glicose e trioleína como fontes de carbono.

A atividade das lipases é um fator importante para o desempenho do processo, pois, quando elevada, leva ao acúmulo de ácidos graxos livres no meio, os quais, acima de determinada concentração, podem levar à inibição do crescimento e da produção (Park *et al.*, 1994).

Com base nas informações da literatura citada quanto ao emprego de lipídios em caldos de fermentação para produção de diversos metabólitos secundários, o estudo do cultivo em batelada de *Streptomyces clavuligerus* para a produção de AC empregando essa fonte de carbono aliada à concentração ideal de fontes de nitrogênio presentes no meio de cultura de produção representa uma grande contribuição para o estudo do processo de produção deste importante fármaco.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais

##### 3.1.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, conservado na forma de células vegetativas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e suspensas em solução crioprotetora contendo 10% v/v de glicerol.

##### 3.1.2. Meios de Cultura

###### 3.1.2.1. Meio de Cultura de Reativação

Em todos os ensaios foi utilizado o meio de cultura de reativação proposto por Rosa *et al.* (2001), descrito na Tabela 3.1. O pH foi ajustado em 6,8 e o meio de cultura foi esterilizado a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

**Tabela 3.1.** Meio de cultura para reativação do microrganismo

	Concentração
Glicerol ( $\text{g.L}^{-1}$ )	15
Peptona bacteriológica ( $\text{g.L}^{-1}$ )	10
Extrato de levedura ( $\text{g.L}^{-1}$ )	1
Extrato de malte ( $\text{g.L}^{-1}$ )	10
MOPS ( $\text{g.L}^{-1}$ )	21
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	2,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	0,75
Solução de sais <sup>(1)</sup> ( $1\text{mL.L}^{-1}$ )	1

<sup>(1)</sup> Composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ):  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,0;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0; água destilada, q.s.p 1L.

### 3.1.2.2. Meios de Cultura de Produção

#### A) Ensaios Preliminares em Mesa Incubadora Rotativa

Inicialmente foram utilizados quatro meios de cultura de produção para verificar a influência da fonte e da concentração de nitrogênio, na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* (Tabela 3.2). O pH de cada meio de cultura foi ajustado em 6,8 e, então, estes foram esterilizados a 121°C por 15 minutos.

**Tabela 3.2.** Meios de cultura de inóculo e produção para avaliação da fonte e da concentração de nitrogênio.

	BS1	BS2	BS3	BS4
<sup>(1)</sup> Farinha de soja desengordurada (NT g.L <sup>-1</sup> )	1,6	3,2	-	-
Samprosoy 90NB	-	-	1,6	3,2
Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	10	10	10	10
Óleo de soja (g.L <sup>-1</sup> )	23	23	23	23
MOPS (g.L <sup>-1</sup> )	21	32,5	21	32,5
<sup>(2)</sup> Solução de sais (10 mL.L <sup>-1</sup> )	1	1	1	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	1,2	1,2	1,2	1,2

<sup>(1)</sup> Composição em nitrogênio total, <sup>(2)</sup>Composição vide Tabela 3.1

Como a farinha de soja desengordurada utilizada nestes ensaios apresenta em sua composição 50% p/p de proteína total e o hidrolisado protéico de soja, 92% p/p, foi fixada a concentração de nitrogênio total em 1,6 g.L<sup>-1</sup> para os meios de cultura BS1 e BS3; e para os meios de cultura BS2 e BS4, essa concentração foi fixada em 3,2 g.L<sup>-1</sup>.

Este procedimento foi adotado para garantir que os resultados em termos de produção de ácido clavulânico fossem exclusivamente em função da fonte e concentração de nitrogênio total empregados nos meios de cultura.

Numa segunda etapa, foram realizados dois ensaios em mesa incubadora rotativa, para avaliar a influência de concentração de lipídios na produção de ácido clavulânico. Nestes

ensaios, os meios de cultura de inóculo foram iguais ao do meio de cultura BS1. Após preparação do meio de cultura, o pH foi ajustado em 6,8, com posterior esterilização a 121°C por 15 minutos. As composições dos meios de cultura de produção dos ensaios BS5 e BS6 estão descritos na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3.** Meios de cultura de produção para avaliação da concentração de óleo de soja utilizado como fonte de carbono.

	BS5	BS6
<sup>(1)</sup> Farinha de soja desengordurada (NT g.L <sup>-1</sup> )	1,6	1,6
Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	10	10
Óleo de soja (g.L <sup>-1</sup> )	16	30
MOPS (g.L <sup>-1</sup> )	21	21
<sup>(2)</sup> Solução de sais (10mL.L <sup>-1</sup> )	1	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	1,2	1,2

<sup>(1)</sup> Composição em nitrogênio total, <sup>(2)</sup>Composição vide Tabela 3.1

## B) Ensaios em Biorreator de Bancada

Foram realizados seis cultivos em biorreator convencional de bancada, sendo que os meios de cultura de inóculo e produção estão representados na Tabela 3.4. Esses cultivos tiveram o objetivo de se avaliar a influência da concentração de nitrogênio e de lipídios em condições de agitação e aeração que assegurassem boa mistura ao meio reacional bem como suficiência de oxigênio aos microrganismos.

**Tabela 3.4.** Meios de cultura de inóculo e de produção para avaliação das concentrações da fonte de nitrogênio e de óleo de soja utilizado como fonte de carbono.

	BF1	BF2	BF3	BF4	BF5	BF6
<sup>(1)</sup> Farinha de soja desengordurada (NT g.L <sup>-1</sup> )	1,6	2,4	3,2	2,4	1,6	3,2
Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	10	10	10	10	10	10
Óleo de soja (g.L <sup>-1</sup> )	23	23	23	16	16	16
<sup>(3)</sup> MOPS (g.L <sup>-1</sup> )	21	21	21	21	21	21
<sup>(2)</sup> Solução de sais (10mL.L <sup>-1</sup> )	1	1	1	1	1	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
<sup>(4)</sup> Anti-espumante (g.L <sup>-1</sup> )	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

<sup>(1)</sup> Composição em nitrogênio total, <sup>(2)</sup>Composição vide Tabela 3.1, <sup>(3)</sup>utilizado somente na etapa de inóculo, <sup>(4)</sup> utilizado somente na etapa de produção.

## 3.2. Equipamentos

### 3.2.1. 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.

### 3.2.2. 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, por 15 minutos a 121°C.

### 3.2.3. Ultrafreezer

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

### **3.2.4. Mesa Incubadora Rotativa**

Ensaio preliminares, bem como as etapas de reativação e crescimento do microrganismo, foram realizados em mesa incubadora rotativa marca NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, INC., modelo G-25 com controles de temperatura e de frequência de rotação.

### **3.2.5. Centrífuga Refrigerada**

As amostras dos cultivos foram centrifugadas em centrífuga com refrigeração modelo 5403 da marca EPPENDORF, com capacidade para seis tubos, podendo conter até 35 mL cada um.

### **3.2.6. Medidor de pH**

Os valores de pH foram medidos com o uso de pH-metro de bancada marca ORION YSP710.

### **3.2.7. Reômetro**

Para as medidas reológicas foi utilizado o reômetro LV-DVIII+ de cilindros concêntricos marca BROOKFIELD ENGINEERING.

### **3.2.8. Biorreator de Bancada**

Os experimentos foram realizados em biorreator de bancada da NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, INC., modelo BIOFLO III com 4L de volume útil, com 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.

### 3.2.9. Cromatógrafo

Para a realização das análises de glicerol e ácido clavulânico foram utilizados dois sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência da marca WATERS.

A) Análise de glicerol: Sistema contendo duas bombas modelo 510, refratômetro W410 e injetor Rheodyne 7125.

B) Análise de ácido clavulânico: Sistema com duas bombas modelo 515, detector PDA W996, injetor automático com controle de temperatura modelo W7170s.

## 3.3. Metodologia Analítica

### 3.3.1. Análise da Concentração de Ácido Clavulânico

#### A) Método Espectrofotométrico (Bird *et al.*, 1982)

A concentração de ácido clavulânico foi analisada através do método químico proposto por Bird *et al.* (1982). O método consiste na análise espectrofotométrica ( $\lambda=311$  nm) do produto da derivatização de ácido clavulânico com imidazol.

O procedimento experimental foi o seguinte:

- Foram preparadas duas soluções diferentes (A e B) em tubos de ensaio, com uma dada amostra.

Solução A: adicionou-se 5 mL solução de imidazol (6 g em 100 mL, pH 6,8) a 1 mL de amostra, sendo o branco composto pela solução resultante da mistura de 5 mL de imidazol e 1 mL de água.

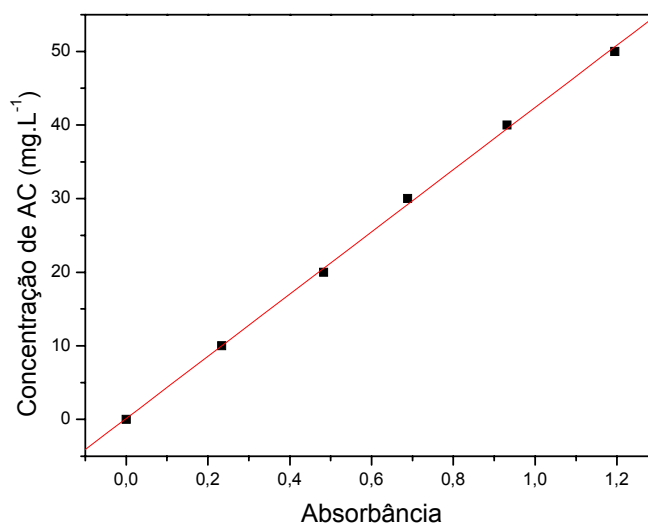
Solução B: adicionou-se 5 mL de água destilada a 1 mL de amostra, sendo o branco a água destilada.

- As soluções foram aquecidas por 15 min a 30°C.
- Resfriou-se as soluções e mediu-se as absorvâncias ( $\lambda=311$  nm) das soluções A e B.

É importante ressaltar que a relação entre as diferenças de absorvâncias e a concentração de ácido clavulânico é linear até 50 mg.L<sup>-1</sup>. Logo, as amostras tiveram que ser diluídas adequadamente para ficarem dentro desta faixa.

Para obtenção da curva de calibração, ilustrada na Figura 3.1, foram preparadas soluções padrões de clavulanato de potássio de 10, 20, 30, 40 e 50 mg.L<sup>-1</sup>. Os valores experimentais de concentração de ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e de diferenças de absorvância (Abs) foram relacionados por regressão linear, obtendo-se a seguinte equação de calibração (Equação 3.1):

$$C_{AC} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = 42,277 * \text{Abs} + 0,1197 \quad (R^2 = 0,9996) \quad \mathbf{3.1}$$



**Figura 3.1. Curva de calibração para determinação da concentração de AC**

Procedendo-se experimentalmente da mesma forma para as amostras, pôde-se obter os respectivos valores de concentração de ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) ao longo dos cultivos.

As amostras antes de serem analisadas foram submetidas à centrifugação a 4°C e 11000 rpm por 15 minutos, e a análise das mesmas se deu a partir do sobrenadante obtido.

### **B) Método Cromatográfico (Foulstone e Reading, 1982)**

Esse método baseia-se na determinação de um composto oriundo da derivatização do ácido clavulânico com imidazol, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Para a separação do composto derivatizado utilizou-se, como fase estacionária, uma coluna C-18  $\mu$ -Bondapak de 300 mm da Waters e uma fase móvel composta de 6% (v/v) de metanol e 94% (v/v) de tampão fosfato (0,1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH=3,2), a uma vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. Os picos foram detectados no comprimento de onda de 311 nm e tempo de retenção próximo à 5 minutos. As concentrações de ácido clavulânico foram determinadas a partir de uma curva de calibração obtida de solução estoque 50 mg.L<sup>-1</sup> de clavulanato de potássio em água (50, 75 e 100% v/v), oriundo do medicamento CLAVULIN<sup>®</sup> da Glaxo SmithKline Farmacêutica, disponível comercialmente.

Adotou-se o seguinte procedimento para cada amostra:

- A amostra foi centrifugada a 4°C e 11000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante obtido foi congelado a -70°C para análise após o término do cultivo.
- Após o término do cultivo, descongelou-se as amostras, dilui-se em tampão acetato (pH 4,5, 1:2) e novamente centrifugou-se a 4°C, 11000 rpm por 15 minutos, para retirada de sólidos em suspensão.
- Retirou-se uma alíquota de 0,5 mL da amostra e adicionou-se a 0,5 mL de imidazol ( 8,25 g em 50 mL, pH 6,8).
- A mistura reacional foi aquecida por 15 min a 30°C.
- Após a reação, a solução foi filtrada em membranas de 0,22  $\mu$ m.
- Colocou-se os tubos das amostras e da curva padrão no carrossel do cromatógrafo, sendo o sistema previamente estabilizado, no mínimo com 4 horas de antecedência.
- Os picos foram detectados a 311 nm e, de posse da curva padrão gerada, obteve-se os valores de concentração de ácido clavulânico para cada amostra.



$$C_{AC} \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = 2,71 \cdot 10^{-4} * \text{Área do pico} \quad (R^2 = 0,999) \quad \mathbf{3.2}$$

### 3.3.2. Análise de Glicerol

O glicerol foi quantificado também por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se uma coluna Shodex KS 802 Lonpak (WATERS), água Milli-Q como fase móvel e um refratômetro como detector. O equipamento foi operado a 80° C com uma vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A curva de calibração foi obtida com solução de glicerol em água com concentrações crescentes até 1 g.L<sup>-1</sup>. As amostras analisadas foram diluídas em água para ficarem nesta faixa de concentração e filtradas em membranas de 0,22 µm de diâmetro de poro.

