

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

**ESTRATÉGIAS PARA MELHORIA DA
PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO**
POR *Streptomyces clavuligerus*

Cecília Ladeira Lopes Costa

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr

São Carlos – SP

2014

**ESTRATÉGIAS PARA MELHORIA DA
PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO
POR *Streptomyces clavuligerus***

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

Cecília Ladeira Lopes Costa

**ESTRATÉGIAS PARA MELHORIA DA
PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO
POR *Streptomyces clavuligerus***

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

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr.

SÃO CARLOS

2014

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

C837em Costa, Cecília Ladeira Lopes.
Estratégias para melhoria da produção de ácido
clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* / Cecília Ladeira
Lopes Costa. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
131 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2014.

1. Engenharia bioquímica. 2. Ácido clavulânico. 3.
Streptomyces clavuligerus. 4. Fermentação. 5. Degradação.
I. Título.

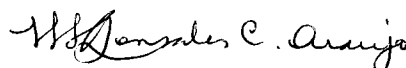
CDD: 660.63 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **CECÍLIA LADEIRA LOPES COSTA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 27 DE FEVEREIRO DE 2014.

BANCA EXAMINADORA:



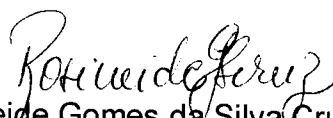
Alberto Colli Badino Junior
Orientador / UFSCar



Maria Lúcia Gonsales da Costa Araujo
UNESP



Liliane Maciel de Oliveira
UFSCar



Rosineide Gomes da Silva Cruz
UFSCar



Daniela Battaglia Hirata
UNIFAL

*Aos meus pais, Sebastião e Marisa,
meus grandes amigos e maiores professores.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus, sempre presente em todos os momentos, sendo meu refúgio, fortaleza e esperança nos momentos difíceis.

Meus sinceros agradecimentos a todos os amigos e professores que compartilharam comigo mais esse caminho percorrido e que, de muitas formas, contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa científica e de minha formação profissional.

Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Alberto Badino, pela confiança depositada no meu trabalho e pelo incentivo durante toda minha pós-graduação.

A todos os cientistas estudiosos do tema, cujos nomes aparecem ao longo deste texto e cujas pesquisas adicionaram e permitiram uma nova visão para o aprimoramento do trabalho apresentado nesta tese de doutorado.

A todos os colegas do grupo de Laboratório de Fermentação do Departamento de Engenharia Química – UFSCar, Carol Belão, Luciana, Liliane, Mateus e Fernanda. Em especial, aos grandes amigos e companheiros que fiz em São Carlos Caroline, Maritza, Jorge, Gabriel e Diego. Ao apoio do programa de fomento à pesquisa científica CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao Departamento de Engenharia Química – UFSCar.

Por fim, agradeço carinhosamente àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente: minha amada família. Obrigada pelo carinho, amor e dedicação. Mãe e pai, muito obrigada pelos preciosos conselhos e palavras de incentivo e conforto. É impossível resumir em palavras a grandeza da importância de vocês na minha vida. Deixo também meu agradecimento à minha avó Maria Aparecida (in memoriam), grande incentivadora da educação, que renunciou a muitas coisas para tornar sólido o futuro dos seus filhos.

“Não há assunto tão velho que não possa ser dito algo de novo sobre ele.”
Fyodor Dostoyevsky

“Para você, desejo o sonho realizado. O amor esperado. A esperança renovada. Para você, desejo todas as cores desta vida. Todas as alegrias que puder sorrir. Todas as músicas que puder emocionar. Desejo que os amigos sejam mais cúmplices, que sua família esteja mais unida, que sua vida seja mais bem vivida...”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

COSTA, C.L.L. **Estratégias para a melhoria da produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***. Tese (Doutorado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. 2014.

O ácido clavulânico (AC), produzido pela bactéria *Streptomyces clavuligerus*, é um potente inibidor de beta-lactamases utilizado em combinação com antibióticos beta-lactâmicos convencionais no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes a estes antibióticos. A biossíntese de AC é limitada por altas concentrações de fonte de carbono e assim como outros compostos beta-lactâmicos, é altamente instável em pH's básicos ou ácidos, mesmo em temperaturas moderadas. No presente trabalho, foram investigadas diferentes estratégias de melhoria da produção de AC. Foram realizados cultivos em batelada e batelada com pulsos de glicerol em mesa incubadora rotativa a 250 rpm e pH 6,8 em temperaturas constantes de 20, 25 e 30°C (controle), bem como cultivos com redução de temperatura após a fase de crescimento celular de 30 para 25°C, 30 para 20°C e 25 para 20°C. Foram também investigados os efeitos da temperatura e do pH na degradação de AC em diferentes tempos de cultivo e na presença de íons amônio. Observou-se que o uso de baixas temperaturas (20°C) durante o cultivo reduz a velocidade de consumo de substrato e proporciona um maior acúmulo de AC, ao reduzir os efeitos de degradação e os efeitos de inibição pela fonte de carbono. Foram também realizados cultivos em batelada com alta concentração de glicerol (30 e 60 g/L) a baixa temperatura (20 e 25°C). Os resultados confirmaram que o glicerol inibe ou até reprime a biossíntese de AC, dependendo da condição de temperatura empregada. Os maiores valores de concentração de AC foram obtidos para o cultivo a 20°C e 30 g/L de glicerol (1543 mg/L), valor 9,2 vezes maior que o cultivo controle em batelada a 30°C. As cinéticas de degradação de AC em pH's 6,5 e 7,5 e em diferentes concentrações de íons amônio (0 a 1000 mg/L) também foram avaliadas. Verificou-se que a degradação foi acentuada em pH 7,5 e com maiores concentrações de íons amônio. Para todas as propostas de cultivos de produção de AC, obteve-se uma concentração máxima de AC no caldo de cerca de 1,5 g/L, indicando ser o AC inibidor da sua própria biossíntese. Foram então avaliados os potenciais de remoção de AC do caldo de cultivo por adsorventes alternativos como carvão ativado, clinoptilolita e hidrotalcita calcinada, e por uma resina de troca iônica, Amberlite IRA 400, para aplicação no processo de fermentação extrativa. O uso de resina IRA 400 como adsorvente para remover AC durante o cultivo resultou num aumento de 48% na concentração máxima de AC em comparação com o cultivo na mesma condição de temperatura (20°C) e concentração de glicerol inicial (15 g/L) realizadas sem a remoção do produto, comprovando a hipótese de inibição pelo produto no processo de produção de AC. Em cultivo a 20°C com concentração de glicerol de 30 g/L e remoção de produto, obteve-se uma alta produção de AC de 2841 mg/L. Os resultados indicam que o uso de baixa temperatura aliado à remoção de produto durante a produção de AC representam novas e eficientes estratégias que elevam sobremaneira o rendimento da produção de AC.

Palavras-chave: ácido clavulânico, *Streptomyces clavuligerus*, temperatura, degradação, fermentação extrativa.

ABSTRACT

COSTA, C.L.L. **Strategies for improving clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus***. Thesis. Department of Chemical Engineering, Federal University of São Carlos - UFSCAR . 2014.

Clavulanic acid (CA) produced by *Streptomyces clavuligerus*, is a potent inhibitor of beta-lactamases used in combination with conventional beta-lactam antibiotics in the treatment of infections caused by resistant bacteria to these antibiotics. The biosynthesis of CA is limited by high concentrations of carbon source and like other beta-lactam compounds, it is highly unstable in acidic or basic pHs even at moderate temperatures. In this work, it was investigated different strategies to improve the production of AC. Batch and batch cultivations with glycerol pulses were carried out in shaker at 250 rpm and pH 6.8 at constant temperatures of 20, 25 and 30°C (run control), as well as with temperature reduction after cell growth phase from 30 to 25°C, 30 to 20°C and 25 to 20 C. It was also investigated the effects of temperature and pH on the AC degradation at various cultivation times in the presence of different concentration of ammonium ion. It was observed that the use of low temperatures (20°C) during cultivation reduced the substrate uptake rate and provides a higher accumulation of AC, in the broth by reducing the effects of CA degradation and inhibition effects caused by carbon source. Batch cultivations with higher glycerol concentration (30 and 60 g/L) were also performed at low temperature (20 and 25°C). The results confirmed that glycerol inhibits or even represses the biosynthesis of CA, depending of the temperature condition employed. The highest CA concentration value (1543 mg/L) were obtained for the cultivation at 20°C and 30 g/L glycerol, 9.2 fold-higher than run control at 30°C. The kinetics of CA degradation at pHs 6.5 and 7.5 and at different concentrations of ammonium ion (0 to 1000 mg/L) were also evaluated. It observed that the degradation was highest at pH 7.5 and higher concentration of ammonium ion. For all proposals of cultivations for CA production, it was obtained a maximum CA concentration in fermentation broth of about 1.5 g/L, indicating that CA acts as an inhibitor of its own biosynthesis. Then, the potential CA removal from broth culture was evaluated by using of alternative adsorbents such as activated carbon, clinoptilolite calcined hydrotalcite, and an ion exchange resin Amberlite IRA 400, for application in extractive fermentation process. The use of resin IRA 400 as an adsorbent to remove CA during cultivation resulted in an increase of 48% in maximum CA concentration if compared with cultivation at the same temperature condition (20°C) and glycerol concentration (15 g/L) conducted without product removal, confirming the hypothesis of inhibition by product in the CA production process. In cultivation at 20°C with glycerol concentration of 30 g/L and product removal, it was obtained a highest CA production of 2841 mg/L. The results indicate that the use of low temperature combined with the removal of product during the production process of AC represent a new and effective strategies to greatly increase the yield of CA.

Keywords: clavulanic acid, *Streptomyces clavuligerus*, temperature, degradation, extractive fermentative.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estruturas do AC: (a) bidimensional e (b) tridimensional.	10
Figura 2.2 – Mecanismo de ação do AC.	11
Figura 2.3 – Estrutura do anel clavâmico.	13
Figura 2.4 – Biossíntese do AC.	14
Figura 3.1 - Procedimento experimental para produção de AC.	31
Figura 3.2 - Curva de calibração para a concentração celular em função de medidas de $Ab_{S_{600}}$: (■) pontos experimentais com desvios padrão; (—) reta estimada pela regressão linear dos dados experimentais.	37
Figura 3.3 - Perfis de concentração ao longo do tempo nos cultivos em batelada a 30°C (B30-30), 25°C (B25-25) e 20°C (B20-20): (a) AC (C_{AC}) e (b) glicerol (C_G) e células (C_X).	42
Figura 3.4 - Perfis de concentração ao longo do tempo nos cultivos controle (B30-30) e com redução de temperatura 30 para 25°C (B30-25), 30 para 20°C (B30-20) e 25 para 20°C (B25-20): (a) AC (C_{AC}) e (b) glicerol (C_G) e células (C_X).	44
Figura 3.5 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 1 pulso de glicerol a 30°C (BP30-30-1).	46
Figura 3.6 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 2 pulsos de glicerol a 30°C (BP30-30-2).	46
Figura 3.7 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 3 pulsos de glicerol a 30°C (BP30-30-3).	47
Figura 3.8 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 4 pulsos de glicerol a 30°C (BP30-30-4).	47
Figura 3.9 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 1 pulso de glicerol e temperatura de 25°C (BP25-25-1).	49
Figura 3.10 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 2 pulsos de glicerol e temperatura de 25°C (BP25-25-2).	49
Figura 3.11 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 3 pulsos de glicerol e temperatura de 25°C (BP25-25-3).	50

Figura 3.12 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 4 pulsos de glicerol e temperatura de 25°C (BP25-25-4).	50
Figura 3.13 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 1 pulso de glicerol e temperatura de 20°C (BP20-20-1).	51
Figura 3.14 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 2 pulsos de glicerol e temperatura de 20°C (BP20-20-2).	52
Figura 3.15 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 3 pulsos de glicerol e temperatura de 20°C (BP20-20-3).	52
Figura 3.16 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 1 pulso de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 25°C (BP30-25-1).	54
Figura 3.17 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 2 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 25°C (BP30-25-2).	54
Figura 3.18 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 3 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 25°C (BP30-25-3).	55
Figura 3.19 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 4 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 25°C (BP30-25-4).	55
Figura 3.20 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 1 pulso de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 20°C (BP30-20-1).	57
Figura 3.21 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 2 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 20°C (BP30-20-2).	57
Figura 3.22 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 3 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 20°C (BP30-20-3).	58
Figura 3.23 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 4 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 20°C (BP30-20-4).	58

Figura 3.24 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 1 pulso de glicerol e com redução de temperatura de 25 para 20°C (BP25-20-1).	60
Figura 3.25 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 2 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 25 para 20°C (BP25-20-2).	60
Figura 3.26 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 3 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 25 para 20°C (BP25-20-3).	61
Figura 3.27 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 4 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 25 para 20°C (BP25-20-4).	61
Figura 3.28 – Perfis da degradação de AC ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-30-4: 78 h ($r^2=0,990$), 96 h ($r^2=0,98$), 120 h ($r^2=0,96$) e 144 h ($r^2=0,990$).	63
Figura 3.29 – Perfis da degradação de AC ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-25-4: 72 h ($r^2=0,94$), 96 h ($r^2=0,92$), 129 h ($r^2=0,90$) e 169 h ($r^2=0,81$)	64
Figura 3.30 – Perfis da degradação de AC ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-20-4: 81 h ($r^2=0,86$), 129 h ($r^2=0,92$), 168 h ($r^2=0,83$) e 216 h ($r^2=0,91$).	65
Figura 3.31 - Perfis de velocidades de produção de AC (r_{AC}) e degradação (r_{dAC}) durante os cultivos B30-30, B20-20 e BP20-20-1.....	68
Figura 4.1 - Procedimento experimental para cultivos de <i>S. clavuligerus</i> em mesa incubadora rotativa.	74
Figura 4.3 – Curvas de crescimento de <i>S. clavuligerus</i> durante os cultivos B25; B25(30); B20 e B20(30).	76
Figura 4.4 – Perfil do consumo de glicerol ao longo do tempo durante os cultivos B25; B25(30); B20 e B20(30).	77
Figura 4.5 – Variação de pH ao longo do tempo durante os cultivos B25; B25(30); B20 e B20(30).	78
Figura 4.6 – Variação de NH_4^+ ao longo do tempo durante os cultivos B25; B25(30); B20 e B20(30).	78
Figura 4.7 – Perfil da concentração de AC ao longo do tempo durante os cultivos B25; B25(30); B20 e B20(30).	79
Figura 4.8 – Perfil de pH e de concentrações de AC, glicerol e células ao longo do tempo durante o cultivo B20(60).	81
Figura 5.1 – Esquema do catabolismo dos aminoácidos.	85

- Figura 5.2 – Gráfico de $\ln(C_{AC0}/C_{AC})$ em função do tempo para determinação da constante de degradação de AC (k_{dAC}) em solução aquosa com diferentes concentrações de NH_4^+ em: (a) pH 6,5 e (b) 7,5. As retas representam os ajustes do modelo linear aos dados experimentais. 88
- Figura 5.3 – Gráfico de $\ln(C_{AC0}/C_{AC})$ em função do tempo para determinação da constante de degradação de AC (k_{dAC}) em caldos de cultivo. As retas representam os ajustes do modelo linear aos dados experimentais. 91
- Figura 6.1 – Adsorção de AC em carvão ativado, hidrotalcita calcinada, clinoptilolita e IRA 400, utilizando-se 15 g de resina para 100 mL de caldo de cultivo em reator em batelada a 25°C e 600 rpm: (a) cinéticas de adsorção e (b) perfis de pH. 101
- Figura 6.2 – Dessorção de AC da resina IRA 400 a 25°C em batelada. Perfis de C_{AC} e de pH. 102
- Figura 6.3 - Isotermas de adsorção de AC em IRA 400 usando solução aquosa de Clavulin® e caldo de cultivo a 25°C e pH 7,0. A linha representa o ajuste do modelo de Langmuir aos pontos experimentais. 103
- Figura 7.1- Concentrações de AC no equilíbrio (C_{ACeq}) a partir do caldo (■) e (□) CA a partir da solução aquosa, em função da quantidade de IRA 400. 112
- Figura 7.2 - Perfil da concentração de células durante fermentação convencional (B(15)) e extrativa (FE(15); FE(15+15); FE(30)) de *S. clavuligerus* a 20°C. 113
- Figura 7.3 - Perfil da concentração de glicerol durante fermentação convencional (B(15)) e extrativa (FE(15); FE(15+15); FE(30)) de *S. clavuligerus* a 20 °C. 114
- Figura 7.3 - Perfil do pH durante fermentação convencional (B(15)) e extrativa (FE(15); FE(15+15); FE(30)) de *S. clavuligerus* a 20°C. 115
- Figura 7.4 - Perfil da concentração de AC no caldo durante as fermentações convencional (B(15)) e extrativas (FE(15); FE(15+15); FE(30)) de *S. clavuligerus* a 20 °C. 115
- Figura 7.5 - Perfil da concentração de AC acumulada durante as fermentações convencional (B(15)) e extrativas (FE(15); FE(15+15); FE(30)) de *S. clavuligerus* a 20°C. 116
- Figura 7.6 – Perfis de velocidade de produção de AC nas fermentações convencional e extrativas de AC com 10% m/v de IRA 400. 118

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Meio de cultura de Rosa <i>et al.</i> (2005)	30
Tabela 3.2 - Meio de cultura de Teodoro et al. (2006) modificado.....	30
Tabela 3.3 – Condições experimentais e resultados dos cultivos em batelada (B) e batelada com pulsos de glicerol (BP)	40
Tabela 3.4 – Constantes de degradação de AC (k_{dAC}) ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-30-4.	63
Tabela 3.5 – Constantes de degradação do AC (k_{dAC}) ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-25-4.	64
Tabela 3.6 – Constantes de degradação de AC (k_{dAC}) ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-20-4.	65
Tabela 3.7 - Constantes globais de degradação de AC (k_{dAC} globais) obtidas nos caldos de cultivo em diferentes temperaturas.	66
Tabela 4.1 - Meio de cultura de Rosa <i>et al.</i> (2005)	73
Tabela 4.2 - Meio de cultura de Teodoro et al. (2006) modificado.....	73
Tabela 4.3 – Parâmetros de fermentação dos cultivos B25; B25(30); B20 e B20(30)...	80
Tabela 5.1 – Constantes de degradação do AC (k_{dAC}) para solução aquosa em diferentes concentrações de NH_4^+ em solução aquosa de Clavulin®	89
Tabela 7.1 - Meio de cultura de Rosa <i>et al.</i> (2005)	108
Tabela 7.2 - Meio de cultura de Teodoro et al. (2006) modificado.....	109

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vii
Capítulo 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1. Introdução	2
1.2. Objetivos.....	4
1.2.1. Objetivo geral	4
1.2.2. Objetivos específicos	4
1.3. Estrutura do trabalho	5
Capítulo 2. REVISÃO BILIOGRÁFICA.....	7
2.1. Considerações sobre os processos microbiológicos de produção de antibióticos8	
2.2. Ácido clavulânico (AC)	9
2.3. Biossíntese do AC.....	12
2.4. Regulação do metabolismo secundário.....	14
2.5. Considerações sobre o processo de produção e purificação de AC	18
2.5.1. Temperatura.....	19
2.5.2. pH	20
2.5.3. Recuperação de AC	20
2.6. Fermentação extrativa	22

Capítulo 3. Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em batelada sem e com pulsos de glicerol sob diferentes condições de temperatura ... 26

RESUMO.....	27
3.1. Introdução	27
3.2. Materiais e Métodos	29
3.2.1. Micro-organismo	29
3.2.2. Meios de cultura	29
3.2.3. Ensaio de produção de AC.....	31
3.2.4. Ensaio de degradação de AC	32
3.2.4. Obtenção das velocidades de produção AC e de degradação de AC	35
3.2.5. Metodologia Analítica	36
3.3. Resultados e Discussão	39
3.3.1. Cultivos em batelada a temperatura constante	41
3.3.2. Cultivos em batelada com redução de temperatura	43
3.3.3. Cultivos em batelada com pulsos de glicerol	45
3.3.3.1. Cultivos em batelada com pulsos de glicerol a temperatura constante	45
3.3.3.2. Cultivos em batelada com pulsos de glicerol e redução de temperatura ...	53
3.4. Conclusões	68

Capítulo 4. CULTIVOS DE *Streptomyces clavuligerus* EM ALTA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO..... 70

RESUMO.....	71
4.1. Introdução	71
4.2. Materiais e Métodos	72
4.2.1. Micro-organismo	72

4.2.2. Meios de cultura	72
4.2.3. Procedimento experimental	74
4.2.4. Metodologia Analítica	75
4.2.5. Cálculo dos parâmetros de cultivo	33
4.3. Resultados e Discussão	76
4.4. Conclusões	82
Capítulo 5. EFEITOS DO ÍON AMÔNIO E DO pH NA DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO EM SOLUÇÃO AQUOSA E EM CALDO DE CULTIVO	83
RESUMO.....	84
5.1. Introdução	84
5.2. Materiais e Métodos	86
5.2.1. Ensaio de degradação de AC em solução aquosa.....	86
5.2.2. Ensaio de degradação de AC em caldos de cultivo	86
5.2.3. Determinação da constante de degradação do AC (k_{dAC}).....	87
5.2.4. Metodologia Analítica	87
5.3. Resultados	88
5.3.1. Ensaio de degradação de AC em solução aquosa.....	88
5.3.2. Ensaio de degradação de AC em caldos de cultivo	90
5.4. Conclusões	92
Capítulo 6. ESTUDOS DE ADSORÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO EM ADSORVENTES ALTERNATIVOS E RESINA DE TROCA IÔNICA PARA APLICAÇÃO EM FERMENTAÇÃO EXTRATIVA.....	93
RESUMO.....	94
6.1. Introdução	94

6.2. Materiais e Métodos	96
6.2.1. Adsorventes e tratamentos.....	96
6.2.2. Cinética de adsorção.....	97
6.2.3. Isotermas.....	98
6.2.4. Análise da concentração de AC.....	99
6.3. Resultados	99
6.3.1. Ensaios de adsorção de AC	99
6.3.2. Etapa de dessorção de AC em IRA 400	101
6.3.3. Isotermas de adsorção utilizando resina IRA 400	102
6.4. Conclusões	104
Capítulo 7. FERMENTAÇÃO EXTRATIVA DE ÁCIDO CLAVULÂNICO UTILIZANDO RESINA DE TROCA IÔNICA	105
RESUMO.....	106
7.1. Introdução	106
7.2. Materiais e Métodos	108
7.2.1. Micro-organismo	108
7.2.2. Meios de cultura	108
7.2.3. Tratamento da resina Amberlite IRA 400	109
7.2.4. Fermentação Extrativa.....	109
7.2.5. Cultivos.....	110
7.2.6. Metodologia Analítica	111
7.3. Resultados e Discussão	111
7.4. Conclusões	119

Capítulo 8. CONCLUSÕES GERAIS	120
Capítulo 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

Capítulo 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução

A maior parte da produção de antibióticos é realizada por via fermentativa, na qual células microbianas empregadas como biocatalisadores, são utilizados há milênios pelo homem na fabricação de alimentos e bebidas. Atualmente, esses processos biotecnológicos se destacam pela diversidade de produtos de notável importância econômica. Etanol, ácido cítrico, vitaminas, enzimas e antibióticos são alguns exemplos. Embora algumas dessas substâncias possam ser obtidas de modo mais econômico por técnicas de síntese química, outras mais complexas como enzimas e antibióticos não podem prescindir da atividade dos micro-organismos (SCRIBAN, 1985).

Dentro desse contexto se destaca o processo fermentativo para produção do ácido clavulânico (AC). O AC é um potente inibidor de beta-lactamases, enzimas associadas com a resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos, como as penicilinas. Medicamentos contendo AC em suas formulações são largamente utilizados no tratamento de doenças infecciosas e podem ser encontrados em mais de 150 países e são responsáveis por gerar um mercado de vendas de mais de 2 bilhões de dólares ao ano (LI e TOWNSEND, 2006).

O processo clássico de produção de AC é realizado em fermentadores tipo tanque agitado e aerado, utilizando *Streptomyces clavuligerus* como micro-organismo produtor e meios de cultura complexos contendo derivados de soja e glicerol ou lipídeos como fontes de nitrogênio, carbono e energia, respectivamente (MAYER E DECKWER, 1996; CHEN et al., 2002; 2003; BAPTISTA-NETO et al., 2005; WANG et al., 2004; TEODORO et al., 2006; ORTIZ et al., 2007). O estudo da dinâmica dos processos fermentativos através do conhecimento qualitativo dos fatores que influenciam sua operação é de primordial importância para sua otimização. No caso do AC, muitos estudos no que diz respeito à melhoria do processo já foram realizados e encontram-se documentados na literatura. Dentre eles pode-se citar:

- aprimoramento dos micro-organismos produtores através de melhoramento genético da linhagem e de operações adequadas para preservação do estoque de células (PARADKAR et al., 2001; KORBKANDI et al., 2007).

- otimização das condições nutricionais do caldo de cultivo com relação às fontes de carbono e energia e de nitrogênio (MAYER E DECKWER, 1996; MARANESI et al., 2005; ORTIZ et al. 2007; TEODORO et al., 2006).

- avaliação de variáveis de operação como agitação e aeração e condições de cisalhamento no biorreator (ROSA et al., 2005; CERRI e BADINO., 2012; BUSTAMANTE e BADINO, 2013).

- análise de processos de extração e purificação do AC (ALMEIDA et al., 2003; HIRATA et al., 2009).

Diversos aspectos deste processo vêm sendo estudados através de dissertações e teses desde 1998, desenvolvidas dentro de uma linha de pesquisa do Laboratório de Fermentação e Purificação do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (GOUVEIA et al., 2001; ALMEIDA, 2003; MARANESI et al., 2005; ROSA et al., 2005; BAPTISTA-NETO 2005; CAMPESI et al., 2007; ORTIZ, 2007; TEODORO et al., 2006; 2010; HIRATA et al., 2009; BELLÃO ,2010). Apesar dos esforços, valores máximos de produção de AC ainda são baixos. A literatura relata valores máximos de 1,6 g/L em processos em biorreator utilizando linhagem selvagem de *S. clavuligerus* (TEODORO et al., 2010). Dados de produção industrial de AC são muito escassos e seus valores máximos não são divulgados, exceto por uma patente que descreve valores de 3,8 g/L utilizando uma linhagem geneticamente modificada (CARDOSO et al., 2002). Por isso, a procura por novos métodos de produção com o objetivo de aumentar a produção desta molécula e diminuir os custos do processo desperta grande interesse.

De modo geral, o êxito de um processo fermentativo em termos de produção e/ou produtividade em produto pode ser atribuído a uma série de fatores, dentre eles:

(1) controle da regulação metabólica; a maioria dos micro-organismos utilizados em fermentações possui uma complexa rede de reações metabólicas sujeitas à regulação gênica que pode interferir negativamente no potencial de produção da linhagem produtora. No caso do AC, essa regulação gênica encontra-se, ainda, pouco elucidada, o que afeta e limita estudos relacionados à produção.

(2) o produto limitar sua própria biossíntese a partir de mecanismos de repressão e inibição, restringindo a concentração final de produto sempre a baixos valores.

(3) o produto ser citotóxico. Se o produto interfere negativamente na viabilidade das células produtoras são esperados menores rendimentos ao final do processo.