### 3.3.3. Avaliação do Crescimento Celular

Devido à existência de sólidos insolúveis no meio de cultura, a concentração celular foi avaliada indiretamente a partir de medidas reológicas do caldo fermentativo utilizando um reômetro BROOKFIELD ENGINEERING modelo LV-DVIII+. Com os dados obtidos e da relação entre a tensão ( $\tau$ ) e a velocidade de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ), dada pela equação 3.3, pôde-se traçar gráficos de  $\tau$  por  $\dot{\gamma}$  e, através de um método de regressão não linear, determinar K (índice de consistência) e n (índice de comportamento de escoamento), que são os parâmetros utilizados, neste caso, para se avaliar o crescimento celular a partir de correlações entre essas duas variáveis.

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad \mathbf{3.3}$$

De posse dos valores de K, que é diretamente proporcional à concentração celular, (Cx), é possível se ter uma estimativa do crescimento microbiano, isto é, quanto maior o valor de K, maior a concentração celular.

### 3.3.4. Determinação da Concentração de Lipídios

Os lipídios totais presentes no meio de produção foram quantificados pelo método baseado na reação da sulfofosfovanilina (Postma e Stroes, 1968). Neste método, os lipídios da amostra reagem com ácido sulfúrico, formando o íon “carbonium”, que reage com o grupamento carbonil ativado do reagente de cor (ácido fosfórico e vanilina), produzindo um complexo de cor rosa, estabilizado por ressonância, cuja absorvância medida em 537 nm é diretamente proporcional à concentração de lipídios na amostra.

O procedimento consistiu em adicionar a tubos de ensaio com 0,2 mL de amostra, 4 mL de ácido sulfúrico concentrado. Essa mistura foi homogeneizada e colocada em banho fervente por 10 minutos, seguido de resfriamento em água gelada por mesmo período. A mistura foi novamente homogeneizada e transferiu-se uma alíquota de 0,2 mL para tubos de ensaio (para o branco foram adicionados 0,2 mL de ácido sulfúrico concentrado), com posterior adição de 4 mL solução de ácido fosfórico 85% p/v e 1 mL de vanilina 0,6% p/v (reagente de cor). Os tubos foram agitados e colocados em banho a 37°C por 15 minutos.

Foram lidas as absorvâncias em 537 nm e a curva de calibração foi obtida com o meio de cultura de produção utilizado em cada ensaio, com concentrações crescentes de óleo de soja comercial até 30 g.L<sup>-1</sup>.

### 3.3.5. Determinação de Carboidratos Totais

Os carboidratos totais foram determinados pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Este método consiste na adição de fenol e ácido sulfúrico concentrado que resultam numa coloração alaranjada na presença de carboidratos.

Transferiu-se 1 mL de amostra para tubos de ensaio, seguido de adição de 1 mL de fenol 5% p/v e ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram deixados em repouso por 15 minutos e depois colocados em banho com aquecimento a 30°C por 15 minutos. A absorvância foi lida em 488 nm e a curva de calibração foi obtida com solução de lactose em água com concentrações variando de 10 a 160 mg.L<sup>-1</sup>.

### 3.4. Procedimento Experimental

#### 3.4.1. Ensaio em Mesa Incubadora Rotativa

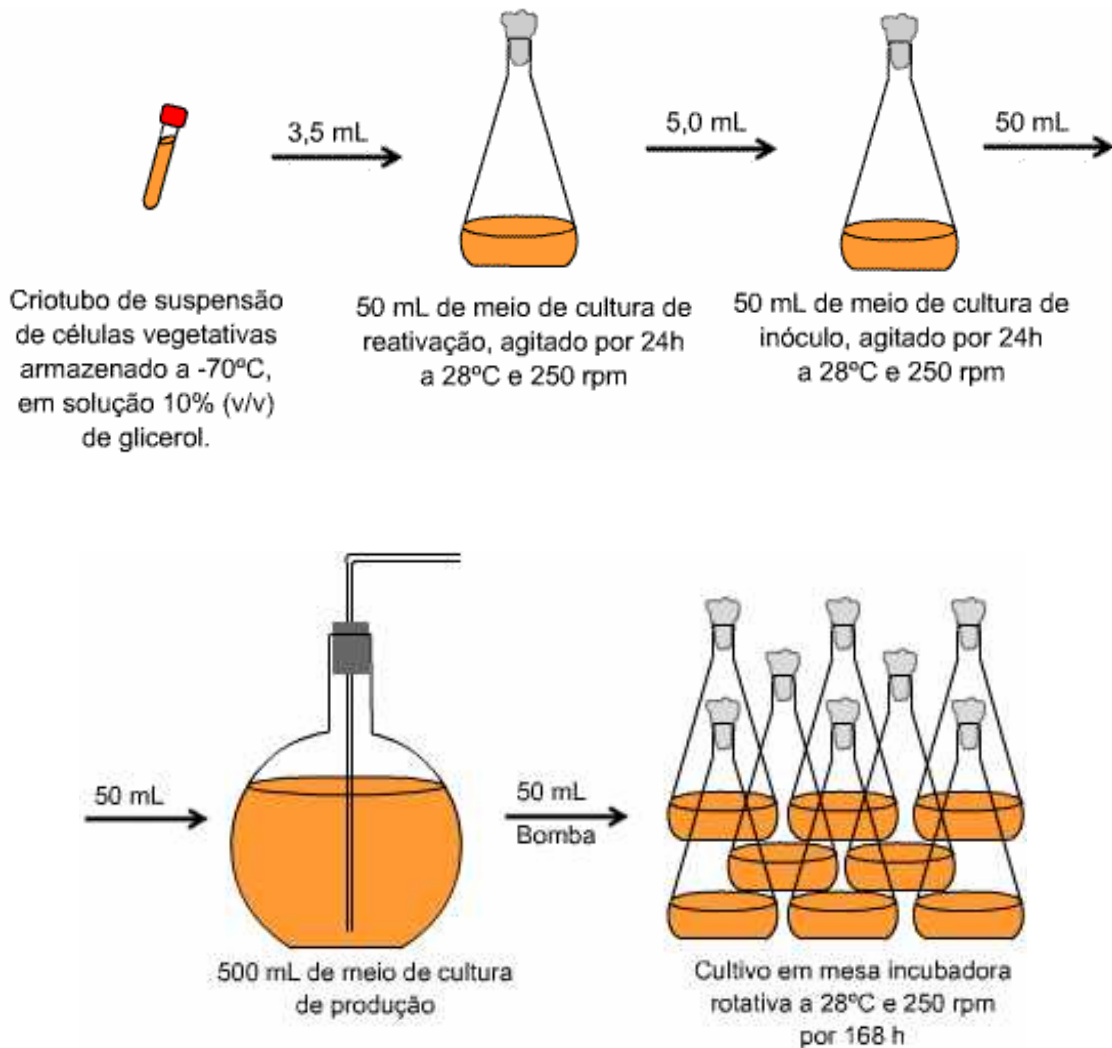
Inicialmente foram realizados ensaios em mesa incubadora rotativa para a determinação de meio de cultivo apropriado para a continuidade do trabalho em biorreator de bancada.

O procedimento para a realização dos experimentos foi descrito por Rosa *et al.*(2002). Os ensaios consistiram em três etapas: reativação do microrganismo, crescimento e produção.

Primeiramente, 3,5 mL de suspensão de células vegetativas de *S. clavuligerus* mantidos em criotubos foram inoculados em Erlenmeyers de 500 mL contendo 50 mL de meio de reativação e estes então foram incubados por 24 horas a 28°C e 250 rpm.

Posteriormente, 5 mL de suspensão foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL contendo 45 mL de meio de cultura de inóculo, de mesma composição do meio de cultura principal. Esta etapa foi realizada a 28°C e 250 rpm por 24 horas.

Na etapa de produção, transferiu-se o volume de suspensão de inóculo numa relação de 10% v/v, para um balão de 3 L contendo o meio de cultura de produção. Volumes de 50 mL foram bombeados individualmente para erlenmeyers de 500 mL e mantidos em agitação em mesa incubadora rotativa a 28°C e 250 rpm, dando início aos ensaios. O esquema experimental dos ensaios em mesa incubadora rotativa está representado na Figura 3.2.



**Figura 3.2. Esquema experimental para os cultivos em mesa incubadora rotativa**

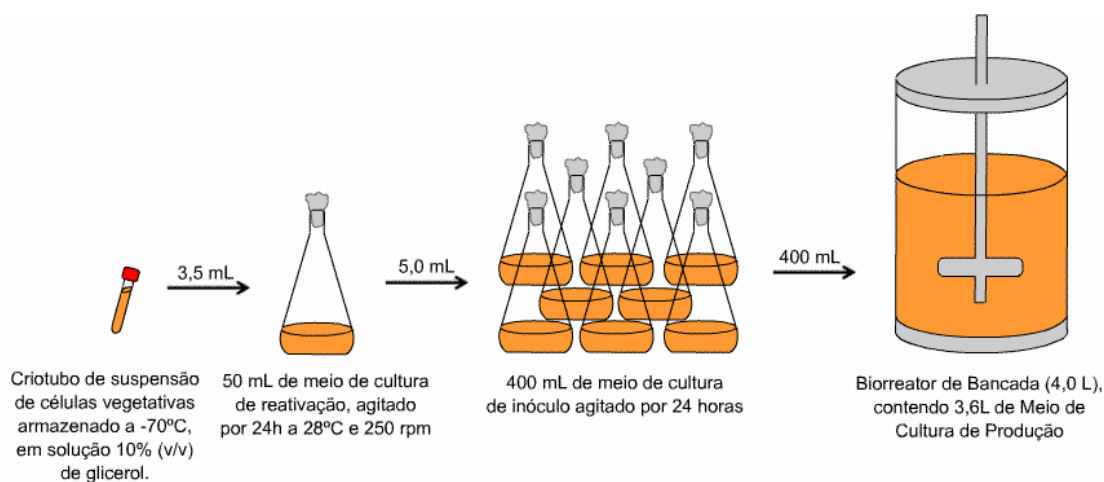
Os cultivos tiveram aproximadamente 168 horas de duração, retirando-se amostras de 12 em 12 horas, que foram analisadas quanto às concentrações de glicerol, ácido clavulânico, lipídios totais, bem como a realização das caracterizações reológicas do mesmo.

### 3.4.2. Experimentos em Biorreator Convencional de Bancada

Foram realizados experimentos em biorreator convencional de bancada de 4 L de volume útil. As condições utilizadas durante os cultivos foram: 800 rpm,  $28^{\circ}\text{C}$ , 0,5 vvm e pH 6,8.

O procedimento para a realização dos ensaios em biorreator foi semelhante ao descrito para os ensaios em mesa incubadora rotativa, somente diferenciado pelos volumes de meio de cultura no reator (3,6 L) e de inóculo (0,4 L) e pelo controle de pH por adição de soluções de HCl (2M) e NaOH (1M) já que o meio de cultura utilizado no biorreator foi isento de MOPS.

O procedimento experimental pode ser visualizado na Figura 3.3



**Figura 3.3. Esquema experimental para os cultivos em biorreator de bancada**

As amostras foram coletadas do biorreator em intervalos de 6 a 8 horas, onde foram realizadas as caracterizações reológicas da mesma e análises de concentração de ácido clavulânico, glicerol e lipídios totais após centrifugação. Salienta-se que as análises de ácido clavulânico foram realizadas imediatamente após cada amostragem, sendo este o parâmetro determinante para o término do cultivo. As amostras provenientes dos cultivos para análise de concentração de ácido clavulânico, lipídios totais e glicerol foram centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$ , 11000 rpm por 15 minutos. As amostras que não puderam ser prontamente analisadas, foram congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Ensaios em Mesa Incubadora Rotativa

Conforme descrito no item 3.1.2.2, estes ensaios foram realizados preliminarmente com o intuito de definir a concentração e a fonte de nitrogênio, bem como a concentração ideal de óleo de soja do meio de cultura de produção para a etapa posterior de cultivos, realizados em biorreator de bancada.

#### A) Avaliação da Fonte e Concentração de Nitrogênio

##### 4.1.1. Ensaio BS1

Os resultados encontrados estão ilustrados no gráfico da Figura 4.1. Neste ensaio utilizou-se 20 g.L<sup>-1</sup> de farinha de soja (equivalente a 1,6 g.L<sup>-1</sup> de nitrogênio total) e 23 g.L<sup>-1</sup> de óleo de soja na composição do meio de cultura.