(4) o produto ser altamente instável. A instabilidade do produto nas condições de condução do seu processo de produção como temperatura, pH, concentração de oxigênio ou mesmo pela presença de outras moléculas comuns ao caldo fermentativo, também leva a baixos níveis de produção.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Baseado no exposto, a presente tese de doutorado teve como objetivo geral contribuir na melhoria do rendimento do processo de produção de AC, através do desenvolvimento e aperfeiçoamento das operações fermentativas a partir da implementação de novas estratégias, a saber: cultivos em baixa temperatura, cultivos batelada com pulsos de fonte de carbono (glicerol) e cultivos com remoção de produto “*in situ*” (fermentação extrativa).

1.2.2. Objetivos específicos

Como objetivos específicos que levaram à conquista do objetivo principal, pode-se citar:

- investigar a influência das variáveis temperatura e programas de alimentação de fonte de carbono (glicerol), em frascos agitados, sobre os parâmetros fermentativos do bioprocessamento de produção de AC;
- avaliar as velocidades de degradação do AC em diferentes tempos ao longo do processo fermentativo em diferentes temperaturas;
- avaliar as velocidades “líquidas” de produção de AC em cultivos conduzidos sob diferentes temperaturas;
- avaliar o efeito do íon amônio (NH_4^+) na degradação do AC;
- testar resinas convencionais e adsorventes alternativos com possíveis aplicações na remoção do AC em cultivos com alta concentração do produto durante o processo de fermentação extrativa;
- esclarecer os efeitos do produto na sua biossíntese.

1.3.Estrutura do trabalho

A presente tese está dividida em oito capítulos, a saber:

- **Capítulo 1.** Apresenta a INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS do trabalho.

- **Capítulo 2.** Apresenta uma REVISÃO BIBLIOGRÁFICA geral e atualizada dos assuntos relacionados ao processo de produção do AC via fermentação, que serviu de base para a proposta experimental e discussão dos resultados apresentados. São eles: características do micro-organismo utilizado, regulação do metabolismo secundário, biossíntese do AC, características estruturais da molécula e os fatores que afetam o rendimento do processo durante a fermentação.

Os capítulos seguintes foram divididos baseados no conjunto de propostas para a melhoria da produção do AC. Em cada um foi apresentada uma breve revisão bibliográfica focada no tema apresentado. Estão também descritos os Materiais e Métodos e procedimentos experimentais utilizados no desenvolvimento, bem como apresentados e discutidos os principais resultados obtidos em Resultados e Discussão de cada etapa do trabalho. De uma maneira resumida, os capítulos foram divididos de acordo com os seguintes temas:

- **Capítulo 3:** PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *Streptomyces clavuligerus* EM BATELADA SEM E COM PULSOS DE GLICEROL SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA.

- **Capítulo 4:** CULTIVOS DE *Streptomyces clavuligerus* EM ALTA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO.

- **Capítulo 5:** EFEITOS DO ÍON AMÔNIO E DO pH NA DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO EM SOLUÇÃO AQUOSA E EM CALDO DE CULTIVO.

- **Capítulo 6:** ESTUDOS DE ADSORÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO EM ADSORVENTES ALTERNATIVOS E RESINA DE TROCA IÔNICA PARA APLICAÇÃO EM FERMENTAÇÃO EXTRATIVA.

- **Capítulo 7:** FERMENTAÇÃO EXTRATIVA DE ÁCIDO CLAVULÂNICO
UTILIZANDO RESINA DE TROCA IÔNICA

- **Capítulo 8.** CONCLUSÕES GERAIS

- **Capítulo 9.** REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Considerações sobre os processos microbiológicos de produção de antibióticos

Os processos fermentativos são regulados pelas atividades bioquímicas dos micro-organismos e pelas condições do meio. Esses fatores interagem entre si e somente as condições ambientais podem ser controladas diretamente nos processos de tecnologia de fermentação. Variáveis como pH, pressão parcial de oxigênio e concentração de nutrientes podem ser controladas durante o processo de modo a criar um ambiente favorável para a cultura celular, para que esta venha maximizar sua atividade metabólica (BAILEY & OLLIS, 1986). Os processos fermentativos envolvem uma complexa interação entre células e seu ambiente e o controle desses fatores ambientais tornam-se fundamentais para a melhor performance do processo.

Parâmetros de controle podem ser agrupados em duas categorias: parâmetros físicos (temperatura, pressão, alimentação de substrato) e químicos (pH, concentração de nutrientes e de oxigênio dissolvido). Os processos bioquímicos, especialmente as fermentações, são processos muito complexos e altamente sensíveis uma vez que, para pequenas mudanças nas condições operacionais tais como temperatura e pH, a resposta celular pode apresentar grandes desvios. Isso acontece porque os catalisadores das reações bioquímicas, as enzimas, usualmente possuem um estreito intervalo de funcionamento de suas atividades ótimas, ao mesmo tempo em que, sob condições não muito distantes do ótimo, podem ser desnaturadas irreversivelmente. É por isso que desvios das condições ótimas durante o processo fermentativo podem causar prejuízos para as culturas celulares, uma vez que estas são constituídas por uma variedade de sistemas enzimáticos complexos (SCRIBAN, 1985).

A maior parte da produção de antibióticos é realizada por via fermentativa, sendo os fungos e bactérias os micro-organismos responsáveis pela sua biossíntese. O desenvolvimento de um processo de produção de biomoléculas por via fermentativa pode ser resumido nas seguintes etapas:

- busca, seleção e isolamento dos micro-organismos produtores na natureza;
- aprimoramento das linhagens dos micro-organismos produtores através de estudos de otimização das atividades metabólicas e técnicas de engenharia genética, bem como dos métodos de conservação da linhagem;
- aprimoramento dos meios de cultura através de estudos das necessidades nutricionais ótimas, principalmente com relação aos tipos de fonte de carbono, fonte de

nitrogênio e das substâncias precursoras da molécula, bem como das suas concentrações ideais no meio e pH.

- desenvolvimento do equipamento de fermentação e de suas configurações de controle automático das variáveis de processo (temperatura, pH, agitação, concentrações de oxigênio dissolvido e de substratos essenciais), aumentando-se assim a performance do processo;

- melhoria da produção através de estudos de condução de operação do processo: batelada, batelada alimentada, contínuo.

- por fim, melhoria dos processos de extração e recuperação da biomolécula, com o intuito de se obter uma operação estável e reduzir as perdas do produto durante esta etapa.

2.2. Ácido clavulânico (AC)

A descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming, representa um dos mais importantes marcos da história da medicina, pois permitiu o desenvolvimento de drogas efetivas no tratamento de infecções causadas por bactérias patogênicas. As penicilinas pertencem à classe dos antibióticos beta-lactâmicos. Devido ao seu enorme espectro de ação antimicrobiana e baixa toxicidade à células humanas, os compostos beta-lactâmicos são largamente utilizados no combate a uma ampla gama de infecções. Por isso, este grupo representa os produtos biotecnológicos mais vendidos no mundo correspondendo a 65% das vendas de antibióticos (ELANDER et al., 2003).

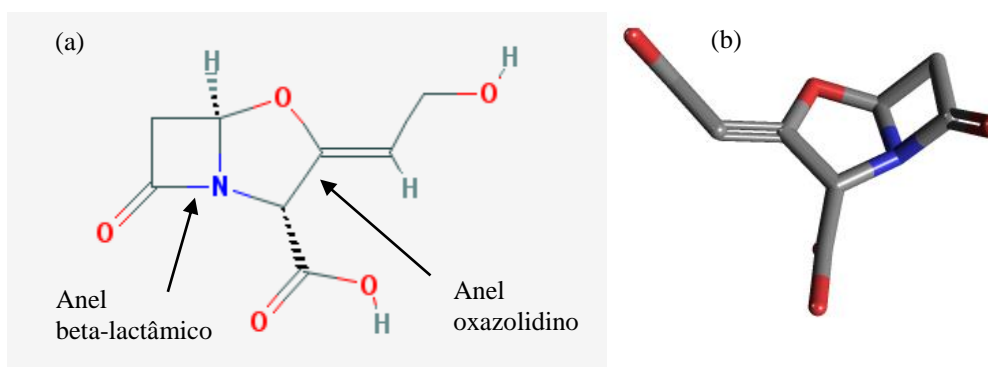
A atividade biológica dos antibióticos beta-lactâmicos é decorrente da sua habilidade de inibir a transpeptidase, enzima responsável pela síntese do peptidoglicano, componente fundamental da parede celular bacteriana. A ação do antibiótico prejudica a divisão celular além de promoverem a liberação de autolisinas, letais para as bactérias (BIDNENKO et al., 1998).

Entretanto, algumas linhagens de bactérias desenvolveram mecanismos de defesa contra estes antibióticos através da expressão de beta-lactamases, enzimas que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico presente na estrutura desses compostos e geram produtos estáveis e biologicamente inativos (LIVERMORE, 1995). A produção de beta-lactamases é a principal forma de resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos e podem ser encontradas em bactérias como *Escherichia* sp, *Klebsiella* sp,

Proteus sp, *Pseudomonas* sp, *Enterobacter* sp e *Staphylococcus aureus* (COLE et al., 1985).

Visando lidar com o problema da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, os Laboratórios Beecham Pharmaceutical Division (Grã-Bretanha) implementaram em 1967 um programa de seleção de micro-organismos produtores naturais de inibidores de beta-lactamases. Foram realizados testes de inibição do crescimento da bactéria *Klebsiella aerogenes*, resistente a benzilpenicilina, em placas de Petri, utilizando este antibiótico juntamente com um potencial inibidor da beta-lactamase. A cultura microbiana que apresentou uma resposta positiva aos testes foi a de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. Posteriormente, a estrutura química da substância inibidora de beta-lactamase foi identificada por Howarth et al. (1976) e denominada ácido clavulânico, (Z)-(2R,5R)-3-(2-hidroxiethylideno)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo(3.2.0)-heptano-2-ácido carboxílico. O AC é formado pela fusão dos anéis beta-lactâmico e oxazolidino (**Figura 2.1**) e é estruturalmente relacionado à estrutura dos antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas).

Figura 2.1 – Estruturas do AC: (a) bidimensional e (b) tridimensional.



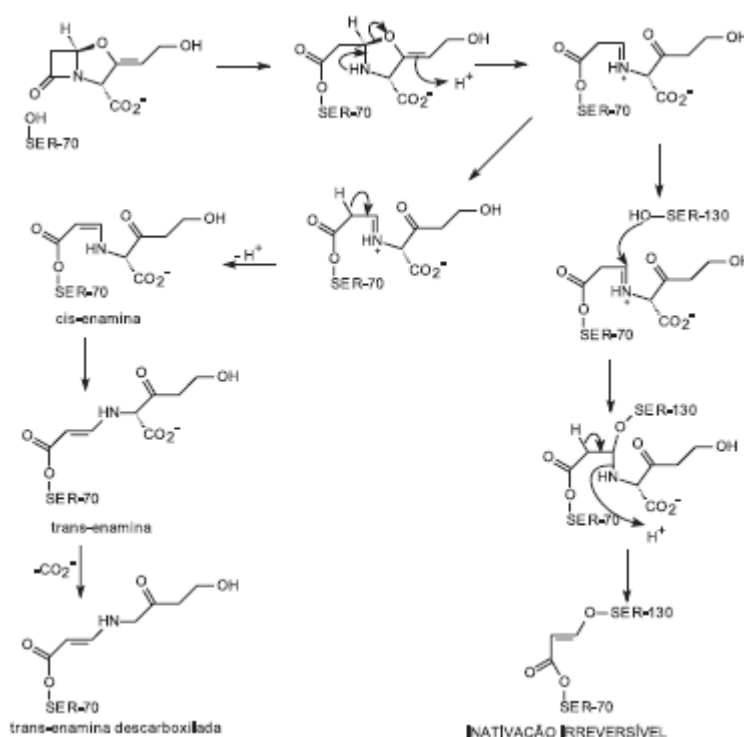
Fonte: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280980#itabs-3d>. Acesso: 27/01/2014.

O AC possui como características principais:

- massa molar igual a 199,16;
- ácido carboxílico com pKa=2,8;
- dois centros quirais com estereoquímica 2R 5R;
- sais de ácido clavulânico são mais estáveis que a forma ácida.

O núcleo central do AC se assemelha a estrutura das penicilinas e a sua estereoquímica 2R 5R diferenciada permite que ele atue como um ligante irreversível no sítio ativo da beta-lactamase, levando à inativação da sua atividade enzimática (PAGE, 2000). A reação de inibição envolve uma ligação irreversível entre o grupo hidroxila da serina da beta-lactamase e o AC, produzindo um complexo altamente estável e biologicamente inativo (**Figura 2.2**).

Figura 2.2 – Mecanismo de ação do AC.



Fonte: OLIVEIRA et al. (2009)

Embora o AC seja efetivo contra um grande espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sua atividade antibacteriana é relativamente baixa. O crescimento de *Klebsiella aerogenes* não é inibido na presença de 125 mg/L de ampicilina ou em 10 mg/L de AC. No entanto, na presença de 12,5 mg/L de ampicilina combinado com 5 mg/L de AC, o crescimento das colônias é inibido. Do mesmo modo, o crescimento de colônias de *Staphylococcus aureus* não é inibido na presença de 100 mg/L de ampicilina ou 5 mg/L de AC, entretanto é inibido na presença de uma combinação de 10 mg/L de ampicilina e 1 mg/L de AC (COLE et al., 1985).