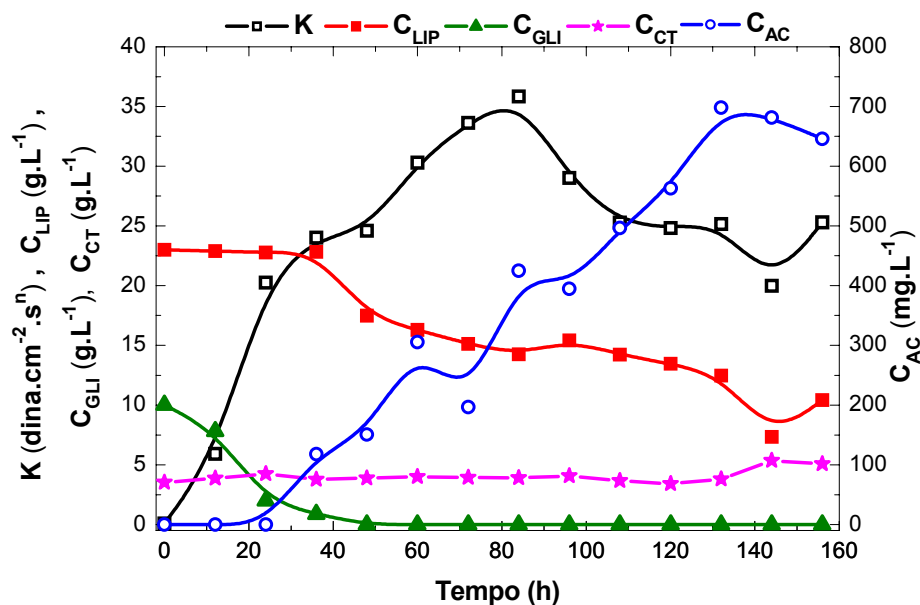


Figura 4.1. Perfis de concentração de lipídios (C<sub>LIP</sub>), glicerol (C<sub>GLI</sub>), ácido clavulânico (C<sub>AC</sub>), carboidratos totais (C<sub>CT</sub>) e índice de consistência (K) do ensaio BS1

Analisando a Figura 4.1, verifica-se que a produção de ácido clavulânico teve início quando a concentração de glicerol se encontrava em valores baixos, esgotando-se por volta de 30 horas.

Em relação à concentração de ácido clavulânico, o valor máximo alcançado foi de 700 mg.L<sup>-1</sup> em 132 horas de cultivo. Esse resultado é o melhor obtido até o presente momento na literatura em cultivos em mesa incubadora rotativa, acima do encontrado por Wang *et al.* (2004), cerca de 670 mg.L<sup>-1</sup> em cultivo com adição do aminoácido ornitina.

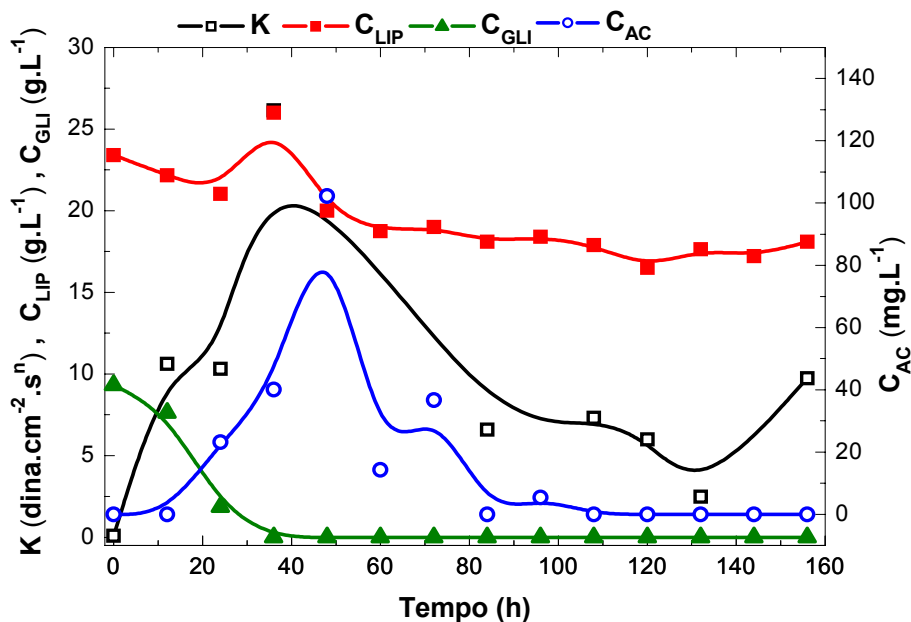
Quanto à concentração de carboidratos totais presentes na farinha de soja, pode-se observar que não houve consumo durante o cultivo, evidenciando que as fontes de carbono preferenciais foram glicerol e óleo e que o principal papel da farinha de soja foi servir como fonte de nitrogênio no meio de cultura.

Neste ensaio, o consumo de lipídios pelo microrganismo se deu após o término do glicerol, ou quando este se encontrava em pequenas concentrações. Isto evidencia um comportamento diáuxico no processo fermentativo, ocorrendo inicialmente o uso da fonte de carbono de fácil assimilação para o crescimento celular e a ativação do metabolismo secundário, e a subsequente utilização de uma fonte complexa, no caso o óleo de soja, para crescimento, manutenção celular e produção do composto desejado.

O índice de consistência, K, que representa de forma relativa o crescimento celular, apresentou um perfil marcado por altos valores, chegando a 35 dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup> em 84 horas e mantendo-se acima de 20 dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup> até o final do cultivo.

#### **4.1.2. Ensaio BS2**

No cultivo BS2, cujos resultados estão ilustrados no gráfico da Figura 4.2, verificou-se um comportamento semelhante ao cultivo BS1 em todos os parâmetros avaliados, durante as primeiras 40 horas do processo fermentativo.



**Figura 4.2. Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e índice de consistência ( $K$ ) do ensaio BS2**

Principalmente no que se refere à concentração de glicerol presente no meio de cultura, o consumo foi semelhante ao verificado no cultivo BS1, evidenciando uma preferência de consumo por fonte de carbono de fácil assimilação no início da fase de crescimento celular.

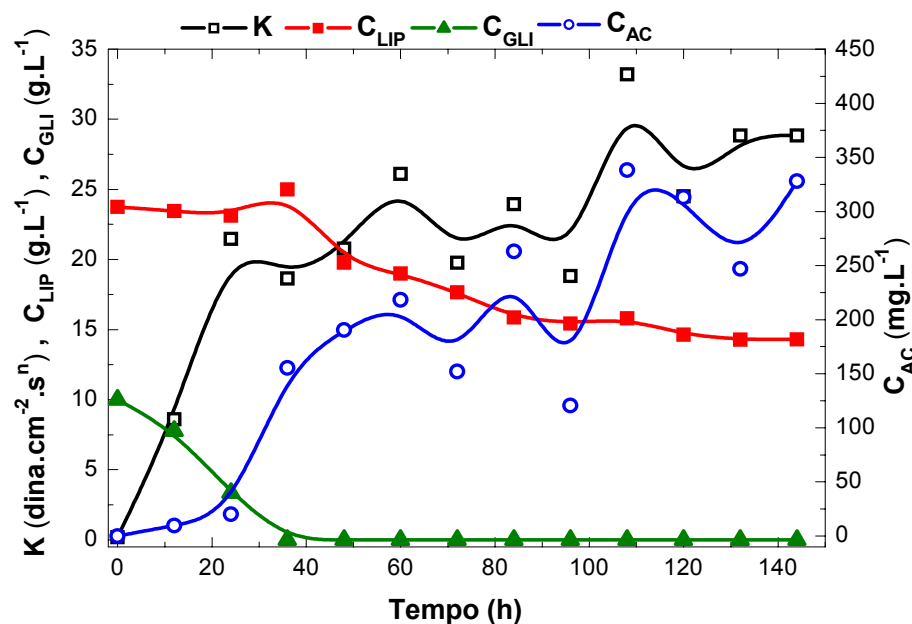
Neste cultivo, novamente houve consumo de óleo de soja pelas células, mesmo que menor, resultando numa grande quantidade de óleo residual. Este fato pode estar associado ao baixo crescimento celular, com um valor de  $K$  máximo em torno de 20 dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup> em 40 horas, seguido de pronunciada queda até o final do cultivo, evidenciando acentuado declínio da concentração celular.

Apesar da adição de uma maior concentração do tampão MOPS, 32 g.L<sup>-1</sup> na composição do meio de cultura de produção, não foi possível assegurar a manutenção do pH em 6,8, considerado ótimo para crescimento de *Streptomyces clavuligerus* e produção de ácido clavulânico, o que refletiu principalmente na baixa produção de ácido clavulânico (100 mg.L<sup>-1</sup>), seguida de acentuada degradação.



### 4.1.3. Ensaio BS3

No cultivo BS3, a fonte de nitrogênio original foi substituída por Samprosoy 90NB, um hidrolisado protéico de soja, na mesma concentração de nitrogênio total do cultivo BS1. Os resultados estão expressos na Figura 4.3.



**Figura 4.3. Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e índice de consistência ( $K$ ) do ensaio BS3**

De acordo com a Figura 4.3, pode-se verificar que a máxima concentração obtida de ácido clavulânico foi  $338 \text{ mg.L}^{-1}$  em 110 horas, decrescendo depois desse período. Este resultado foi em torno de 50% do máximo obtido na mesma concentração de nitrogênio total quando empregou-se a farinha de soja como fonte de nitrogênio, demonstrado no ensaio BS1.

Apesar da menor concentração de ácido clavulânico verificada neste ensaio, o perfil de crescimento celular, indicado pelo índice de consistência,  $K$ , foi muito semelhante ao do cultivo BS1, indicando que as condições do cultivo foram favoráveis ao crescimento.

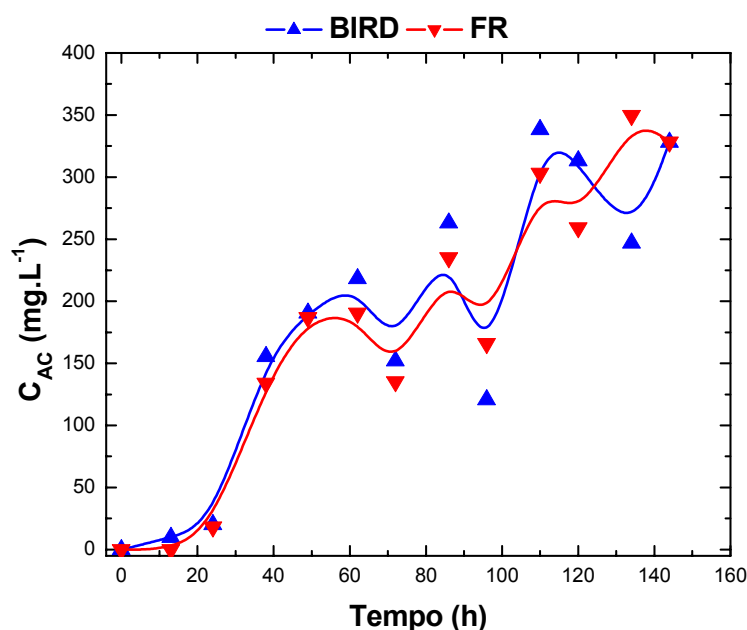
O perfil de concentração de lipídios no meio foi similar aos anteriores, com início do consumo após o término do glicerol, com um residual de aproximadamente  $14 \text{ g.L}^{-1}$  no final do cultivo.

Conforme anteriormente mencionado, o cultivo BS3 apresentou na sua composição uma concentração de nitrogênio total de  $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ , diferenciando-se do cultivo com meio BS1, apenas pela fonte de nitrogênio empregada.

Em trabalhos anteriores realizados no DEQ-UFSCar, a utilização de Samprosoy 90NB gerou bons resultados, sendo adotado como fonte de nitrogênio padrão para os ensaios de produção de ácido clavulânico.

Neste trabalho, na presença de óleo de soja, apresentou rendimento muito inferior em contraste com os ótimos resultados obtidos com a farinha de soja.

Foi então proposta a confirmação dos dados de concentração de ácido clavulânico pelo método proposto por Foulstone e Reading (1982), (HPLC), reconhecidamente confiável e amplamente utilizada em trabalhos de produção de ácido clavulânico reportados na literatura atual. Os resultados comparativos estão expressos no gráfico da Figura.4.4.



**Figura 4.4. Comparação dos resultados de concentração de ácido clavulânico pelos métodos de Bird *et al.*, (1982) e Foulstone e Reading, (1982)**

Analisando-se o gráfico da Figura 4.4, pode-se perceber que os resultados de concentração de ácido clavulânico quando foi empregada a metodologia proposta por Bird *et al.* (1982) foram ligeiramente superiores às obtidas quando empregou-se a metodologia

proposta por Foulstone e Reading, (1982), e a diferença foi maior para as amostras com maior concentração de ácido clavulânico.

Cabe ressaltar alguns pontos importantes quanto à curva apresentada:

As análises pelo método espectrofotométrico foram realizadas imediatamente após a amostragem, sem congelamento das mesmas, exceto para os dois pontos correspondentes as 96 e 120 horas de cultivo. Essas amostras foram inicialmente analisadas pelo método de Bird *et al.* (1982), depois foram preservadas congeladas até o final do cultivo, sendo depois a analisadas pelo método cromatográfico. Depois de realizada análise cromatográfica, e as amostras terem sido novamente congeladas, foi verificado que a diluição empregada na análise inicial (espectrofotométrico) estava incorreta, devido a alta concentração de sólidos em suspensão presente nestas amostras, resultando em altas absorbâncias, fora da faixa de linearidade da curva padrão. Então a amostra foi novamente descongelada, diluída e re-analisada pelo método do Bird *et al.* (1982).

O efeito da degradação do ácido clavulânico pelo congelamento da amostra, mesmo que pequeno, ficou evidente quando o último ponto da curva foi coincidente, justamente porque nesse momento foi possível realizar a análise simultaneamente pelas duas metodologias, sem a necessidade de congelar a amostra para preservação.

Os resultados desse cultivo nem poderiam ser diferentes, observando-se que as duas metodologias baseiam-se no mesmo princípio de derivatização do ácido clavulânico com imidazol, gerando um produto estável cuja absorbância pode ser lida em 311 nm e relacionada com a concentração de ácido clavulânico presente na amostra.

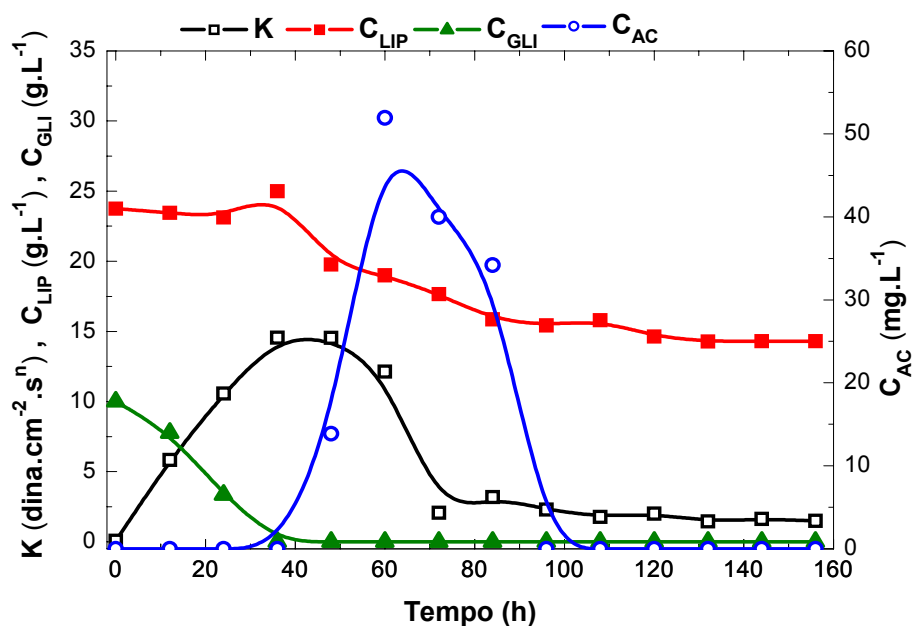
Com base nesses resultados e levando em consideração a facilidade de manuseio das amostras com um menor número de etapas e pela possibilidade de realizar as análises prontamente após a amostragem, sem a necessidade de congelamento, foi adotada a metodologia de Bird *et al.* (1982) como padrão para todos os ensaios, sem qualquer necessidade de confirmação por HPLC, observando necessariamente alguns cuidados.

Para evitar a repetição de erros na diluição das amostras pelo método espectrofotométrico, foi adotada a diluição padrão 1:25 para todas as amostras. Essa diluição mostrou-se adequada, pois no início do cultivo onde há menores concentrações de ácido clavulânico, há também uma maior concentração de sólidos em suspensão, elevando as

leituras de absorvância do branco e da amostra. Já ao longo do cultivo, com menores concentrações de insolúveis, há o aumento da concentração de ácido clavulânico, que a absorvância pode ser lida dentro da faixa de linearidade da curva. A necessidade de diluir a amostra numa maior razão deverá observar a máxima absorvância lida na curva padrão, no caso para concentração de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido clavulânico.

#### 4.1.4. Ensaio BS4

Os resultados do ensaio BS4, equivalente em concentração de nitrogênio total do cultivo BS2, no entanto utilizando proteína isolada em substituição à farinha de soja, estão expressos na Figura 4.5.



**Figura 4.5. Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e índice de consistência ( $K$ ) do ensaio BS4**

Neste ensaio, os perfis de concentrações de lipídios, glicerol e de índice de consistência apresentaram o comportamento similar aos anteriores, porém a concentração máxima de ácido clavulânico, em torno de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  em 60 horas, foi marcadamente inferior a todos os cultivos, o que pode ter ocorrido por diversos motivos, entre eles a inibição pela

---

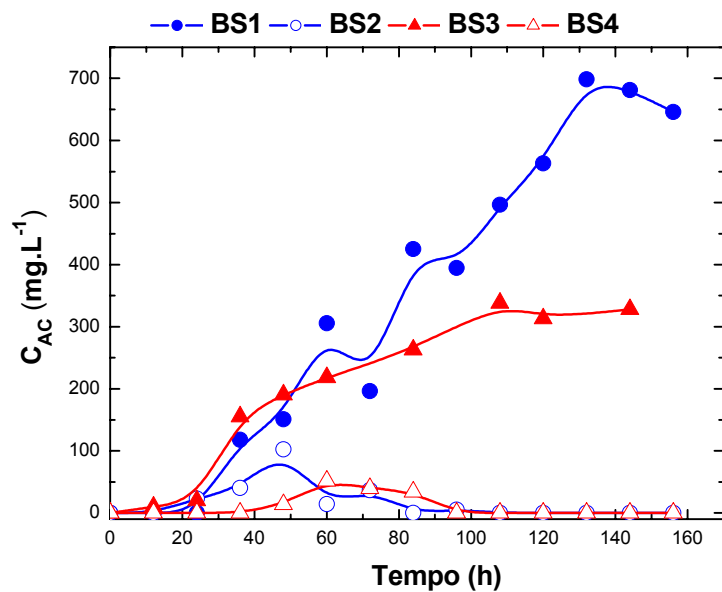
concentração de nitrogênio presente no meio, a degradação do ácido clavulânico em pHs alcalinos e até mesmo limitação por oxigênio dissolvido em cultivos em mesa incubadora rotativa.

#### **4.1.5. Comparação dos ensaios BS1, BS2, BS3 e BS4**

Nos cultivos BS2 e BS4 em mesa incubadora rotativa, o principal problema foi a manutenção do pH em 6,8, o valor ótimo para a produção de ácido clavulânico. Nesses cultivos o pH permaneceu por mais horas de cultivo na faixa de pH alcalino. Mayer e Decker (1996) relataram que o pH é um dos fatores de maior influência no bioprocessamento de produção de ácido clavulânico, devido a esse produto degradar em grande velocidade em pHs ácidos e alcalinos.

Comportamento similar com flutuações de pH foi verificado por Chen *et al.* (2003), quando foi investigada a produção de ácido clavulânico em mesa incubadora rotativa com arginina e ornitina na composição do meio de cultura. No trabalho citado, foi utilizado extrato protéico de soja, com alimentações de ornitina (0,25 mmol) e arginina (0,25 mmol) em intervalos de 12 horas e os autores relacionaram o aumento do pH com a possível produção de amônia pelas células.

Os resultados dos quatro cultivos quanto à concentração de ácido clavulânico estão expressos na Figura 4.6.



**Figura 4.6.** Perfis de concentração de AC pra os cultivos BS1, BS2, BS3 e BS4 em mesa incubadora rotativa

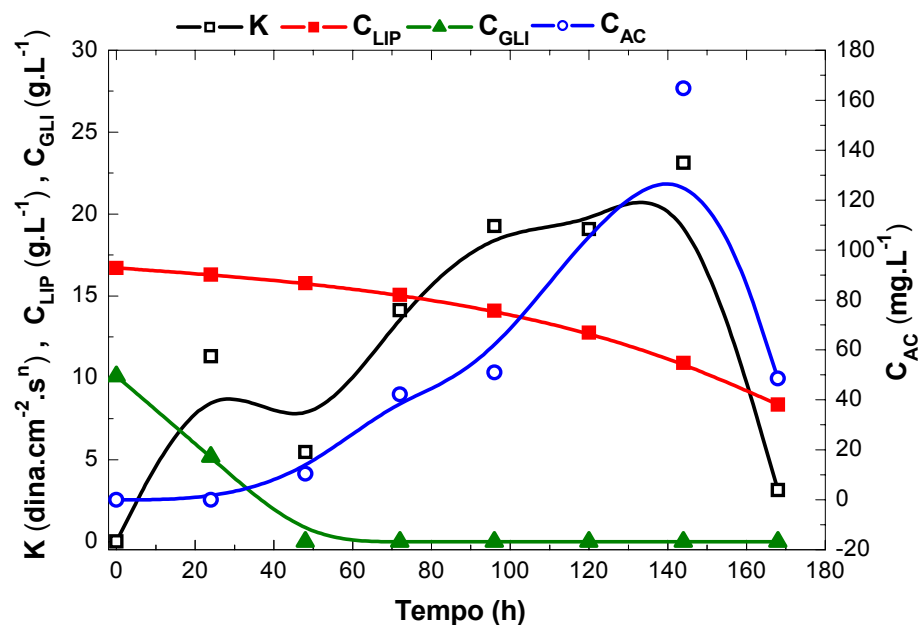
Analisando-se o gráfico da Figura 4.6, observa-se o melhor desempenho do cultivo BS1. Este meio de cultura com farinha de soja na menor concentração de nitrogênio total avaliada ( $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ ), possibilitou a manutenção do pH em valores próximos a 6,8 ao longo de todo o cultivo, apresentou também um bom crescimento microbiano, gerando uma maior produção de ácido clavulânico, sendo, portanto, o meio de cultura adotado como padrão para ser utilizado na segunda etapa do trabalho, em cultivos em biorreator de bancada.

### **B) Avaliação da Concentração de Lipídios**

Definido o meio de cultura de produção para o prosseguimento do trabalho (BS1), foram avaliadas diferentes concentrações de óleo de soja, para verificação desta variável na produção de ácido clavulânico.

#### 4.1.6. Ensaio BS5

A Figura 4.7. ilustra o gráfico dos resultados encontrados no cultivo BS5 em que se utilizou o meio de cultura com 20 g.L<sup>-1</sup> de farinha de soja (1,6 g.L<sup>-1</sup> de nitrogênio total) e óleo de soja na concentração de 16 g.L<sup>-1</sup>)



**Figura 4.7. Perfis de concentração de lipídios (C<sub>LIP</sub>), glicerol (C<sub>GLI</sub>), ácido clavulânico (C<sub>AC</sub>) e índice de consistência (K) do ensaio BS5**

Foi observado que no cultivo BS5, com menor concentração de óleo de soja, (16 g.L<sup>-1</sup>), o índice de consistência, K, alcançou valores pouco abaixo dos que foram observados no experimento BS1, indicando um bom crescimento microbiano.

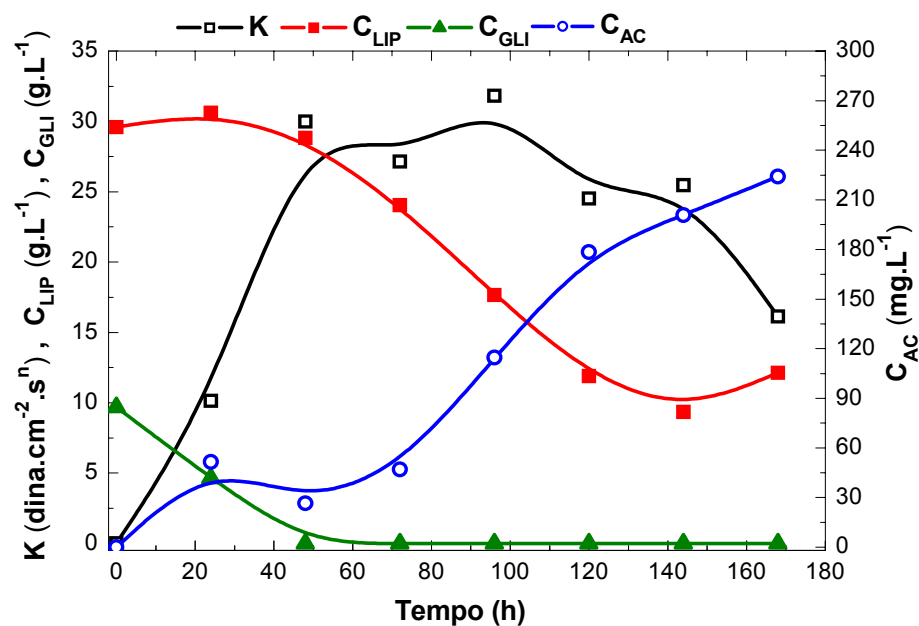
Quanto ao consumo total de lipídios, este foi de apenas 8 g.L<sup>-1</sup>, ou seja, a concentração de óleo residual foi similar à verificada nos cultivos anteriores, com maior concentração inicial de óleo (23 g.L<sup>-1</sup>).

Como neste cultivo apresentava composição similar ao cultivo BS1, com 1,6 g.L<sup>-1</sup> de nitrogênio total, a concentração do tampão MOPS adicionada foi de 21 g.L<sup>-1</sup>, que ao contrário do que foi verificado no cultivo BS1, não foi suficiente para manutenção do pH em 6,8.

A máxima produção de ácido clavulânico obtida foi de 165 mg.L<sup>-1</sup> em 144 horas, seguida de acentuada degradação, em consonância com o máximo valor de índice de consistência 23 dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>.

#### 4.1.7. Ensaio BS6

No cultivo BS6 foi avaliada a influência da maior concentração de óleo de soja (30 g.L<sup>-1</sup>) na produção de ácido clavulânico, sendo os resultados ilustrados no gráfico da Figura 4.8.



**Figura 4.8.** Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e índice de consistência ( $K$ ) do ensaio BS6

No cultivo BS6, o índice de consistência ( $K$ ) alcançou maiores valores do que o verificado no cultivo BS5, o que mostra um bom crescimento do microrganismo. Quanto à concentração máxima de ácido clavulânico, em torno de 225 mg.L<sup>-1</sup> (168 horas), nota-se que está bem abaixo daquele observado no cultivo BS1. Novamente houve problemas na manutenção do pH em 6,8. Houve um consumo maior de óleo de soja (18 g.L<sup>-1</sup>) e o pH alcançou maiores valores no final do cultivo, quando a concentração de óleo residual apresentou valores constantes. Isso pode evidenciar que os ácidos graxos livres liberados no meio podem ajudar na manutenção do pH, mas ao longo do cultivo, o acúmulo destes pode causar efeitos de inibição, reduzindo a biossíntese do ácido clavulânico.



## 4.2. Ensaio em Biorreator

Partindo-se da condição da composição do meio de cultura do cultivo BS1, com farinha de soja como fonte de nitrogênio, foram realizados cultivos em biorreator de bancada, variando-se concentrações de fonte de nitrogênio e de óleo de soja para avaliação de produção de AC em condições controladas de pH por adição de ácido e base.