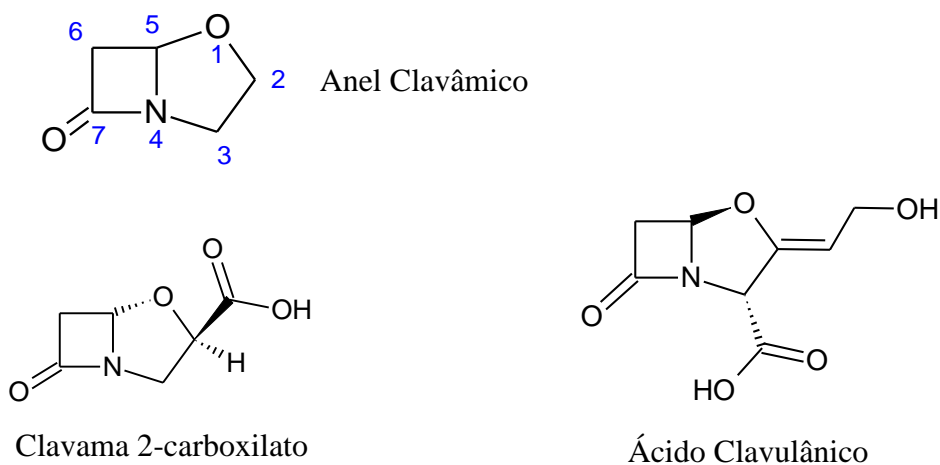
Como resultado, o AC é administrado em medicamentos juntamente com outros antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro, que são suscetíveis à ação de beta-lactamases (BROWN et al., 1976). Nessas formulações, o AC é encontrado na forma de sais de metais alcalinos, em geral o clavulanato de potássio. Um dos medicamentos comercializados no Brasil é o Clavulin® (Glaxo SmithKline do Brasil Ltda.), uma combinação de 500 mg de amoxicilina e 125 mg de AC. O Augmentin® é outra variação dessa combinação, enquanto que o Timentin® é uma combinação de AC/ticarciclina (BAGGALEY et al., 1997). Além de se mostrarem muito eficazes nos tratamentos terapêuticos, esses produtos geram um mercado de vendas avaliado em mais de 2 bilhões de dólares ao ano (LI e TOWNSEND, 2006), o que contribui como forte incentivo para estudo do processo de produção do AC.

2.3. Biossíntese do AC

O micro-organismo produtor de AC, *Streptomyces clavuligerus*, é uma bactéria filamentosa, Gram-positiva, aeróbia estrita, pertencente ao grupo dos actinomicetos e predominantemente encontrada no solo (LECHEVALIER e LECHEVALIER, 1981). Romero et al. (1984) destacam que a característica mais importante da bactéria filamentosa *S. clavuligerus* é a sua capacidade de produzir antibióticos.

Atualmente, sabe-se que esta bactéria é capaz de produzir cerca de 20 metabólitos secundários, incluindo vários compostos beta-lactâmicos como a penicilina N, a cefamicina C, a desacetoxicefalosporina C. *S. clavuligerus* também produz outros componentes com estrutura de clavamas (**Figura 2.3**) que diferem do AC pela perda de um grupo carboxil no C-3 e pela estereoquímica 5S, sendo conhecidas como clavamas 5S (LIRAS E RODRIGUEZ-GARCIA, 2000).

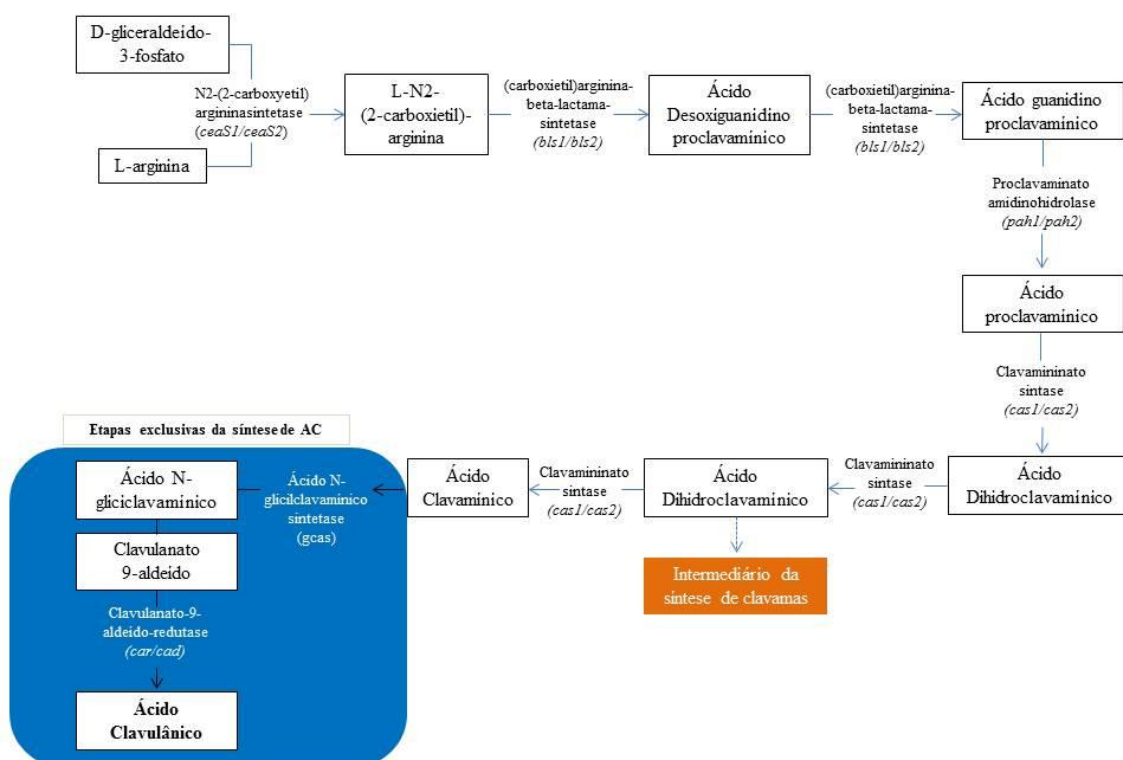
Figura 2.3 – Estrutura do anel clavâmico. À esquerda, clavama 5S e à direita, o AC com estereoquímica 5R.



Fonte: Acervo pessoal

Embora tenha sido descoberto há algumas décadas, ainda se tem pouco conhecimento a respeito da regulação das vias de biossíntese do AC. De modo geral, os genes para biossíntese do AC estão organizados em um super-cluster do genoma de *S. clavuligerus*. Aproximadamente 18 genes (orf2-19) codificam proteínas envolvidas na biossíntese, transporte e regulação do AC. A biossíntese é iniciada pela condensação de L-arginina e D-gliceraldeído-3-fosfato, seguida por várias etapas até formar o ácido clavamínico. Até este ponto, as vias de biossíntese são comuns às das demais clavamas com estereoquímica 5S. Nas etapas seguintes, o ácido clavamínico sofre uma dupla epimerização e uma desaminação oxidativa formando o clavulanato-9-aldeído, que é convertido em AC por uma reação envolvendo NADH (**Figura 2.4**) (MACKENZIE et al., 2007).

Figura 2.4 – Biossíntese do AC.



Fonte: Adaptado de OZCENGIZ e DEMAİN (2013).

2.4. Regulação do metabolismo secundário

Metabolismo é definido pelo conjunto de reações bioquímicas que acontecem no interior da célula. Aos produtos metabólicos gerados durante o catabolismo e anabolismo associados ao crescimento celular se denominam metabólitos primários. O metabolismo primário celular envolve uma série de reações bioquímicas que geram compostos precursores e intermediários e convertem em macromoléculas essenciais ao crescimento celular, como ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA), proteínas, lipídios e polissacarídeos. As reações do metabolismo primário são usualmente balanceadas e os metabólitos primários raramente se acumulam no interior das células, sendo consumidos pelas reações (MARTIN E DEMAİN, 1980).

Os metabólitos secundários são descritos como aqueles produzidos após a fase de crescimento celular (idiofase ou fase de produção) de cultivos em batelada. Estes compostos, em geral, possuem uma estrutura química complexa e não são essenciais ao

crescimento das células, no entanto, acredita-se que estão relacionados com as funções de sobrevivência celular. A diversidade estrutural destas moléculas pode ser exemplificada por muitas classes de compostos orgânicos incluindo cumarinas, quinonas, epóxidos, alcalóides, glicosídeos, naftalenos, macrolídeos, poliacetilenos, peptídeos, pirróis, tetraciclina, entre outros (MARTIN e DEMAINE, 1980). Muitos compostos de interesse comercial como antibióticos, fungicidas, antitumorais, entre outros, são produtos gerados do metabolismo secundário de micro-organismos (VISING, 1986).

Uma importante característica do metabolismo secundário é que as vias de biossíntese estão sujeitas a ação de mecanismos regulatórios de indução, regulação catabólica e regulação pelo produto. Isto é, o metabolismo secundário é governado por controles regulatórios associados ao crescimento celular e controles regulatórios específicos que afetam vias individuais de biossíntese (DEMAINE e FANG, 1995).

Durante o processo fermentativo, enzimas e produtos do catabolismo das vias metabólicas devem ser sintetizados e estar integrados de modo a se obter máximos rendimentos do produto de interesse. Para isso, as vias metabólicas devem ser coordenadas de modo a garantir que somente quantidades necessárias de subprodutos sejam formadas, evitando o gasto energético desnecessário pela célula, como também, a interferência desses compostos nas vias fermentativas de biossíntese do produto. Dessa forma, a regulação do metabolismo microbiano pode ser usada como ferramenta para melhoria do processo fermentativo através da manipulação adequada das variáveis de processo, bem como da forma de operação do biorreator.

Segundo Martin e Demain (1980), a produção de metabólitos secundários geralmente é maior em condições de limitação de um ou mais nutrientes. Isto sugere que há um substrato específico e limitante que atua como repressor da produção de metabólitos secundários durante os estágios iniciais de crescimento. Vale ressaltar que a regulação das vias metabólicas de biossíntese de AC por *S. clavuligerus* são complexas e não estão totalmente elucidadas. No entanto, sabe-se que estão sob controle das concentrações de fontes de nitrogênio e de carbono e fosfato.

Repressão e inibição são dois mecanismos distintos do controle regulatório do metabolismo secundário de antibióticos. A repressão envolve o controle da expressão gênica das enzimas da rota biossintética do produto. Este controle pode ocorrer pela interferência na transcrição da informação genética do DNA em mRNA como também pode ocorrer pela interferência na tradução da informação genética do mRNA em

proteína. A inibição se refere ao controle da atividade enzimática de sintetases da rota de síntese do produto.

Sabe-se, por exemplo, que a biossíntese de candidina é regulada pelo fosfato por ambos os tipos de controle: (i) em altas concentrações, o fosfato reprime a síntese de sintetases envolvidas na rota de biossíntese da candidina através do controle da expressão gênica; (ii) o fosfato inibe a síntese de candidina após a formação das sintetases através do controle da atividade enzimática das enzimas envolvidas na biossíntese deste produto (MARTIN e DEMAINE, 2012). Em alguns casos, o produto final inibe uma parte da via sua de síntese, limitando a sua produção. É o caso das cefalosporinas que inibe sua produção em *Paecilomyces persicinus* (MARTIN e DEMAINE, 2012).

A glicose usualmente interfere na biossíntese de antibióticos. O mecanismo molecular de regulação pela glicose pode ser amplamente encontrado em vários sistemas microbianos e é denominado “regulação catabólica pela fonte de carbono” (SANCHEZ e DEMAINE, 2002). A sua regulação está relacionada ao controle da velocidade de crescimento celular. Soltero e Johnson (1954) relataram que uma lenta alimentação de glicose ao fermentador reduz a velocidade de crescimento celular e elimina a interferência da glicose na síntese de penicilina. Analogamente, a formação dos antibióticos candidina e cadihexina foi estimulada por uma lenta alimentação de glicose no meio (MARTIN e McDANIEL, 1974). Outros estudos já demonstraram o efeito negativo do rápido consumo da fonte de carbono na síntese de antibióticos, como a penicilina por *Penicillium sp* (REVILLA et al., 1984) e cefalosporina por *S. clavuligerus* (AHARONOWITZ e DEMAINE, 1978).

Em alguns casos, a regulação catabólica pela fonte de carbono está relacionada à repressão da expressão gênica de uma da enzima da via de biossíntese do produto. Na produção de actinomicina por *Streptomyces antibioticus*, a glicose reprime a síntese de fenoxazinona sintase, uma das enzimas da via biossintética do antibiótico (DEMAINE, 1982). Vining et al. (1986) relatam que a repressão também pode ocorrer pelo acúmulo de metabólitos intermediários das vias catabólicas.

Pode citar também a repressão de formação de AC por fosfato. Romero et al., (1984) investigaram a regulação exercida pelas fontes de fosfato, sendo que o fosfato inorgânico exerceu um efeito inibitório na biossíntese de AC.

As principais fontes de carbono utilizadas nos processos fermentativos para produção de AC por *S. clavuligerus* são o glicerol e óleos. Rius e Demain (1997)

avaliaram o efeito da concentração de glicerol na fermentação de AC e verificaram que altas concentrações (2 a 3% m/v) inibem a biossíntese do antibiótico. Chen et al. (2002) investigaram o efeito da alimentação de glicerol na produção de AC em cultivos em mesa incubadora rotativa a 28°C. Os autores verificaram que quando o glicerol estava presente na faixa de 10-20 g/L havia um aumento da produção.

Recentemente, Ortiz et al. (2007) estudaram a complementação do meio de cultivo, contendo glicerol, com do óleo de soja na produção de AC por *S. clavuligerus* ATCC 27064. Os resultados indicaram que o óleo foi consumido somente depois do consumo de glicerol, sugerindo um crescimento diáuxico. Segundo os mesmos autores, o cultivo com óleo em batelada simula um cultivo em batelada alimentada, pois a hidrólise do óleo pela ação de lipases gera glicerol como produto, assim o glicerol é lentamente disponibilizado no meio favorecendo a produção de AC. Ao ser lentamente disponibilizada, a fonte de carbono não causa efeito repressor das vias metabólicas. No entanto, o uso de óleos nos meios de cultivos não é desejável, pois exige um alto requerimento de oxigênio durante a oxidação das moléculas, eleva a viscosidade do meio e o aumento de etapas de recuperação do produto (SAUDAGAR et al., 2008).