### 4.2.1. Ensaio BF1

Os resultados do cultivo BF1, com meio de cultura com  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de farinha de soja e  $23 \text{ g.L}^{-1}$  de óleo de soja estão ilustrados no gráfico da Figura 4.9. Neste cultivo foi empregado o mesmo meio de cultura de produção BS1, com o intuito de verificar a produção de ácido clavulânico do meio de cultura que gerou os melhores resultados em mesa incubadora rotativa.

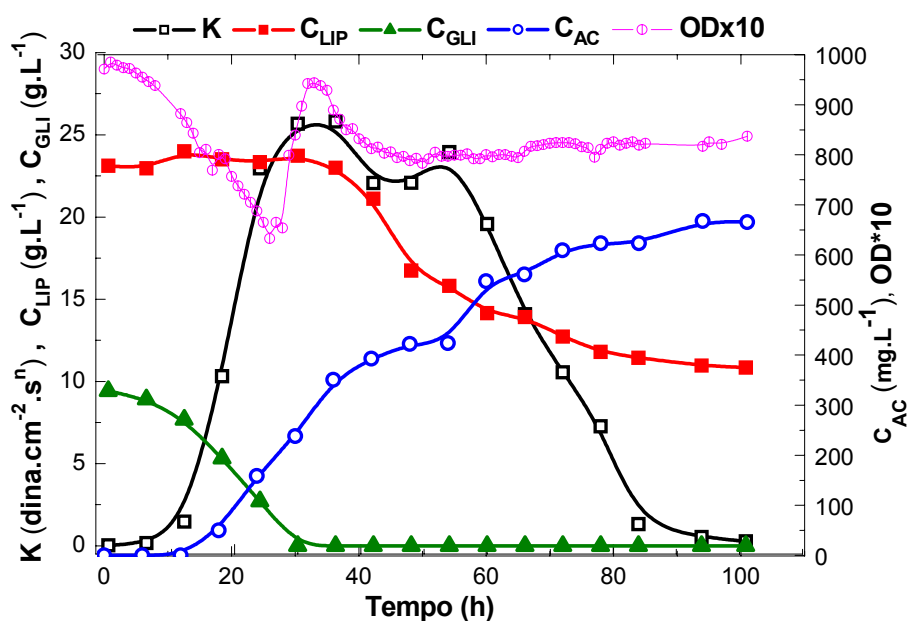


Figura 4.9. Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ), índice de consistência ( $K$ ) e concentração de oxigênio dissolvido ( $OD$ ) do ensaio BF1

Observando-se a Figura 4.9, pode-se verificar que o consumo de glicerol pelas células se deu nas primeiras 30 horas de cultivo, evidenciando o comportamento apresentado em todos os cultivos em mesa incubadora rotativa.

Foi verificado também que a concentração de oxigênio dissolvido (OD) teve seu valor mínimo coincidente com a exaustão do glicerol. Após esse período, a concentração de OD voltou a aumentar chegando até o máximo de 94%, e novamente diminuiu durante a fase de consumo de óleo de soja, permanecendo em torno de 80% até o final do cultivo, indicando que não houve limitação por falta de oxigênio dissolvido.

O máximo valor do índice de consistência (k) obtido foi  $25 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ , permanecendo por longo período acima de  $20 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ . Este perfil de crescimento celular foi verificado no ensaio em mesa incubadora rotativa com mesma composição do meio de cultura (BS1).

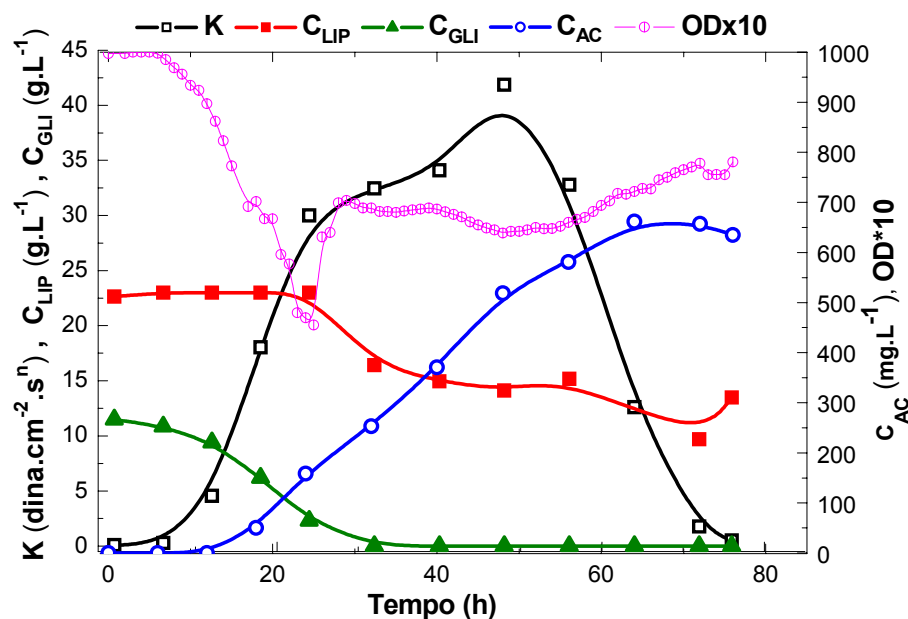
O consumo de lipídios, como verificado nos cultivos anteriores, se deu imediatamente após o consumo do glicerol, sem que fosse necessária qualquer adaptação do microrganismo para o consumo desse substrato. Este comportamento também foi verificado por Large *et al.* (1999).

A concentração de óleo residual foi em torno de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , semelhante ao que foi verificado em mesa incubadora rotativa, com consumo total em torno de  $13 \text{ g.L}^{-1}$ .

A produção máxima de ácido clavulânico obtida ( $670 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foi similar ao verificado em ensaio em mesa incubadora rotativa, no entanto em 94 horas de cultivo, evidenciando que com essa composição de meio de cultura, a produção em mesa incubadora rotativa foi prejudicada pela falta de oxigênio fazendo com que a produção máxima fosse alcançada num tempo maior de cultivo.

#### **4.2.2. Ensaio BF2**

O ensaio BF2 foi realizado utilizando meio de cultura com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de farinha de soja ( $2,4 \text{ g.L}^{-1}$  de nitrogênio total) e  $23 \text{ g.L}^{-1}$  de óleo de sojas estando os resultados apresentados no gráfico da Figura 4.10.



**Figura 4.10.** Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ), índice de consistência ( $K$ ) e concentração de oxigênio dissolvido ( $OD$ ) do ensaio BF2

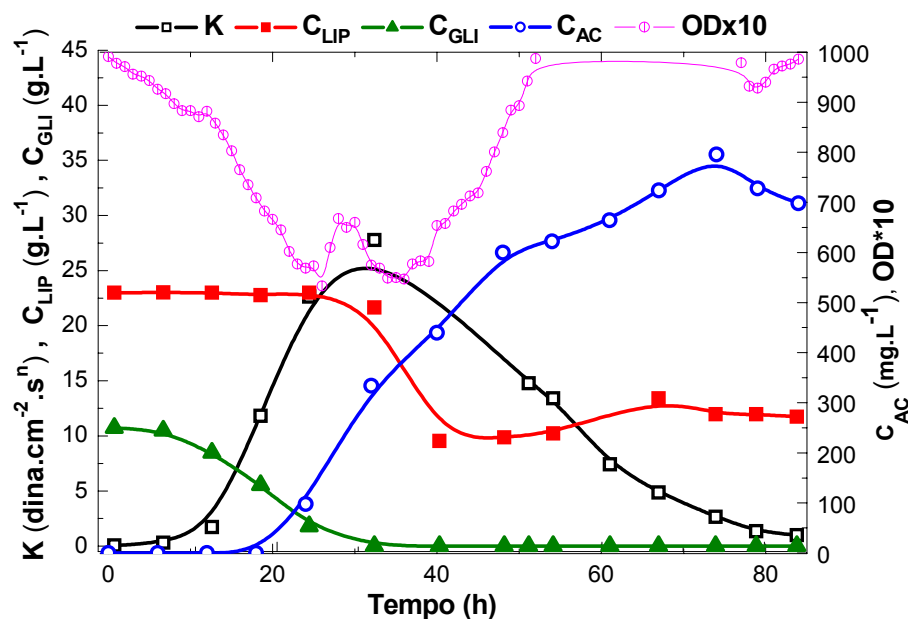
Este cultivo foi marcado pela alta viscosidade do caldo de fermentação, com um  $K$  máximo próximo de  $42 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ , permanecendo por um longo período acima de  $30 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ .

O aumento da concentração de farinha de soja refletiu diretamente no crescimento celular, mas não influenciou no consumo de óleo de soja, resultando numa alta concentração de óleo residual, em torno de  $13 \text{ g.L}^{-1}$ .

A produção de ácido clavulânico máxima obtida foi de  $657 \text{ mg.L}^{-1}$  em 72 horas, representando uma antecipação de 20 horas em comparação com o cultivo BF1, para se obter semelhante produção máxima.

#### 4.2.3. Ensaio BF3

No ensaio BF3 utilizou-se meio de cultura contendo  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de farinha de soja ( $3,2 \text{ g.L}^{-1}$  de nitrogênio total) e  $23 \text{ g.L}^{-1}$  de óleo de soja. Os resultados desse cultivo estão ilustrados no gráfico da Figura 4.11.



**Figura 4.11.** Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ), índice de consistência ( $K$ ) e concentração de oxigênio dissolvido ( $OD$ ) do ensaio BF3

Este ensaio, foi uma reprodução do ensaio BS3 em biorreator de bancada, agora em condições favoráveis de controle de pH, que foi determinante para os ensaios em mesa incubadora rotativa com emprego de altas concentrações de nitrogênio total na composição do meio de cultura.

A maior concentração de nitrogênio total ( $3,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) não influenciou no consumo de glicerol, que foi completamente exaurido entre 24 e 30 horas de cultivo, no entanto, o crescimento celular foi nitidamente inferior ao cultivo BF2, quando foi empregada uma menor concentração de farinha de soja.

Uma peculiaridade do perfil de  $K$  representado neste cultivo, foi a pronunciada queda do índice de consistência,  $K$ , logo após curto período de máximo crescimento, sugerindo que o consumo rápido de altas concentrações de nitrogênio, gera produtos de degradação que são altamente tóxicos para as células, causando excessiva fragmentação das hifas.

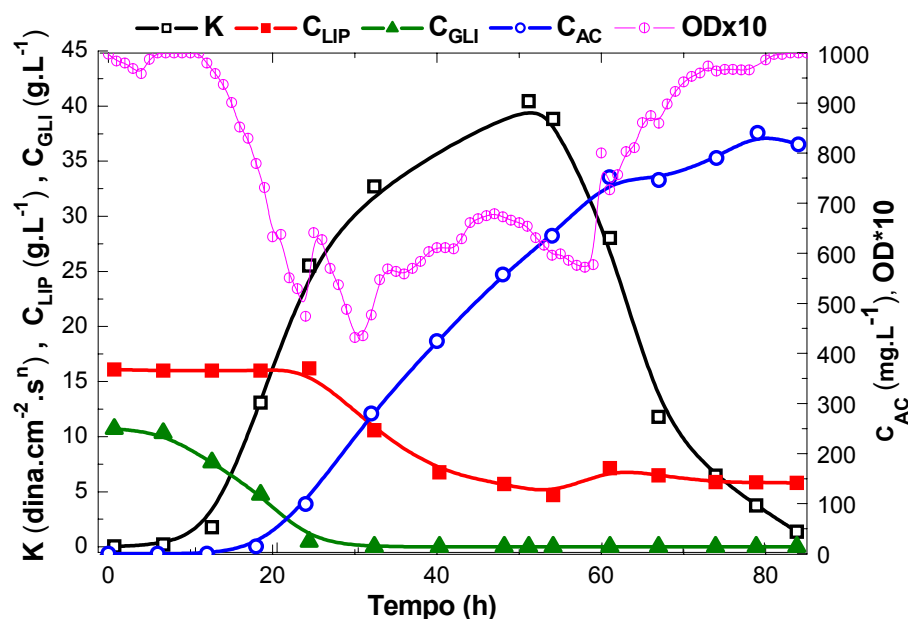
O consumo de lipídios se deu numa maior velocidade entre 24 e 30 horas, logo após a exaustão do glicerol. Pode-se notar um aumento da concentração de lipídios no caldo após esse período, que pode ser indicadora do momento que ocorreu a acentuada morte celular.

Uma vez que os ácidos graxos podem ser usados como fonte imediata de energia e também como componentes de reserva energética, altas velocidades de lise celular podem gerar um acúmulo destes componentes no caldo de fermentação.

Neste ensaio, mesmo em condições de menor crescimento celular, a produção máxima de ácido clavulânico obtida foi de  $796 \text{ mg.L}^{-1}$  em 74 horas de cultivo.

#### 4.2.4. Ensaio BF4

O ensaio BF4 foi realizado utilizando meio de cultura contendo  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de farinha de soja ( $2,4 \text{ g.L}^{-1}$  de nitrogênio total) e  $16 \text{ g.L}^{-1}$  de óleo de soja. Como no cultivo BF2, obteve-se bom crescimento celular, objetivou-se nesse cultivo obter menor concentração residual de óleo de soja. Os resultados obtidos estão representados no gráfico da Figura 4.12



**Figura 4.12.** Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ), índice de consistência ( $K$ ) e concentração de oxigênio dissolvido ( $OD$ ) do ensaio BF4

Com vista à alta concentração de óleo de soja residual do meio BF2, quando foi empregada a concentração de  $23 \text{ g.L}^{-1}$  de óleo de soja, investigou-se então a influência na

produção de ácido clavulânico quando empregada uma menor concentração de óleo de soja inicial, no caso  $16 \text{ g.L}^{-1}$ .

Neste ensaio foi verificado que mesmo em menor concentração de óleo de soja, o cultivo apresentou alta densidade celular, representado pelo valor de  $K$ , acima de  $30 \text{ dina.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , por longo período durante o cultivo.

Apesar de apresentar uma concentração de óleo residual menor, em torno de  $5 \text{ g.L}^{-1}$ , o consumo foi similar ao cultivo BF2.

Em termos de produção de ácido clavulânico, comparativamente com os cultivos anteriores, este gerou os melhores resultados em termos de produção de AC em biorreator de bancada, com a concentração máxima de  $840 \text{ mg.L}^{-1}$  em 79 horas de cultivo.

#### 4.2.5. Ensaio BF5

Neste ensaio denominado BF5, o meio de cultura apresentou na sua composição  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de farinha de soja ( $1,6 \text{ g.L}^{-1}$  de nitrogênio total) e  $16 \text{ g.L}^{-1}$  de óleo de soja, dando seqüência aos experimentos com menor concentração de óleo de soja visando uma menor concentração residual desse substrato. Os resultados desse cultivo estão representados na Figura 4.13.

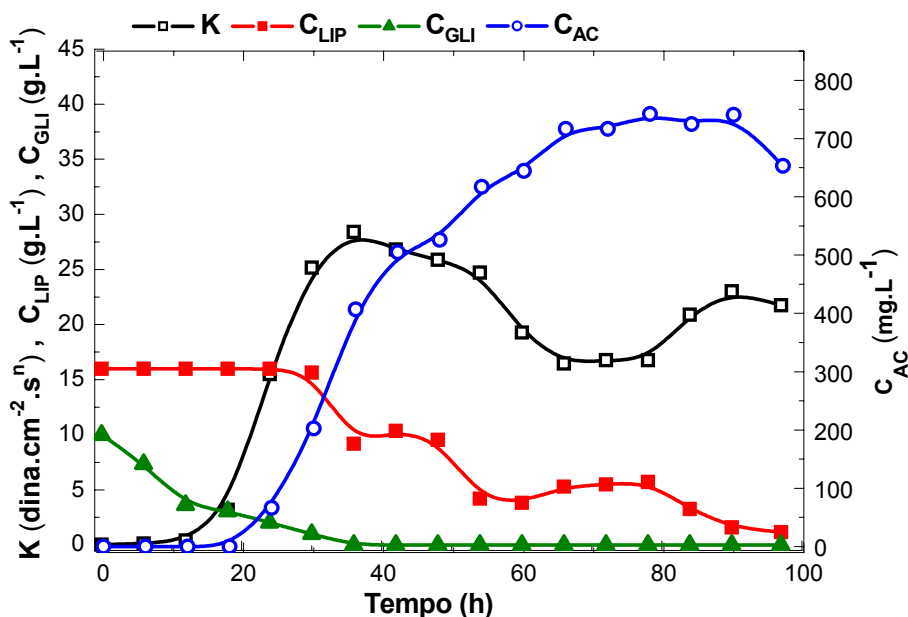


Figura 4.13. Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e índice de consistência ( $K$ ) do ensaio BF5

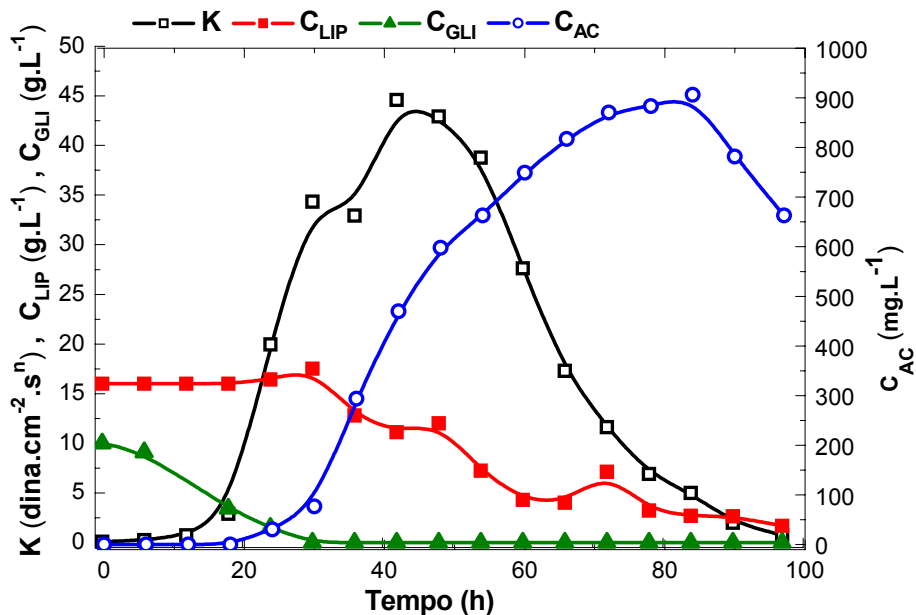
Pode-se verificar que semelhante ao cultivo BF1, com mesma concentração de nitrogênio total, que o valor máximo do índice de consistência (K) atingido ao longo do cultivo foi de  $28 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ , evidenciando uma relação direta entre a concentração de farinha de soja e o crescimento celular. Diferentemente do que ocorreu em todos os ensaios anteriores, ao final do cultivo foi verificado um aumento do índice de consistência, até aproximadamente  $22 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ , no entanto, nesse momento do cultivo a produção de ácido clavulânico já apresentava um perfil de queda, provavelmente pela exaustão de outros nutrientes aliada ao acúmulo de subprodutos indesejáveis no caldo.

Quanto ao consumo de óleo de soja, este substrato foi quase completamente exaurido, apresentando no final do cultivo uma concentração residual de óleo de soja de apenas  $1 \text{ g.L}^{-1}$ .

A produção máxima de ácido clavulânico obtida foi de  $742 \text{ mg.L}^{-1}$  em 78 horas de cultivo, valor superior ao alcançado no cultivo BF1 com maior concentração de óleo de soja na composição do meio de cultura de produção.

#### **4.2.6. Ensaio BF6**

Nesse cultivo a composição do meio de cultura de produção continha  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de farinha de soja (  $3,2 \text{ g.L}^{-1}$  de nitrogênio total) e  $16 \text{ g.L}^{-1}$  de óleo de soja. Os resultados deste ensaio estão expressos na Figura 4.14.



**Figura 4.14. Perfis de concentração de lipídios ( $C_{LIP}$ ), glicerol ( $C_{GLI}$ ), ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) e índice de consistência ( $K$ ) do ensaio BF6**

Como observado nos cultivos anteriores, o glicerol presente no meio de cultura foi completamente consumido em aproximadamente 30 horas, coincidindo com o início do consumo do óleo de soja.

A alta concentração de farinha de soja empregada neste ensaio favoreceu um alto crescimento celular, confirmado pelo alto valor de  $K$  máximo alcançado, em torno de 45  $\text{dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$  em 42 horas.

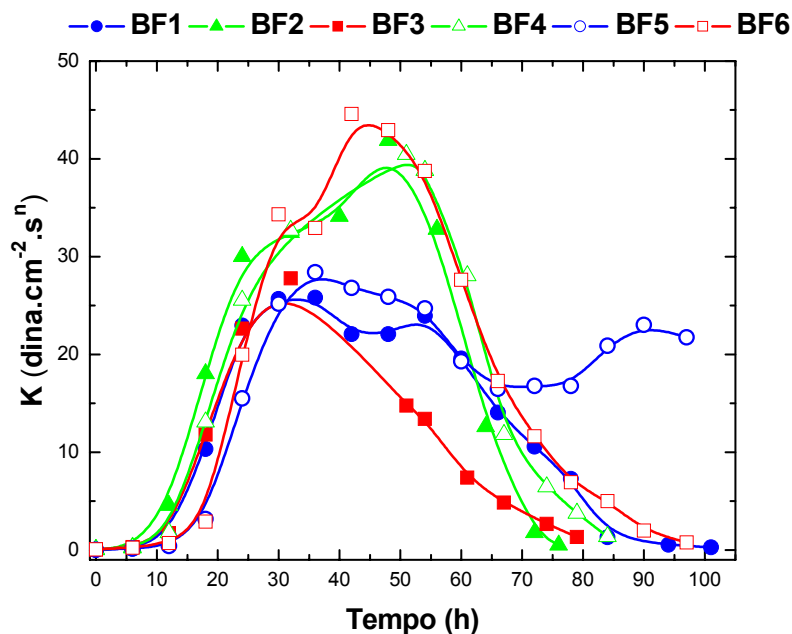
Apesar da alta concentração celular verificada neste cultivo, o óleo de soja não foi completamente consumido, apresentando um residual  $2 \text{ g.L}^{-1}$ .

A concentração máxima de ácido clavulânico obtida neste experimento ( $906 \text{ mg.L}^{-1}$  em 84 horas) foi a maior de todos os ensaios realizados, seguida de acentuada degradação no final do cultivo.



#### 4.2.7. Comparação dos Cultivos em Biorreator de Bancada

Os perfis de crescimento celular em termos de índice de consistência (K) para os cultivos em biorreator estão expressos no gráfico da Figura 4.15.



**Figura 4.15.** Perfis dos índices de consistência (K) dos ensaios BF1, BF2, BF3, BF4, BF5 e BF6

Verifica-se pela Figura 4.15 que nos cultivos com mesma composição de nitrogênio total (nas concentrações de 1,6 e 2,4 g.L<sup>-1</sup>), os perfis de K se sobrepõem, independentemente da concentração de óleo de soja adicionada. Este comportamento não foi verificado para os cultivos com maior concentração de farinha de soja (BF3 e BF6).

Pode-se verificar também que na menor concentração de nitrogênio total, quando se empregou 20 g.L<sup>-1</sup> de farinha de soja, o valor máximo de K foi de 25,8 dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>. Valor semelhante foi verificado no cultivo BF3 (27,8 dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>), com 40 g.L<sup>-1</sup> de farinha de soja na composição do meio de cultura de produção. Inicialmente acreditava-se que no cultivo BF1 a concentração de farinha de soja empregada poderia ter sido insuficiente e que no cultivo BF3 esta teria sido adicionada em excesso, hipótese que não se comprovou com os resultados obtidos no cultivo BF6, que apresentou um alto valor de K máximo (45 dina.cm<sup>-2</sup>.s<sup>n</sup>). O

crescimento celular no cultivo BF3 pode ter sido afetado, possivelmente por outros fatores como, por exemplo, o estado fisiológico das células do inóculo transferidas ao fermentador ou mesmo pelo cisalhamento excessivo do micélio, e não pela concentração de farinha de soja propriamente dita presente no meio de cultura.

A presença de altas concentrações de nitrogênio no meio de cultura pode desencadear alta velocidade de desaminação de proteínas, gerando alta concentração de substâncias tóxicas no caldo, supostamente amônia, ocasionando lise celular ou fragmentação dos micélios. Como demonstrado na Figura 4.13, a diminuição da densidade celular foi mais acentuada nos cultivos em que foram empregadas maiores concentrações de farinha de soja.

O cultivo que gerou os melhores resultados quanto à produção de ácido clavulânico foi o cultivo com maior concentração de nitrogênio total na composição do meio de cultura de produção ( $3,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) e  $16 \text{ g.L}^{-1}$  de óleo de soja, onde foi obtida a produção máxima de  $906 \text{ mg.L}^{-1}$  de AC em 84 horas, como verificado no gráfico da Figura 4.16.

Tempo (h)	BF1 (mg.L <sup>-1</sup> )	BF2 (mg.L <sup>-1</sup> )	BF3 (mg.L <sup>-1</sup> )	BF4 (mg.L <sup>-1</sup> )	BF5 (mg.L <sup>-1</sup> )	BF6 (mg.L <sup>-1</sup> )
0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
20	50	100	50	100	50	50
30	150	250	150	250	150	150
40	300	400	300	400	300	300
50	400	500	450	500	400	450
60	500	600	600	650	500	600
70	550	650	700	750	600	700
80	600	650	750	800	650	800
84	620	650	700	850	650	900
90	650	650	700	800	700	750
94	670	650	700	750	750	700
100	670	650	700	700	700	700

**Figura 4.16. Perfis de concentração de ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) dos ensaios BF1, BF2, BF3, BF4, BF5 e BF6**

Verificou-se que o incremento na concentração de ácido clavulânico se deu lentamente no cultivo BF1, quando a produção de AC máxima obtida foi de  $670 \text{ mg.L}^{-1}$  em 94 horas, sendo

que foram necessárias apenas 64 horas para se obter a mesma concentração de AC no cultivo BF2, com a maior concentração de farinha de soja.

No cultivo BF3, com concentração de farinha de soja de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  ( $3,2 \text{ g.L}^{-1}$  de nitrogênio total), a produção máxima de AC foi  $795 \text{ mg.L}^{-1}$  em 74 horas, concentração inferior à obtida no cultivo BF4, que rendeu uma maior produção de AC,  $840 \text{ mg.L}^{-1}$ , quando no meio de cultura continha menor concentração de lipídios.

Em todos os cultivos foi verificada pouca degradação do produto, mantendo a concentração de AC em patamares altos até o final dos cultivos, mesmo quando os valores de K estavam muito baixos, evidenciando que os fatores que causaram a diminuição na viscosidade do caldo, provavelmente pela fragmentação do micélio, não ocasionaram degradação do produto.