As fontes de nitrogênio comumente utilizadas em meios de cultura para o crescimento celular, como os sais de amônio, também apresentam efeito negativo sobre o metabolismo secundário (DEMAIN e FANG, 1995). A presença de íons amônio em quantidade suficientemente elevada, reprime as enzimas envolvidas na assimilação de outras fontes de nitrogênio como aminoácido e ureia (WHITE, 1995).

Gouveia et al. (2001) estudaram a otimização da composição do meio de cultura para produção de AC por *S. clavuligerus*. Neste estudo foram avaliados os efeitos de diferentes fontes de N obtidas comercialmente como proteína isolada de soja, extrato de levedura, peptona bacteriológica e água de maceração de milho (milhocina). Observou-se que os maiores rendimentos se deram quando proteína isolada de soja foi utilizada no cultivo.

Mayer e Deckwer (1996) investigaram os efeitos de farinha de soja ou extrato de farinha soja como fonte de nitrogênio nos meios de cultivo de *S. clavuligerus* na produção AC. Nos cultivos em extrato de farinha soja, observou-se que a produção de AC teve início já durante a fase de crescimento celular, enquanto que nos cultivos obtidos de farinha de soja a produção de AC ocorreu mais tardiamente, na fase de produção do metabólito secundário. No entanto, as quantidades finais de produto foram menores em extrato de farinha de soja, possivelmente devido à maior degradação

durante a fase estacionária. Em outro trabalho, Ortiz et al. (2007) verificaram, em experimentos em incubador rotativo, que a produção de AC em meio de cultura com farinha de soja foi muito maior que em meio contendo proteína isolada de soja.

A quantidade de Nitrogênio no meio de cultivo deve ser suficiente para assegurar um bom crescimento, no entanto o excesso de íons amônio, produto de catabolismo proteico, pode inibir a biossíntese bem como degradar o AC (ROMERO et al., 1994). De acordo com Roubos et al. (2002), concentrações elevadas de íons amônio no meio levam a um aumento considerável na taxa de degradação de AC.

Visser-Lwirink et al. (2006) avaliaram o efeito de sais de amônio na produção de AC. Observaram um aumento na produção quando a concentração de íons amônio foi mantida igual ou superior a 50 mg/L. Entretanto, a concentração de íons amônio deve ser baixa o suficiente para não causar efeitos tóxicos às células.

2.5. Considerações sobre o processo de produção e purificação de AC

O processo fermentativo para obtenção do AC pelo micro-organismo *S. clavuligerus* é bastante complexo e sujeito a inúmeros mecanismos de controle. Além disso, é influenciado por parâmetros de processo como condições de cultivo, tipo de meio de cultura, cepa utilizada, etc. Portanto, é importante considerar que fatores como pH, temperatura, concentração de reagentes e micronutrientes afetam os parâmetros cinéticos que definem as velocidades de crescimento celular, consumo de substrato e de produção do AC.

Quanto ao processo de produção do AC, é interessante considerar algumas características:

- **micro-organismo produtor** tem sido motivo de muitos estudos quanto às melhorias de suas características fisiológicas para a produção de metabólitos. Isso se deve aos estudos de genética microbiana e da evolução de metodologias de conservação. No caso do micro-organismo produtor de AC, *S. clavuligerus*, a liofilização é a melhor técnica de conservação, uma vez que o metabolismo microbiano é interrompido evitando os efeitos indesejáveis de mutações genéticas aleatórias que comprometam o rendimento de produção da cepa selecionada;

- as **condições nutricionais** do meio de cultivo, **principalmente fontes de carbono, nitrogênio e fosfato**, devem fornecer ao micro-organismo as melhores condições de produção evitando os efeitos da repressão ou inibição da biossíntese do

produto. Também é importante considerar os micronutrientes como os sais de potássio e magnésio, necessários ao metabolismo celular.

- **agitação** – normalmente o valor de agitação é determinado para garantir a homogeneização do meio, bem como uma concentração de oxigênio dissolvido. Entretanto, não deve assumir altos valores, pois, neste caso, ocorreria a ruptura do micélio devido à tensão de cisalhamento. Em biorreatores da bancada (5 a 10 L), assume-se como 800 rpm um valor de agitação adequado e para mesa incubadora rotativa, 250 rpm.

- **aeração** – em escala de bancada, geralmente mantida em torno de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto).

- **variáveis de processo** como pH e temperatura desempenham um papel definitivo no desempenho do processo. Adiante será apresentado uma breve revisão sobre estes dois tópicos;

2.5.1. Temperatura

A escolha da temperatura de operação durante um processo de bioconversão deve ser feita com muito cuidado, já que afeta diretamente alguns parâmetros importantes de processo, ao exercer um forte efeito no crescimento, metabolismo e viabilidade celular e, em alguns casos, na degradação do produto.

Os estreptomicetos são micro-organismos mesófilos e, portanto, as temperaturas ótimas de crescimento situam-se entre 25 e 40°C (BALLOWS et al., 1991), dependendo da cepa. O intervalo de temperatura tradicionalmente utilizado na produção de AC situa-se entre 28 e 30°C (JIANG et al., 2004; BAPTISTA-NETO et al., 2005; TEODORO et al., 2006). Num estudo mais recente, Marques et al. (2009) avaliaram a influência da temperatura na faixa de 24 a 40°C em cultivos de *S. clavuligerus* DAUPFE 3060 e concluíram que à temperatura de 32°C foi obtida a maior velocidade de formação de AC, de 0,107 h⁻¹ enquanto o mesmo parâmetro foi de 0,074 h⁻¹ a 28°C.

Pesquisas recentes sugerem que o uso de baixa temperatura durante os processos fermentativos pode ser vantajoso ao aumentar a viabilidade das células e a resistência celular ao cisalhamento; reduzir a velocidade específica de crescimento celular; além de suprimir a liberação de compostos do metabolismo da fonte de carbono responsáveis pelos efeitos de repressão catabólica (LUDWIG et al., 1992; CHUPPA et al., 1997; FURUKAWA e OSHUYE, 1998; KAUFMANN et al., 1999; HENDRICK et al., 2001).

Além disso, o uso de temperaturas mais baixas durante o processo de produção reduz a degradação dos compostos termolábeis, como é o caso de AC, favorecendo o acúmulo do produto no caldo de fermentação. Bersanetti et al. (2005) investigaram a degradação do AC em diferentes temperaturas na faixa de 10 a 40°C e verificaram que a estabilidade do AC diminuiu com o aumento da temperatura. Neste mesmo trabalho, o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da molécula deste produto obtido de caldo de cultivo a 30°C e pH 7,0 foi de 16,7 h, enquanto que a 20°C este valor foi de 29,6 h. Portanto, a degradação do AC em cultivos a 30°C é significativa quando comparada a 20°C e está relacionada aos baixos rendimentos do processo tradicional.

2.5.2. pH

O pH é outra variável importante a ser avaliada em cultivos, tanto no que se refere à cinética de crescimento microbiano quanto à estabilidade e atividade biológica da maioria das proteínas produzidas e secretadas pelo micro-organismo.

Devido a sua estrutura molecular altamente susceptível às hidrólises ácida e básica, grande parte dos compostos beta-lactâmicos são estáveis em condições neutras de pH. Almeida et al. (2003) e Bersanetti et al. (2005) investigaram a estabilidade do AC em soluções aquosas tamponadas sob diferentes condições de pH e concluíram que o AC é altamente instável em valores de pH's superiores a 7,0 e inferiores a 5,0. Ainda, segundo Bersanetti et al. (2005), a máxima estabilidade do AC é alcançada em valores próximos a 6,2. Valores de pH mais utilizados em bioprocessos para produção de AC, que alia baixa degradação e crescimento ótimo do microrganismo produtor, situa-se na faixa de 6,5 a 7,0, sendo mais empregado o valor de 6,8.

2.5.3. Recuperação de AC

Os tópicos anteriores mostraram que a obtenção industrial de AC utiliza culturas submersas de *S. clavuligerus* em tanques convencionais agitados e aerados operados de forma descontínua (BUTTERWORTH, 1984). A etapa de produção é tradicionalmente conduzida em temperaturas na faixa de 25 a 30 °C e emprega meios de cultura convencionais contendo proteína de soja e glicerol como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente, além de sais essenciais ao crescimento celular.

No processo de recuperação de AC, o caldo é tratado para obtenção final da molécula de AC na forma de sal de clavulanato. Ao final da fermentação, as células do micro-organismo produtor são removidas do caldo de cultivo através de etapas de centrifugação, seguida de micro e ultra-filtração do caldo a baixa temperatura. Posteriormente, o AC pode ser removido do caldo fermentado livre de células através de sistemas de extração líquido-líquido ou do uso de materiais adsorventes.

A extração líquido-líquido por meio de solventes orgânicos é o processo mais utilizado na indústria de separação de antibióticos de caldo de cultivo, como a penicilina G (TREYBAL, 1980). O processo de separação e purificação do AC através de extração líquido-líquido envolve uma série de etapas e já está detalhadamente descrito em várias patentes (BOX, 1978, 1980; COLE et al., 1978). Como fase orgânica são comumente utilizados os solventes acetato de etila, n-butanol, metilisobutilcetona e acetato de n-butila. Após ser extraído para a fase orgânica o AC é re-extraído para uma fase aquosa em condições neutras de pH e o extrato aquoso é concentrado e liofilizado. Como resultado obtém-se um sal de clavulanato, em geral clavulanato de potássio.

Nas últimas décadas, os processos de adsorção em fase sólida vêm sendo muito utilizados na indústria química como uma ferramenta para isolar e purificar produtos biotecnológicos e têm sido muito utilizados nas operações para obtenção do AC. De acordo com Belter (1988), as duas operações unitárias mais utilizadas para concentrar e isolar produtos de soluções diluídas são a extração em fase líquida e a adsorção em fase sólida, sendo que esta última tem uma maior seletividade.

O processo de adsorção envolve a separação de uma substância de uma fase acompanhada por seu acúmulo ou concentração na superfície da outra. A fase que está adsorvendo é o adsorvente e o material adsorvido na superfície desta fase é o adsorbato (SLEIJKO, 1985).

Diferentes tempos de adsorção sugerem a existência de diferentes graus de interação entre os compostos e o sólido adsorvente. Isso acontece porque existem dois tipos de interação que podem ocorrer neste processo: adsorção química e adsorção física. Na adsorção física ou fisissorção, as moléculas do adsorvente e do adsorbato interagem por interações de van der Waals, que apesar de serem interações de longo alcance, são fracas e não formam ligações químicas e por isso é um processo reversível, podendo o adsorvente ser usado outras vezes e o adsorbato ser recuperado com uma concentração superior a do efluente antes do tratamento. Na adsorção química ou quimissorção ocorre ligação química entre o sólido adsorvente e o adsorbato, isto é, há

troca ou compartilhamento de elétrons entre eles. O adsorbato é fixado mais fortemente na superfície do adsorvente. As moléculas não são atraídas para todos os pontos da superfície e dirigem-se para os centros ativos. A adsorção química ocorre em uma única camada e é um processo praticamente irreversível devido à alteração da natureza química do adsorbato (CIOLA, 1981).

O tipo de adsorção depende das características físico-químicas das moléculas, tais como: carga superficial, hidrofobicidade, massa molar, ponto isoelétrico (pI) e estabilidade (GHOSH et al., 1996).

O AC se caracteriza por apresentar carga elétrica em condições de pH neutro ($pK_a=2.5$), o que permite com que o processo de adsorção por troca iônica seja o método mais satisfatório e amplamente empregado para purificação do AC (SILVA et al., 2009).

A maior parte dos trabalhos envolvendo a recuperação de AC pela técnica de adsorção menciona que resinas trocadoras de ânions com grupamentos de amônio quaternário ligados à matriz são mais eficientes na remoção do AC do caldo. Mayer et al. (1996) investigaram o uso de resina XAD, uma resina hidrofóbica, para purificação do AC a partir do caldo de fermentação. Os estudos indicaram uma fraca interação entre o AC e a superfície apolar dessas resinas. Os resultados foram comparados com testes feitos com uma resina tradicional de troca iônica contendo grupamentos de amônio quaternário na superfície, Amberlite IRA 400, e constataram um melhor desempenho da IRA 400 com eficiência de adsorção de 65%. No entanto, ao ancorar grupamentos de amônio quaternário na superfície da XAD, o desempenho de adsorção do AC foi melhor em relação à resina IRA 400.

2.6. Fermentação extrativa

A remoção de produtos “in situ” se refere aos métodos utilizados para a remoção seletiva de produtos das proximidades do biocatalisador tão logo ele é formado. A fermentação extrativa é um tipo de processo com remoção de produto, que envolve a retirada do metabólito de interesse por algum tipo de agente que “capta” o produto do caldo de produção enquanto dura o processo fermentativo.

É muito comum em bioprocessos observar os efeitos de inibição pelo produto, quando o excesso de produto afeta negativamente o metabolismo celular. Um exemplo clássico é a produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Sabe-se que o

etanol interfere no metabolismo e estrutura celular alterando o funcionamento dos sistemas de transporte, sinalização celular da glicose e atividade de enzimas da via glicolítica. Além disso, o etanol interfere na polaridade da membrana citoplasmática e aumenta sua fluidez, prejudicando o equilíbrio osmótico e comprometendo a integridade da membrana (ALEXANDRE e CHARPENTER, 1998; BISSON, 1999; LLOYD et al., 1993). Laluce (1993) observou que leveduras isoladas de destilarias mostraram redução do rendimento de suas atividades fermentativas quando a concentração de etanol no meio de cultivo estava acima de 8% v/v. Além disso, em concentrações acima de 4% v/v foram observadas grandes perdas em biomassa.