Nos cultivos realizados, independentemente da concentração de óleo de soja empregada, não houve exaustão desse substrato. Os perfis de concentração de lipídios nos cultivos realizados estão apresentados na Figura 4.17.

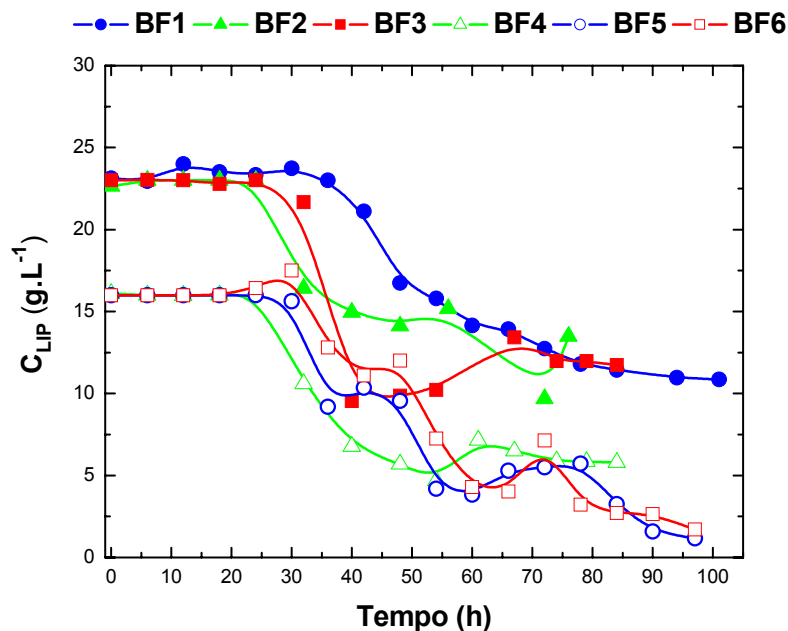


Figura 4.17. Perfis de consumo de lipídios ( $C_{LIP}$ ) dos ensaios BF1, BF2, BF3, BF4, BF5 e BF6

Conforme ilustrado na Figura 4.17, não houve consumo de lipídios nas primeiras horas do cultivo, quando a fonte de carbono preferencial foi o glicerol, consumido durante esse período. Após o consumo do glicerol, a concentração de lipídios começou a decrescer imediatamente, sem necessidade de qualquer adaptação das células para consumo do novo substrato.

Peacock *et al.* (2003) em estudos sobre utilização de substratos mistos em cultivos com *Streptomyces lividans* também verificaram esse comportamento diáuxico. Os autores relataram que quando o meio de cultura continha apenas trioleína, a atividade da lipase era rapidamente detectada. Diferentemente do que ocorria quando o meio de cultura continha glicose e trioleína como fontes de carbono, onde as atividades da lipase e a  $\beta$ -oxidação (principal via do metabolismo lipídico) só eram detectadas após a exaustão da glicose. A presença de glicose no caldo aparentemente reprimia a atividade da lipase, necessária para degradação da trioleína.

Independente da velocidade de consumo do óleo de soja, a concentração residual deste substrato foi semelhante em todos os cultivos com mesma concentração inicial.

Para os ensaios BF4, BF5 e BF6, quando foram empregadas menores concentrações de óleo de soja, apesar de menor concentração de óleo residual, o consumo deste substrato foi semelhante aos outros cultivos, em torno de  $12 \text{ g.L}^{-1}$ .

A ocorrência de óleo residual em processos fermentativos em que são utilizados esses substratos insolúveis é amplamente reportada na literatura e alguns autores tentaram elucidar as razões dessa ocorrência, principalmente no que se refere às condições de aeração, agitação e atuação de lipases no caldo.

A aeração e agitação mecânica desempenham um importante papel na utilização de lipídios em cultivos com microrganismos filamentosos, uma vez que os meios de cultura são caracterizados por altas viscosidades com requerimento de altas concentrações de oxigênio (Large *et al.* 1998), e o acúmulo de óleo na forma de gotas insolúveis acarretam problemas de transferência de massa (Choi *et al.* 1996).

Como a lipase atua na interface óleo-água, o emprego de condições de aeração e agitação adequadas, suficientes para fragmentar as gotas de óleo sem cisalhamento excessivo

dos micélios, aumentaria a área interfacial gerando um incremento na disponibilidade do substrato lipídico, diminuindo a sua concentração residual.

Todos os ensaios foram marcados pela alta produtividade de AC, conforme apresentado no gráfico da Figura 4.18.

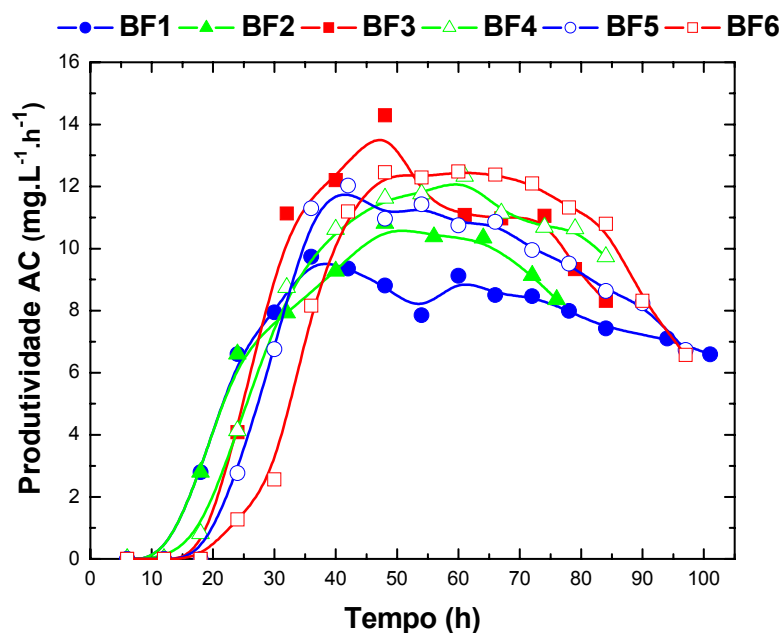


Figura 4.18. Produtividade de AC dos ensaios BF1, BF2, BF3, BF4, BF5 e BF6

Nos cultivos BF3 e BF6, realizados com maior concentração de farinha de soja ( $40 \text{ g.L}^{-1}$ ), a produtividade máxima de  $12,50 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  foi alcançada em 48 horas, e esse mesmo valor foi alcançado em 61 horas no cultivo com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de farinha de soja e  $16 \text{ g.L}^{-1}$  de óleo de soja.

Os maiores valores de produtividade em ácido clavulânico foram alcançados nos cultivos com menor concentração de lipídios, e no cultivo BF6 esta permaneceu por longo período em torno de  $12 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

As altas produções e produtividades em AC obtidas neste trabalho foram superiores àquelas obtidas em cultivos de *Streptomyces clavuligerus* visando produção de AC reportadas na literatura, sem adição de óleo de soja, mesmo quando empregadas estratégias diferentes de condução de processos fermentativos como batelada alimentada, cultivos contínuos ou mesmo em reatores de configuração diferenciada. Para fins comparativos, alguns resultados de

produção e produtividade em AC em trabalhos que utilizaram linhagem selvagem de *S. clavuligerus* e meios de cultura contendo glicerol e derivados de soja estão relatados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1.** Comparação entre valores de produção ( $C_{AC}$ ) e produtividade ( $P_{AC}$ ) máximas em AC publicados na literatura

	Concentração máxima de AC (mg. L <sup>-1</sup> )	Tempo de cultivo (h)	Produtividade máxima de AC (mg. L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
Mayer e Deckwer (1996) <sup>1</sup>	500	95	5,3
Teodoro (2004) <sup>1</sup>	680	96	7,1
Chen <i>et al.</i> (2002) <sup>1</sup>	240	70	3,4
Baptista–Neto (2005) <sup>2</sup>	579	23*	21,0
Cerri (2005) <sup>3</sup>	450	54	8,4
Presente trabalho	906	84	12,5

<sup>1</sup>cultivo em batelada alimentada, <sup>2</sup>cultivo contínuo, <sup>3</sup>cultivo em biorreator airlift, \*tempo de residência hidráulico.

As altas concentrações de AC, aliadas a altas produtividades obtidas no presente trabalho, quando foram operados cultivos em batelada em biorreator convencional com linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus*, sugerem que o óleo de soja constitui uma eficiente fonte de carbono e energia, promovendo o aumento da produção do composto de interesse.

#### 4.2.8. Correlação entre Concentrações de Farinha de Soja ( $C_{FS}$ ) e de Óleo de Soja ( $C_{OS}$ ) e Produção de Ácido Clavulânico

Numa tentativa que relacionar as concentrações de farinha e de óleo de soja com a produção máxima de AC ( $C_{ac,max}$ ) nos ensaios em biorreator, bem como avaliar a influência dessas variáveis, foi proposta uma correlação que expressa pela Equação 4.1.

$$C_{ac,max} = a \times C_{FS}^b \times C_{OS}^c \quad R^2 = 0,90 \quad 4.1$$

onde:

$C_{FS}$ : concentração de farinha de soja ( $\text{g.L}^{-1}$ )

$C_{OS}$ : concentração de óleo de soja ( $\text{g.L}^{-1}$ )

e os parâmetros estudados tiveram os seguintes resultados:

a:  $1071,5 \pm 362,9$

b:  $0,281 \pm 0,059$

c:  $-0,435 \pm 0,092$

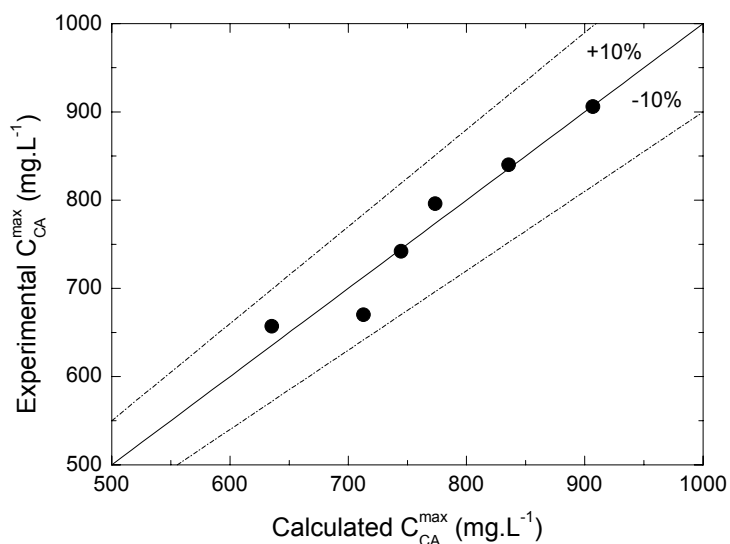
De acordo com os parâmetros obtidos pode-se avaliar que nessa faixa de condições experimentais, um aumento na concentração de farinha de soja refletiu num aumento da produção de AC. Influência diferente pode ser constatada para o parâmetro referente à concentração de óleo de soja, que pelo seu valor negativo evidencia que a máxima produção do produto de interesse é obtida quando é empregada uma menor concentração desse substrato nas condições estudadas. As influências das duas variáveis estudadas ( $C_{FS}$  e  $C_{OS}$ ) na produção de AC apresentaram a mesma ordem de grandeza, no entanto, a influência de  $C_{OS}$  na produção de AC foi superior.

O bom ajuste da correlação pode ser observado pelos resultados expressos na Tabela 4.2, em que se contrastam os valores experimentais e calculados pela correlação e na Figura 4.19.

**Tabela 4.2.** Comparação entre os valores de  $C_{ac_{max}}$  experimentais e calculados pela Equação 4.1

	$C_{FS}$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$C_{OS}$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$C_{ac_{max}}$ experimental ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	$C_{ac_{max}}$ calculada ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Desvio (%)
BF1	20	23	657	635,3	-3,30
BF2	30	23	670	712,9	6,40
BF3	40	23	796	773,6	-2,81
BF5	20	16	742	744,8	0,38
BF4	30	16	840	835,7	-0,51
BF6	40	16	906	906,8	0,09

Pelo maior valor do parâmetro referente à influência da concentração de óleo de soja (-0,440), o ajuste foi claramente superior para os cultivos quando foi empregado 16 g.L<sup>-1</sup> na composição do meio de cultura.



**Figura 4.19. Comparação entre os valores experimentais e calculados de  $C_{ac,max}$**

Observando os resultados da Tabela 4.2 e Figura 4.19, pode-se notar o excelente ajuste da correlação proposta (Equação 4.1) mesmo para o pequeno número de pontos experimentais, pois todos os desvios ficaram abaixo de 6,5% sendo a maioria abaixo de 3%. Pela qualidade do ajuste pode-se assegurar que a correlação obtida é de grande utilidade para prever a produção máxima de AC em outras condições de cultivo utilizando essas fontes de carbono e de nitrogênio.

#### **4.2.9. Modelagem Qualitativa do Processo de Produção de Ácido Clavulânico**

Face aos resultados obtidos no presente trabalho relacionados com a produção de AC em cultivos utilizando-se meio de cultura contendo glicerol e óleo de soja como fontes de carbono e às discussões acerca das influências desses substratos na produção de AC, neste



item do trabalho são apresentadas algumas hipóteses para basear uma proposta de modelo que descreva a produção de AC.

O glicerol, um dos substratos utilizados neste trabalho, consiste numa eficiente fonte de C para crescimento de linhagens selvagens de *Streptomyces clavuligerus* e desempenha um importante papel como precursor na produção de AC, no entanto, quando presente em meios de cultura em concentrações acima de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  pode inibir ou mesmo reprimir a produção de AC (Romero *et al.*; 1984, Chen *et al.* 2002).

Os ácidos graxos presentes no óleo de soja fornecem material de reserva energética que podem ser consumidos pela bactéria filamentosa e de acordo com Large *et al.* (1999) são responsáveis pela produção de metabólitos secundários, incluindo vários compostos  $\beta$ -lactâmicos.

O uso de um meio de cultura composto de glicerol e óleo de soja como fontes de carbono representa uma estratégia para, inicialmente, favorecer o crescimento celular pelo consumo do glicerol até a exaustão. Posteriormente, assegura a demanda da manutenção celular e favorece a produção de AC com o consumo do óleo de soja, pois sua hidrólise disponibiliza lenta e gradativamente glicerol e ácidos graxos às células. A lipase em *Streptomyces clavuligerus* se encontra aderida às células e os produtos da hidrólise são então transportados diretamente para o interior das mesmas, minimizando efeitos de repressão ou inibição por estes substratos.

Levando em consideração o consumo diaúxico dos substratos, a velocidade de consumo de glicerol proveniente do óleo de soja é controlada pela hidrólise e esta, então, pode ser considerada a etapa controladora do processo.

Quando a lipase está ativa em substratos solúveis, a atividade dessa enzima segue modelos cinéticos normais à maioria das enzimas (Muralidhar *et al.*, 2002). Assumindo o modelo clássico de Michaelis-Menten, a velocidade de hidrólise é proporcional à concentração de lipídio (substrato) e à área interfacial das gotas de óleo que estão em contato com o micélio, que é função das condições de agitação e aeração impostas ao caldo de fermentação.

O processo em batelada com óleo como substrato mimetiza um processo em batelada alimentada, cuja velocidade de disponibilização de glicerol e ácidos graxos é controlada pela concentração de óleo e pelas condições de cultivo. Sendo isto verdade, desta forma, a

velocidade de produção de AC é controlada pela velocidade de consumo de lipídio num cultivo em batelada e pela velocidade de alimentação de glicerol e ácidos graxos num eventual cultivo em batelada alimentada.

Com base nessas suposições, pode-se num trabalho seguinte elaborar um modelo cinético baseado numa estequiometria que considere o crescimento celular, a hidrólise do lipídio e a produção de AC.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos em ensaios preliminares em mesa incubadora rotativa, o meio de cultura com farinha de soja na menor concentração de nitrogênio total avaliada ( $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ ), possibilitou a manutenção do pH em valores próximos a 6,8 ao longo de todo o cultivo, apresentando também um bom crescimento microbiano, gerando uma maior produção de ácido clavulânico ( $700 \text{ mg.L}^{-1}$  em 132 horas de cultivo), sendo, portanto, o meio de cultura adotado como padrão utilizado na segunda etapa do trabalho, em cultivos em biorreator de bancada.

Os cultivos em biorreator de bancada apresentaram alta concentração celular e consumo incompleto de óleo de soja, obtendo altas produções e produtividade em AC. No cultivo com concentração de farinha de soja de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  e  $16 \text{ g.L}^{-1}$ , a produção máxima de AC foi de  $840 \text{ mg.L}^{-1}$  em 79 horas, concentração inferior apenas à obtida no cultivo BF6 com  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de farinha de soja e  $16 \text{ g.L}^{-1}$  de óleo de soja, em que se obteve uma maior produção de AC,  $906 \text{ mg.L}^{-1}$  em 84 horas.

Os resultados sugerem que a velocidade de hidrólise, função de concentração de lipídios, seja determinante na produção de AC, pois o sistema se comportou como um cultivo em batelada alimentada a volume constante onde a disponibilidade dos substratos (glicerol e ácidos graxos) é definida pela concentração de lipídios no caldo de fermentação.

---

## 6. SUGESTÕES

Como sugestões de continuidade do trabalho propõe-se:

- realização de cultivos complementares com outras concentrações de farinha de soja e óleo de soja para identificar melhores condições para a produção de AC.
- proposta de um modelo para prever a produção de AC em meio contendo glicerol e lipídio como fontes de carbono e energia e farinha de soja como fonte de nitrogênio.
- estudo da produção de AC em batelada alimentada utilizando glicerol, AG e óleo de soja hidrolisado ou não no meio de cultura suplementar.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHARONOWITZ, Y. E. DEMAIN, A.L. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.14, p.159-164, 1978.
- ALFORD, J. A., PIERCE, D.A. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures below 0 °C. Journal of Food Science, v.26, n.5, p.518-524, 1961.
- ALVAREZ, H.M; STEINBÜCHEL, A. Triacylglycerols in procaryotic microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 60, p.367-376, 2002.
- BADER, F. G.; BOEKELOO, M. K.; GRAHAM, H. E.; CAGLE, J. W.; Sterilization of oils: data to support the use of a continuous point-of-use sterilizer. Biotechnology and Bioengineering, v. 26, p.848-856, 1984.
- BAGGALEY, K.H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and another clavams. Natural Product Report, p.309-333, 1997.
- BAPTISTA-NETO, A.; Estudo do processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos contínuos com alta concentração celular. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 206p., 2005.
- BIRD, A.E.; BELLIS, J.M.; GASSON, B.C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. Analyst, v.107, p.1241-1245, 1982.
- BRAKHAGE, A. A. Molecular Regulation of  $\beta$ -lactam biosynthesis in Filamentous Fungi. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.62, n.3, p.547-585, 1998.
- BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J. D.; READING, C.; ROINSON, G. N. Naturally occurring  $\beta$ -lactamase inhibitors with antibacterial activity, The Journal of Antibiotics, v.29, n.6, p.668-669, 1976.
- BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties, biosynthesis, and fermentation. In: Biotechnology of Industrial Antibiotics, Ed. E.J. Vandamme, New York, by Marcel Decker, Inc., p.225-235, 1984.
- CERRI, M. O.; Avaliação de transferências de calor e massa em biorreator airlift de bancada para a produção de ácido clavulânico, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 116p., 2005.
- CHEN, K.; LIN, Y.; TSAI, C.; HSIEH, C.; HOUNG, J. Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with glycerol feeding, Biotechnology Letters, v.24, p.455-458, 2002.
- CHEN K.; LIN, Y; WU, J.; HWANG, S. J. Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding. Enzyme and Microbial Technology, v.32, p.152-156, 2003.
- CHOI., D. B; TAMURA, S.; PARK, Y. S; OKABE, M; SERIU, Y.; TAKEDA, S.; Efficient tylosin production from *Streptomyces fradiae* using rapeseed oil, Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 82, n.2, p.183-186, 1996.
- DEMAIN, A. L.; FANG, A.; Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. Actinomycetologica, v.9, p.98-117, 1995.

- DEMAIN, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. International Microbiology, v.1, p.259-264, 1998.
- DREW, S.W. e DEMAIN, A.L. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. Annual Review Microbiology, v.31, p.343-356, 1977.
- DUBOIS, M; GILLES, K. A; HAMILTON, J. K; REBERS, P. A; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry v.28; n.3, p.350-355, 1956.
- ELKINS, J. M.; CLIFTON, I. J.; HERNANDEZ, H., DOAN, L. X.; HEWITSON, K. S. Oligomeric structure of proclavaminc acid amidino hydrolase: evolution of a hydrolytic enzyme in clavulanic acid biosynthesis. Biochemical Journal, v.366, 423-434, 2002.
- FANG, A.; DEMAIN; A. L.; Dependence of nitrogen- and phosphorous-regulation of  $\beta$ -lactam antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus* on aeration level, Journal of Industrial Microbiology, v.15, p.407-410, 1995.
- FOULSTONE, M.; READING, C. Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of augmentin, in biological fluids with high performance chromatography. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.22. p.753-762, 1982.
- GILBERT, E.J.; CORNISH, A.; JONES, C.W. Purification and properties of extra cellular lipases from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. Journal of General Microbiology, v.137, p.2215-21, 1991.
- GUTMAN, A. L.; RIBON, V. AND BOLTANSKI, A. Incorporation of  $\beta$ -lactam residue of clavulanic acid, Journal of the Chemical Society, Chemical Communication, n.22, p.1627-1629, 1985.
- INOUE, O. O. Estudo da Influência da concentração e dos componentes do óleo de soja sobre a produção de salinomocina. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo-Brasil, 152p. 2001.
- IVES, P. R. AND BUSHELL, M. E.; Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, Microbiology, v.143, p.3573-3579, 1997.
- JENSEN, S. E.; ELDER, K. J.; AIDOO, K. A.; PARADKAR, A. S. Enzymes catalyzing the early steps of clavulanic acid biosynthesis are encoded by two sets of paralogous genes in *streptomyces clavuligerus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Mar., p.720-726, 2000.
- JONES, C.; THOMPSON, A. AND 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.
- KURYLOWICZ, W. Antibióticos: Uma revisão crítica, Recife: Guanabara Koogan, 1981, p.120-140.
- LARGE, K.P.; ISON, A.; WILLIAMS, D.J. The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. Journal of Biotechnology, v.63, p.111-119, 1998.
- LARGE, K.P.; MIRJALILI, N.; OSBORNE, M.; PEACOCK, L.M.; ZORMPAIDIS, V.; WALSH, M.; CAVANAGH, M.E.; LEADLAY, P.F.; ISON, A.P. Lipase activity in *Streptomyces*. Enzyme. and Microbiology Technology, v.25, p.569-575, 1999.

- LEBRIHI, A.; GERMAIN, P.; LEFEBVRE, G. Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. Applied Microbiology and Biotechnology, v.26, p.130-135, 1987.
- LEBRIHI, A.; LAMSAIF, D.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P. Effect of ammonium ion on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. Applied Microbiology and Biotechnology, v.37, n.3, p.382-387, 1992.
- LECHEVALIER, H. A. ; LECHEVALIER, M. P. Introduction to the order *Actinomycetales*, In: Starr, M. P.; Stalp, H.; Tryper, H. G.; Balawi, A.; Schlegel, H. G.; The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. New York, Springer-Verlag, 1981.
- LEE, P.C.; HO, C.C. Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* in palm-oil medium, World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.12, p.73-75, 1996.
- MACCARTHY, F. J.; FISHER, W. P.; CHARNEY, J.; TYTELL, A. A. Effects of oils and fatty acids on the production of fungichromin, Antibiotics Annual, p. 719-723, 1995.
- MARANESI, G.L.; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. World Journal of Microbiology and Biotechnology, V.21, N.4 p.509-514, 2005.
- MARTÍN, J. F; LIRAS, P.; Biosynthetic pathways of secondary metabolites in industrial microorganisms. In: Rehm, H. J.; Reed, G.; eds. Biotechnology. Weinheim, VCH. v.1, p.211-33; 1986.
- MAYER, A.F.; DECKWER, W.D.; Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations. Applied Microbiology and Biotechnology, v.45, p.41-46, 1996.
- MEIRELLES, F.V.P. Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*. Rio de Janeiro, Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica -Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.
- MENDEZ, G. L.; HAZELL, S. L.; The urea cycle of *Helicobacter pylori*. Microbiology, v.142, p.2959-296, 1996.
- MOO-YOUNG, M., Comprehensive biotechnology: The principles, applications & regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine, Oxford, U.K., Pergamon Press, v.1, 688p., 1985.
- PAMBOUKIAN, C. R. D. Produção do antitumoral retamicina por *Streptomyces olindensis* em processos descontínuo, alimentado e contínuo. Tese de Doutorado, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 163p, 2003.
- PARK, Y.S.; MOMOSE I.; TSUNODA K.; OKABE M. Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. Applied Microbiology and Biotechnology, v.40, p.773-779, 1994a.
- PARK, Y. S.; INOUE, K.; YAHIRO, K; OKABE, M. Improvement of cephamycin C production by a mutante resistant to linoleic acid, Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 78, p.88-92, 1994b.
- 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.

- PITLIK, J. AND TOWNSEND, C. A.; The fate of [2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>,1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]- D, L-glycerate in clavulanic acid biosynthesis, Chemical Communication, n.2, p.225-226, 1997.
- POSTMA, T; STROES, J. A. P. Lipid Screening in Clinical Chemistry; Clinica Chimica Acta, v.22, p.569-578, 1968.
- ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J.F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. Applied Environment Microbiology, 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.
- ROSA, J.C.; BADINO-JR., A.C.; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C.O. Cisalhamento e transferência de oxigênio na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. I Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia, Trabalho 68 (disponível em CD-Rom), São Paulo-SP, 2001.
- STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Principles of Fermentation Technology. 2 ed. Oxford, Pergamon Press, p.93-122, 1995.
- STRYER, L. Bioquímica. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.571-95, 1996.
- TEODORO, J. C. Influência das condições de alimentação do meio suplementar na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em batelada alimentada. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 89p., 2004.
- 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.
- VALENTINE, B. P.; JEFFKINS; P. A.; HOLMS, W. H.; MOUSDALE; D. M. Process for the fermentative preparation of clavam derivatives whereby the levels of ammonia and urea in the fermentation medium kept low. U.S. Patent 5,985,624, 1999.
- VINING, L.C. Secondary metabolism. In: Rehn, H.J.; Reed, G., eds. Biotechnology. Weinheim, VCH, v. 4, p.19-38, 1986.
- VOET, D.; VOET, J. G. e PRATT, C.W. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000.
- WANG, Y.; YANG, B.; DONG, M.; LIANG, D.; XU, A., Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*, Process Biochemistry, v.40, ed.3-4, p.1161-1166, 2005.
- WHITE, D. The physiology and biochemistry of prokaryotes. New York, Oxford University Press; p.187-94, 1995.
- 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.