Nesse contexto, a fermentação extrativa é utilizada para aumentar a produtividade e o rendimento de bioprocessos já existentes via três efeitos principais:

(1) minimização da interferência do produto nas células produtoras, permitindo sua expressão contínua sob nível de expressão máximo. Alguns produtos afetam a fisiologia e o metabolismo celular como também inibem a sua própria biossíntese (inibição pelo produto);

(2) minimização de perdas do produto, seja pela limitação de tempo de exposição do produto em condições desfavoráveis de temperatura e pH, como também da ação de enzimas e subprodutos tóxicos;

(3) redução das etapas de separação e purificação do produto (*downstream*) (FREEMAN et al., 1993).

Para a implementação de um processo de remoção de produto é determinante o conhecimento das características químicas da molécula de interesse. A identificação das propriedades químicas do produto irá impor qual técnica de remoção é mais adequada para a execução do processo. Em processos fermentativos, o produto pode ser removido do biorreator por diferentes técnicas: evaporação, formação de complexos reversíveis, extração líquido-líquido, membranas seletivas (diálise) e adsorção em fase sólida. No caso da extração líquido-líquido é adequado escolher um solvente seletivo com alta capacidade de retenção de produto e relativamente atóxico para o micro-organismo.

Em um dos primeiros processos de remoção de produtos, Kita et al. (1968) abordaram o uso de resina de troca iônica IRA 400 na remoção de ácido salicílico de caldo fermentativo e atingiram rendimentos 5 vezes maiores que o processo convencional. Além disso, já foram reportados com sucesso a implementação do uso de resina de troca iônica na remoção de ácido láctico e ácido hexanóico em processos de fermentação extrativa (SRIVASTAVA et al., 1992; VACCARI et al., 2000).

As operações de fermentação extrativa utilizando fase sólida pode incluir a resina no meio de cultivo desde o início da fermentação. Assim, à medida que o produto vai sendo produzido, ele é imediatamente retido na resina e privado do contato celular. Em outro método, o caldo de fermentação livre de células circula continuamente por uma coluna recheada com fase sólida.

A revisão bibliográfica mostrou que o processo de produção de AC já foi bastante estudado, ressaltando que os efeitos de repressão e/ou inibição causados pela fonte de carbono no metabolismo de biossíntese do AC pelo micro-organismo produtor, como também os efeitos de inibição causados pelo produto são pontos críticos deste processo que podem afetar o rendimento final. Associado à isso, a elevada instabilidade da molécula de AC em condições de alta temperatura e de pH ácidos e básicos e a exposição a íons e moléculas presentes no caldo também contribuem para o baixo rendimento.

Nesse sentido, este trabalho apresenta como novos métodos de operação deste processo a condução da fermentação em baixa temperatura e o uso de fermentação extrativa na tentativa de incrementar a produção e produtividade e contribuir para a implementação de procedimentos mais eficazes relacionados ao processo de produção de AC.

Capítulo 3

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *Streptomyces clavuligerus* EM BATELADA SEM E COM PULSOS DE GLICEROL SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA

Os resultados referentes a este capítulo foram publicados na revista Biochemical Engineering Journal, v.69, p.1-7, 2012.

RESUMO

O ácido clavulânico (AC) é um potente inibidor de beta-lactamases produzido por *Streptomyces clavuligerus*. Como outros compostos beta-lactâmicos, o AC é quimicamente instável a temperaturas elevadas. A decomposição de AC durante a fermentação bacteriana reduz a sua concentração no caldo, o que resulta em baixos rendimentos. Este estudo investigou o uso da redução de temperatura para se obter alta produção de AC durante cultivos de *S. clavuligerus*. Cultivos em batelada e cultivos em batelada com pulsos de glicerol foram realizados em diferentes temperaturas em mesa incubadora rotativa a 250 rpm e pH 6,8. Primeiramente, três cultivos em batelada, utilizando glicerol como fonte de carbono foram realizadas a temperaturas de 30 (controle), 25, e 20°C. Em seguida, três cultivos em batelada foram realizados com reduções de temperatura de 30 para 25°C, de 30 para 20°C e de 25 para 20°C, após o esgotamento de glicerol. A produção de AC geralmente aumentou em cultivos com redução de temperatura e alimentação de glicerol. Uma concentração máxima de AC de 1534,3 mg/L foi obtida em cultivo mantido a temperatura constante de 20°C com um pulso de glicerol. Nestas condições, tanto a velocidade de consumo de glicerol como a de degradação AC foram baixas. Os resultados obtidos demonstram o potencial da redução de temperatura na otimização da produção de AC por *S. clavuligerus*.

3.1. Introdução

A produção de enzimas beta-lactamases é o mecanismo mais comum de resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos, tais como penicilinas e cefalosporinas. Estas enzimas são secretadas por uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas patogênicas. As beta-lactamases catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico causando o rompimento da ligação amida. Como resultado, os antibióticos tornam-se ineficazes contra o crescimento bacteriano. O ácido clavulânico (AC) é um metabólito beta-lactâmico secundário produzido por *Streptomyces clavuligerus*, que tem uma potente atividade inibidora de beta-lactamases (ROUBOS et al., 2002). AC tem sido utilizado clinicamente em combinação com antibióticos sensíveis ao ataque de beta-lactamases no tratamento de doenças provocadas por várias bactérias patogênicas.

Tal como todos os compostos beta-lactâmicos, o AC é quimicamente instável em valores de pH's ácido e básico, como também em altas temperaturas. Estudos anteriores demonstraram que a temperatura tem um efeito importante sobre a degradação de AC (BERSANETTI et al., 2005; MARQUES et al., 2009)

O AC é tradicionalmente produzido por *S. clavuligerus* utilizando meio de cultura complexo contendo derivados de soja e glicerol ou lipídeos como fontes de

nitrogênio, carbono e energia (CHEN et al., 2002; BAPTISTA-NETO et al., 2002; TEDORO et al., 2006; DOMINGUES et al., 2010). O glicerol é a fonte de carbono mais amplamente utilizada e na via biossintética de AC, ele é convertido a D-gliceraldeído-3-fosfato, o precursor metabólico principal do AC (KHALEELI e TOWNSEND, 1999). Chen et al. (2002) observaram que a biossíntese de AC é inibida por concentrações de glicerol superiores a 15 g/L, enquanto Rius e Demain (2002) concluíram que concentrações de glicerol acima de 2 % m/v em meio de cultura suprimiram a produção do composto. Cultivos em batelada alimentada utilizando glicerol tem sido usados para aumentar a produtividade dos processos microbianos e estratégias de alimentação têm sido empregadas para controlar a inibição e repressão pelo substrato a fim de melhorar a produção de AC (DOMINGUES et al., 2010). Isto baseia-se no fato de que a inibição do substrato é causada por elevadas concentrações do mesmo, com uma elevada velocidade de assimilação de substrato fazendo com que o acúmulo de intermediários metabólicos inibam ou reprimam a produção de metabólitos secundários, tais como o AC. No entanto, a velocidade de assimilação de substrato pode ser controlada usando uma temperatura reduzida, mesmo quando a concentração do substrato disponível é elevada.

Tem sido relatado na literatura que temperaturas operacionais mais baixas em processos fermentativos resultam em redução do crescimento, redução do metabolismo e melhoria da viabilidade celular, com efeitos variáveis sobre a produtividade em cultivos em batelada (FURUKAWA et al., 1998). Em cultivos de células de animais, um aumento na produção de proteína recombinante foi conseguido baixando a temperatura do processo (YOON et al., 2003). Constantinides *et al.* (1970) relataram um aumento de 15 % na produção de penicilina com uma temperatura reduzida em cultivos em batelada.

Muitos estudos têm sido realizados sobre as necessidades nutricionais das culturas de *S. clavuligerus* e as influências do pH e temperatura na degradação do AC (CHEN et al., 2002; BERSANETTI et al., 2005). No entanto, a influência da temperatura sobre o crescimento celular e consumo do substrato durante o processo de produção de AC tem recebido pouca atenção, apesar da importância da temperatura na otimização da produção de biomoléculas utilizando culturas de células. Investigações têm sugerido que uma redução da temperatura do processo resulta em maior viabilidade celular, com uma diminuição na velocidade de crescimento específico e supressão da liberação de produtos residuais (WEIDDMAN et al., 1994; CHUPPA et al., 1998).

Adicionalmente, um fator importante e benéfico do processo a baixas temperaturas é o aumento da solubilidade do oxigênio na fase aquosa.

O AC é tradicionalmente produzido em cultivos realizados em 28 ou 30°C (BAPTISTA-NETO et al., 2005). Embora esta faixa de temperatura favoreça o crescimento de *S. clavuligerus*, não é apropriada para um consumo lento da fonte de carbono, que pode minimizar os efeitos de inibição, e nesta faixa a degradação do AC se torna mais pronunciada do que a 20°C (BERSANETTI et al., 2005).

Considerando o importante efeito da temperatura sobre o crescimento celular, o consumo de substrato e na degradação do AC, o presente trabalho investigou a produção de AC por *S. clavuligerus* em cultivos realizados sob diferentes condições de temperatura. Cultivos em batelada e cultivos em batelada com pulsos de glicerol foram realizados a temperatura constante e com redução da temperatura após a fase inicial de crescimento celular, a fim de avaliar os efeitos sobre as velocidades de consumo de glicerol, produção e degradação de AC.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, conservado na forma de células vegetativas suspensas em solução crioprotetora contendo 10% v/v de glicerol a -70°C.

3.2.2. Meios de cultura

Meio de cultura de reativação

Em todos os ensaios foi utilizado o meio de cultura de reativação proposto por Rosa et al. (2005), descrito na **Tabela 3.1**. O pH foi ajustado em 6,8 e o meio de cultura esterilizado a 121°C e 1 atm por 15 minutos.

Tabela 3.1 - Meio de cultura de Rosa et al. (2005)

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	21
Peptona bacteriológica	10
Extrato de levedura	1
Extrato de malte	10
Tampão MOPS	21
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75
Solução de sais*	(1mL/L)

* Composição (g/L de água destilada): MnCl₂.4H₂O, 1,0; FeSO₄.7H₂O, 1,0; ZnSO₄.7H₂O, 1,0; água destilada.

Meios de cultura de crescimento e produção

Os meios de cultura de inóculo e de produção tiveram a mesma composição e foram baseados no meio proposto por Teodoro et al. (2006), (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2 - Meio de cultura de Teodoro et al. (2006) modificado.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	15
Proteína isolada de soja	25
Tampão MOPS	21
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75
Solução de sais*	(1mL/L)

O meio de cultura original proposto por Teodoro et al. (2006) contém óleo de soja (1 g/L) na sua composição. Neste estudo, o óleo de soja foi retirado da constituição dos meios de cultura de produção e de inóculo para garantir que os resultados em termos de produção de AC fossem exclusivamente em função do consumo de glicerol como única fonte de carbono.

3.2.3. Ensaio de produção de AC

O procedimento para execução dos cultivos em mesa incubadora rotativa foi descrito por Rosa et al. (2005) e consiste de três etapas: reativação do micro-organismo, crescimento e produção, sendo que os meios de cultura estão representados nas **Tabelas 3.1 e 3.2.**

3,5 mL de suspensão de células vegetativas foram transferidas dos tubos criogênicos para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio de reativação e incubados em mesa incubadora rotativa a 250 rpm, 30°C durante 24 horas (fase de reativação). Frascos Erlenmeyer (500 mL) contendo 45 ml do meio inóculo foram inoculados com 5 mL de caldo de reativação e incubados nas mesmas condições anteriores (fase de crescimento). Na fase de produção, a suspensão de inóculo (na proporção de 10% v / v) foi transferida sob agitação, para um balão de 3 L contendo o meio de produção. Volumes de 50 mL deste meio foram bombeados individualmente para frascos Erlenmeyer (500 mL) e incubados a 250 rpm sob as seguintes condições: **(Figura 3.1).**

Cultivos em batelada (B) a temperatura constante: três cultivos em batelada foram realizadas a temperaturas constantes de 30 (B30-30), 25 (B25-25) e 20°C (B20-20).

Cultivos em batelada com pulsos de glicerol (BP) a temperatura constante: doze cultivos em batelada com 1, 2, 3 ou 4 pulsos de glicerol (BP) foram realizados a temperaturas constantes de 30 25 e 20°C, nomeados como BP30-30-1, BP30-30-2, BP30-30-3, BP30-30-4, BP25-25-1, BP25-25-2, BP25-25-3, BP25-25-4, BP20-20-1, BP20-20-2, BP20-20-3 e BP20-20-4, respectivamente. A sigla BP30-30-1 representa um cultivo em batelada a 30°C na etapa de crescimento (trofofase) com 1 pulso de glicerol e manutenção da temperatura de 30°C após o pulso.

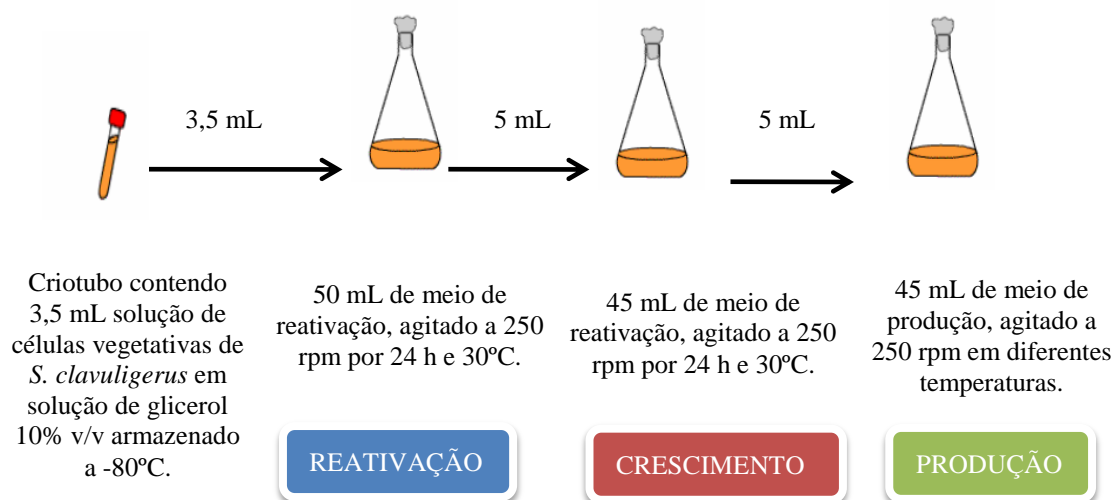
Cultivos em batelada (B) com redução de temperatura: de três cultivos em batelada foram conduzidos a 30 ou 25°C durante a fase de crescimento celular, em seguida, a temperatura do cultivo foi reduzida para 25 (B30-25) ou 20°C (B30-20 e B25-20), respectivamente.

Cultivos em batelada com redução de temperatura e pulsos (BP) de glicerol: doze cultivos em batelada foram realizados com a redução da temperatura (30 a 25, 30 a 20 e de 25 para 20°C) e com 1, 2, 3 ou 4 pulsos de glicerol (BP). Eles foram

denominados como BP30-25-1, BP30-25-2 BP30-25-3, BP30-25-4, BP30-20-1, BP30-20-2, BP30-20-3, BP30-20-4, BP25-20-1, BP25-20-2 BP25-20-3 e BP25-20-4, respectivamente.

Para os cultivos com pulsos de glicerol, um volume pré-determinado de solução de glicerol (100 g/L) era adicionado a cada vez que a sua concentração no caldo atingiu valores menores que 2,0 g/L, a fim de manter a concentração de entre 9,0 e 12,0 g/L após o primeiro pulso. As condições de cultivo encontram-se resumidos na **Tabela 3.3**. Ao longo das fermentações amostras de caldo (1 ml) foram retiradas a cada 12 horas, aproximadamente, centrifugadas a 3.720 x g durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram usados para análises das concentrações de AC e glicerol. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, somando um total de 90 cultivos. O cultivo em batelada realizado a 30°C (B30-30) foi utilizado como controle.

Figura 3.1 - Procedimento experimental para cultivos de *S. clavuligerus* em mesa incubadora rotativa.



3.2.4. Ensaios de degradação de AC

Em paralelo aos ensaios de produção de AC, foi avaliada a degradação do AC nos caldos de fermentação em temperaturas constantes de 30, 25 e 20°C. Cinco amostras de caldo de fermentação (50 mL de caldo de cultura) provenientes dos cultivos BP30-30-4 BP30-25-4 e BP30-20-4 foram retiradas em tempos intermediários entre o até o final do cultivo. As amostras foram centrifugadas, esterilizadas por filtração através de uma membrana de 0,22 µm estéril e utilizados nos ensaios de degradação

AC. Estudos cinéticos de hidrólise de AC foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 100 mL contendo 25 mL de caldo fermentado a temperaturas constantes de 20, 25 e 30°C. Amostras de 0,5 mL de caldo de cultivo foram retiradas periodicamente e a concentração de AC (C_{AC} , mg/L) foi determinada.

3.2.4. Cálculo dos parâmetros de cultivo

Velocidade de consumo de glicerol (r_G)

Com base nos valores obtidos de concentração de substrato (C_G) em função do tempo (t) dos cultivos, foram calculadas as velocidades médias de consumo do substrato no instante t (**Equação 3.1**):

$$r_G = \frac{C_{G0} - C_G(t)}{t} \quad (\text{g/L.h}) \quad \text{(Equação 3.1)}$$

onde:

C_{G0} : concentração inicial de glicerol no início do cultivo (g/L);

$C_G(t)$: concentração de glicerol no tempo “t” de exaustão no caldo de cultivo (g/L);

t: tempo de exaustão do glicerol (h).

Coefficiente de rendimento global de substrato (glicerol) a células ($Y_{X/G}$)

O **coeficiente de rendimento global** de glicerol em células foi obtido utilizando-se a **Equação 3.2**. Para esse cálculo foram utilizados valores médios das concentrações celulares e de substratos determinados em triplicatas. Foram considerados os valores máximos de concentração celular.

$$Y_{X/G} = \frac{C_{X_{\max}} - C_{X0}}{C_{G0} - C_G(t)} \quad (\text{g}_X/\text{g}_G) \quad \text{(Equação 3.2)}$$

onde:

$C_{X_{\max}}$: concentração máxima de célula no tempo “t” de cultivo (g_X/L);

C_{X0} : concentração celular no início do cultivo (g_X/L);

$C_G(t)$: concentração de glicerol no tempo “t” do cultivo (g_G/L);

C_{G0} : concentração de glicerol no início do cultivo (g_G/L).

Coefficiente de rendimento de células em produto (AC) ($Y_{AC/X}$)

Valores do **coeficiente de rendimento de células em produto** ($Y_{AC/X}$) foram obtidos através da **equação 3.3**. Foram considerados os tempos em que foram obtidas as concentrações máximas de AC.

$$Y_{AC/X} = \frac{C_{ACmax} - C_{AC0}}{C_{X0} - C_X(t)} \quad (g_{AC}/g_X) \quad \text{(Equação 3.3)}$$

onde:

C_{ACmax} : concentração máxima de AC no tempo “t” de cultivo (mg_{AC}/L);

C_{AC0} : concentração de AC no início de cultivo (mg_{AC}/L);

$C_X(t)$: concentração celular no tempo ‘t’ de cultivo (g_X/L);

C_{X0} : concentração celular, em massa seca, no início do cultivo (g_X/L).

Coefficiente de rendimento de substrato (glicerol) em produto ($Y_{AC/G}$)

Valores do **coeficiente de rendimento de substrato (glicerol) em produto (AC)** foram obtidos através da **equação 3.4**. Foram considerados os tempos em que foram obtidas as concentrações máximas de AC.

$$Y_{AC/G} = \frac{C_{ACmax} - C_{AC0}}{C_{G0} - C_G(t)} \quad (g_{AC}/g_G) \quad \text{(Equação 3.4)}$$

onde:

C_{ACmax} : concentração máxima de AC no tempo “t” de cultivo (mg_{AC}/L);

C_{AC0} : concentração de AC no início de cultivo (mg_{AC}/L);

$C_G(t)$: concentração de glicerol no tempo “t” do cultivo (g_G/L); C_{G0} : concentração de glicerol no início do cultivo (g_G/L)

Cálculo da produtividade máxima em AC (P_{ACmax})

A produtividade máxima em ácido clavulânico (P_{ACmax}) foi calculada de acordo com a **equação 3.5**.

$$P_{ACmax} = \frac{C_{ACmax}}{t} \quad (\text{mg/L.h}) \quad \text{(Equação 3.5)}$$

onde:

C_{ACmax} : concentração máxima de AC obtida no tempo 't' (mg/L);

t : tempo "t" de cultivo onde $C_{AC}=C_{ACmax}$ (h).

3.2.5. Obtenção das velocidades de produção AC e de degradação de AC

A constante de degradação de AC (k_{dAC}) foi obtida através de um modelo de pseudo-primeira ordem (**Equação 3.6**):

$$dC_{AC}/d_t = -k_{dAC} \cdot C_{AC} \quad \text{(Equação 3.6)}$$

$$\ln \frac{C_{AC0}}{C_{AC}} = k_{dAC} \cdot t \quad \text{(Equação 3.7)}$$

$$C_{AC} = C_{AC0} \cdot e^{-k_{dAC} \cdot t} \quad \text{(Equação 3.8)}$$

onde:

C_{AC0} : concentração inicial de AC no caldo de cultivo (mg/L);

C_{AC} : concentração de AC no caldo de cultivo no tempo 't' (mg/L);

k_{dAC} : constante de degradação de AC (h^{-1}).

Os valores k_{dAC} foram estimados por regressão linear dos dados experimentais. Cinco amostras de caldo de fermentação a partir dos cultivos BP20-20-4, BP25-25-4 e BP30-30-4 foram utilizados para determinar k_{dAC} e foi obtido o valor médio para cada temperatura.

Substituindo os valores de k_{dAC} e C_{AC} na **Equação 3.12** foi possível calcular a velocidade de degradação de AC (r_{dAC} , mg/L/h). A partir dos dados experimentais de acúmulo de AC (d_{AC}/d_t , mg/L/h) e do k_{dAC} (h^{-1}), foram calculados os valores das velocidades de degradação de AC (r_{dAC} , mg/L/h) e líquida de produção de AC pelas células (r_{AC} , mg/L/h) a partir do balanço de massa para o AC em cultivo em batelada.

Balanço de massa para o AC no cultivo em batelada:

$$\text{sai (AC)} = \text{entra (AC)} + \text{gera (AC)} - \text{consome (AC)} - \text{acumula (AC)} \quad \text{(Equação 3.9)}$$

No processo em batelada, tem-se que:

$$\text{sai (AC)} = \text{entra (AC)} = 0$$

Logo:

$$\text{acumula (AC)} = \text{gera (AC)} - \text{consome (AC)} \quad \text{(Equação 3.10)}$$

$$d\bar{C}_{AC} / dt = \bar{r}_{AC} - \bar{r}_{dAC} \quad \text{(Equação 3.11)}$$

ou

$$d\bar{C}_{AC} / dt = \bar{r}_{AC} - \bar{k}_{dAC} \cdot \bar{C}_{AC} \quad \text{(Equação 3.12)}$$

onde:

$d\bar{C}_{AC} / dt$: acúmulo de AC no caldo de cultivo ou velocidade global (observada) de produção de AC (mg/L/h)

\bar{r}_{AC} : velocidade líquida média de produção de AC (mg/L/h)

\bar{r}_{dAC} : velocidade média de degradação de AC (mg/L/h)

\bar{k}_{dAC} : constante cinética média de degradação de AC entre o início e o final de cada pulso de glicerol (h^{-1})

\bar{C}_{AC} : concentração média de AC no intervalo de tempo entre cada pulso de glicerol (mg/L)

3.2.6. Metodologia Analítica

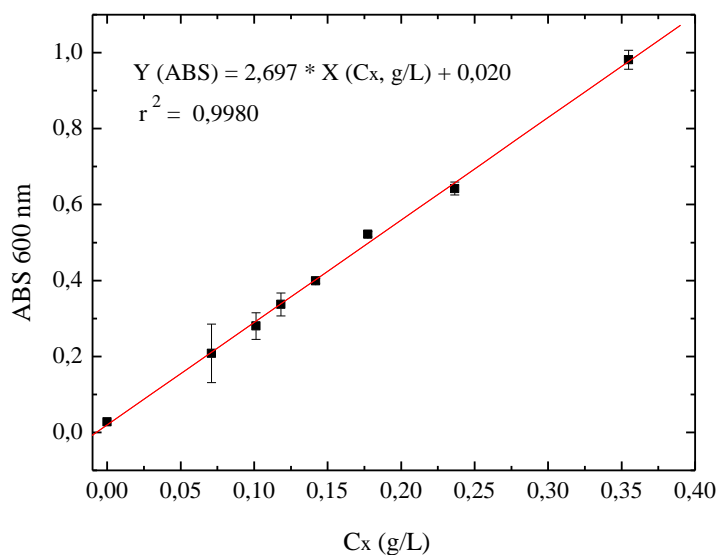
Análise da concentração celular

Dada a dificuldade de se obter medidas diretas da concentração celular em cultivos de micro-organismos filamentosos como *S. clavuligerus* em meio de cultura contendo partículas insolúveis, adaptou-se uma metodologia proposta por Mayer e Deckwer (1996) que mais se aproxima dos resultados esperados para crescimento celular ao longo do tempo durante os cultivos.

Medidas da absorvância a 600 nm (Abs_{600}) de suspensões celulares de *S. clavuligerus* em meio líquido solúvel contendo Soytone® (mesma composição que o meio descrito na Tabela 3.2, contendo Soytone® em substituição da proteína isolada de

soja) foram relacionadas com a concentração celular obtida por massa seca (C_x , g/L) através de um modelo linear. Para determinação da massa seca, a suspensão celular foi centrifugada a $3250 \times g$ e 4°C por 15 min e a massa celular foi lavada duas vezes com solução salina (NaCl 0,9% m/v), seca em estufa a 75°C e a massa de células medida em balança analítica. Os ensaios foram realizados em triplicata (**Figura 3.2**).

Figura 3.2 - Curva de calibração para a concentração celular em função de medidas de Abs_{600} : (■) pontos experimentais com desvios padrão; (—) reta estimada pela regressão linear dos dados experimentais.



Para a medida de Abs_{600} em caldo de cultivo contendo partículas insolúveis foram realizados testes para decantação gravimétrica das partículas. Após a decantação das partículas por 45 s, a fase de topo contendo as células foi recolhida para as leituras de Abs_{600} , agitadas em Vortex durante 30 s para desagregação das células e procedida a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 600 nm. A concentração celular foi estimada pelo modelo linear obtido para meio contendo Soytone®.

Há muitos tipos de análises utilizadas para medir as concentrações de células em meios de cultivos livre de partículas sólidas, no entanto, há pouca informação disponível sobre as medidas de concentrações de células na presença de partículas sólidas. No presente trabalho, foram também testados outras técnicas para a determinação da concentração de células na presença de partículas sólidas. Foram feitas medidas de proteína total (GUERLAVA et al., 1998; OOIJKAS et al., 1998) extração e

quantificação de DNA e também a contagem de colônias em placas (ESPEJO et al., 1987). No entanto, a extração da proteína por meio de lavagem não elimina de forma eficiente todas as proteínas do meio, gerando resultados superestimados da concentração celular. Também não foi possível medir o crescimento celular quantificando o conteúdo de DNA, uma vez que a camada de lipoproteína formada no processo de extração inviabiliza a extração de DNA total a partir de pequenas amostras e a contagem de colônias sobre placas gerou resultados falsos, pois *Streptomyces sp.* tende a formar pellets em meios líquidos. As medições mais confiáveis da concentração de células em meios de cultura que contêm partículas sólidas foram, portanto, obtidas usando a metodologia adaptada de Mayer e Deckwer (1996) descrita acima.

Os resultados desta etapa do trabalho foram publicados no XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (2012)- COBEQ , Búzios-RJ.

Análise da concentração de AC

A concentração de AC no caldo de fermentação foi determinada por análise espectrofotométrica em comprimento de onda de 311 nm após derivatização (Bird *et al.*, 1982). AC contido no produto farmacêutico Clavulin® (Glaxo SmithKline - Farmacêutica, Rio de Janeiro, Brasil) foi utilizado como padrão. Foram preparadas soluções contendo AC nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 mg/L.

Inicialmente, deve ser obtida a relação entre concentração e absorvância a 505 nm e concentração de glicerol (curva de calibração). O procedimento experimental para obter a curva de calibração foi o seguinte:

Foram preparadas duas soluções diferentes (A e B) em tubos de ensaio, contendo 0,5 mL das soluções contendo AC nas concentrações citadas. Na solução A, adicionou-se 2,5 mL de água destilada. Na solução B, adicionou-se 2,5 mL de solução de imidazol (60 g/L, pH 6,8).

As reações foram conduzidas em banho termostático a 30°C durante 15 min. Após o resfriamento, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 311 nm utilizando cubetas de quartzo e obtidas as relações entre absorvância e concentração de AC.

As concentrações de glicerol nas amostras de caldo fermentativo foram obtidas a partir da curva de calibração.

Análise da concentração de glicerol

A concentração de glicerol no sobrenadante foi determinada por método enzimático usando um kit colorimétrico enzimático de GPO-PAP triglicérides (Laborlab, Brasil). A reação enzimática gera um complexo de cor que pode ser determinado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 505 nm.

Inicialmente, deve ser obtida a relação entre concentração e absorbância a 505 nm e concentração de glicerol (curva de calibração). Para isso, foram feitas diluições de uma solução de glicerol 1 g/L de modo a se obter concentrações finais de 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; e 1,0 g/L. A 1 mL dessas soluções foram adicionados 10 µL do reagente enzimático para triacilglicerídeos. A formação de cor ocorre após 15 min em temperatura ambiente, sendo estável por 1h. A medida de absorbância foi relacionada com a concentração de glicerol da amostra por regressão linear dos resultados obtidos (absorbância x concentração de glicerol). Esse procedimento foi realizado para cada lote diferente de reagente enzimático utilizado nos experimentos.

As concentrações de glicerol nas amostras de caldo fermentativo foram obtidas a partir da curva de calibração.

3.3. Resultados e Discussão

Na Tabela 3.3 constam as condições experimentais e os principais resultados obtidos nos cultivos realizados em batelada (B) e batelada com pulsos de glicerol (BP).

Tabela 3.3 – Condições experimentais e resultados dos cultivos em batelada (B) e batelada com pulsos de glicerol (BP)

Cultivo	T_i (°C)	T_G (°C)	Pulsos	C_{ACmax} (mg/L)	P_{ACmax} (mg/L/h)	r_G (g/L/h)	Y_{X/G} (g/g)	Y_{AC/G} (mg/g)	Y_{AC/X} (mg/g)
B30-30	30	30	0	168,7	2,7	0,268	0,55	11,6	10,4
B25-25	25	25	0	631,6	6,4	0,230	0,50	40,4	55,9
B20-20	20	20	0	1266,2	7,5	0,102	0,37	58,5	106,8
B30-25	30	25	0	488,0	5,8	0,298	0,52	32,0	32,2
B30-20	30	20	0	382,7	3,1	0,284	0,47	20,8	32,5
B25-20	25	20	0	683,4	9,5	0,325	0,42	35,3	63,2
BP30-30-1	30	30	1	200,2	1,8	0,320	0,47	8,1	14,8
BP30-30-2	30	30	2	267,6	2,3	0,373	0,38	7,3	7,8
BP30-30-3	30	30	3	321,0	2,4	0,386	0,37	7,1	14,0
BP30-30-4	30	30	4	440,1	2,7	0,369	0,32	8,9	20,5
BP25-25-1	25	25	1	1051,9	9,5	0,284	0,39	47,5	89,7
BP25-25-2	25	25	2	1184,6	9,7	0,276	0,39	35,9	115,7
BP25-25-3	25	25	3	1169,0	10,5	0,247	0,40	33,7	149,7
BP25-25-4	25	25	4	1122,1	9,2	0,196	0,59	30,7	125,2
BP20-20-1	20	20	1	1534,3	5,3	0,102	0,53	45,0	162,6
BP20-20-2	20	20	2	1495,1	4,8	0,088	0,53	40,3	178,4
BP20-20-3	20	20	3	1465,4	5,1	0,082	0,53	42,8	169,7
BP20-20-4	20	20	4	1460,0	5,1	0,082	0,54	43,0	171,2
BP30-25-1	30	25	1	495,0	5,9	0,338	0,29	19,9	50,8
BP30-25-2	30	25	2	708,7	4,9	0,342	0,34	17,6	52,6
BP30-25-3	30	25	3	1175,6	8,1	0,331	0,25	24,2	89,0
BP30-25-4	30	25	4	1074,9	5,1	0,308	0,25	15,9	113,6
BP30-20-1	30	20	1	534,6	3,3	0,314	0,29	16,6	47,6
BP30-20-2	30	20	2	1034,2	3,9	0,196	0,35	21,6	87,1
BP30-20-3	30	20	3	1012,0	3,9	0,152	0,35	19,5	97,6
BP30-20-4	30	20	4	908,2	3,0	0,170	0,36	22,6	72,0
BP25-20-1	25	20	1	1149,1	7,5	0,198	0,27	36,4	111,2
BP25-20-2	25	20	2	1042,0	10,0	0,198	0,48	26,0	112,4
BP25-20-3	25	20	3	988,7	6,7	0,183	0,31	31,8	111,0
BP25-20-4	25	20	4	1009,6	5,0	0,156	0,34	26,5	108,1

T_i: temperatura inicial; T_G: temperatura após exaustão de glicerol.

Onde:

T_i : temperatura inicial do cultivo;

T_G : temperatura do cultivo após exaustão do glicerol;

C_{ACmax} : concentração máxima de AC;

P_{ACmax} : produtividade máxima de AC;

r_G : velocidade de consumo de glicerol;

$Y_{X/G}$: coeficiente de rendimento de glicerol em células;

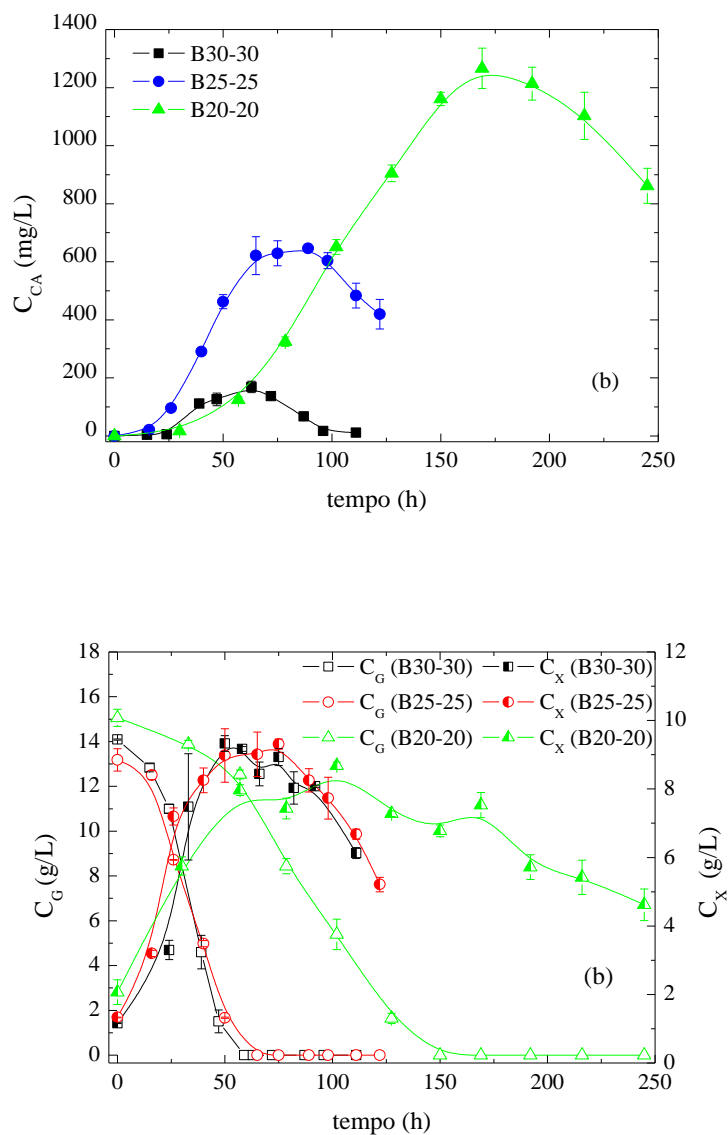
$Y_{AC/G}$: coeficiente de rendimento de glicerol em AC;

$Y_{AC/X}$: coeficiente de rendimento de células em AC.

3.3.1. Cultivos em batelada a temperatura constante

Três cultivos em batelada de *S. clavuligerus* ATCC 27064 em meio contendo 15 g/L de glicerol foram realizados em triplicata a temperaturas de 30 (B30-30), 25 (B25-25) e 20°C (B20-20), respectivamente. O cultivo realizado a 30°C foi considerado como controle e os resultados foram comparados com os do mesmo. A **Figura 3.3** ilustra o efeito da temperatura na produção de AC.

Figura 3.3 - Perfis de concentração ao longo do tempo nos cultivos em batelada a 30°C (B30-30), 25°C (B25-25) e 20°C (B20-20): (a) AC (C_{AC}) e (b) glicerol (C_G) e células (C_X).



A concentração máxima de AC (C_{ACmax}) aumentou com a diminuição da temperatura. No cultivo em batelada a 30°C (B30-30), a C_{ACmax} no caldo foi de 168,7 mg/L às 57 h de processo e no cultivo a 25°C (B25-25), a produção de AC foi 3,8 vezes maior do que a cultivo controle (631,6 mg/L às 75h de cultivo). O valor de C_{ACmax} no cultivo a 20°C (B20-20) foi de 1266,2 mg/L às 169 h, aproximadamente 7,5 vezes mais elevada do que o cultivo controle. As velocidades de consumo de glicerol (r_G) foram

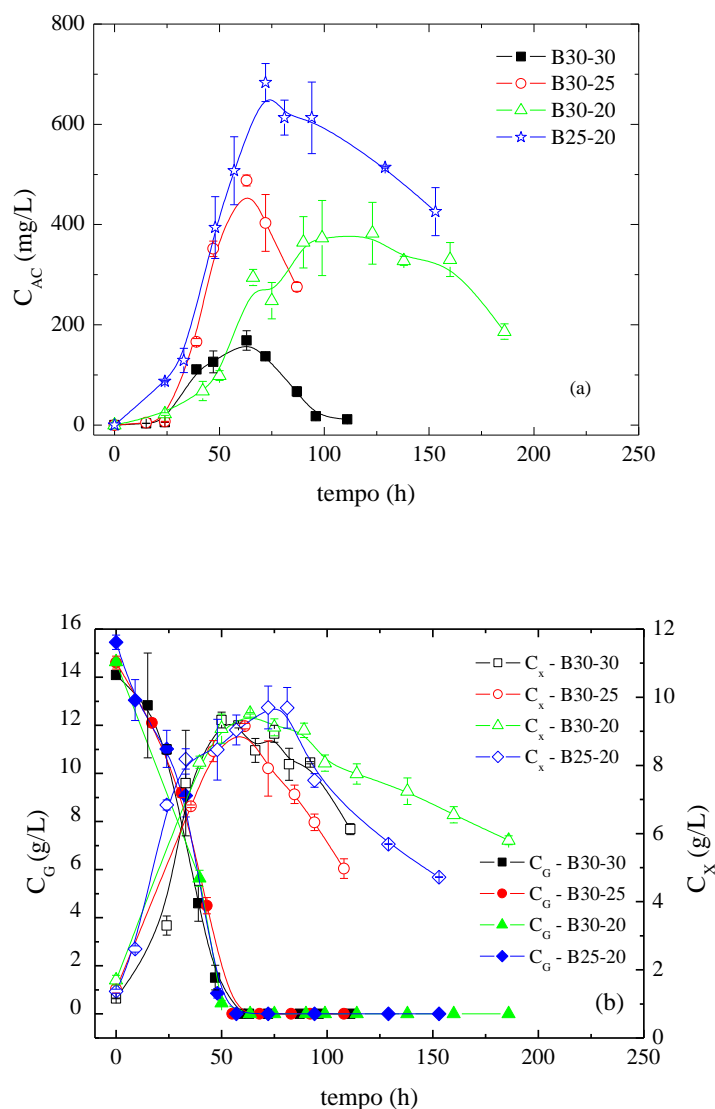
semelhantes nos cultivos a 25 e 30°C, cerca de 0,250 g/L/h, 2,5 vezes maior do que o valor obtido a 20°C (0,102 g/L/h). Segundo a literatura (REVILLA et al., 1973; BAPTISTA-NETO et al., 2005;), quando a concentração de glicerol é maior do que 20 g/L, a produção de AC pode diminuir devido à inibição pelo substrato. Verificou-se também que quando r_G é elevada, a produção de AC pode estar sendo limitada.

O efeito da temperatura sobre o crescimento celular também foi significativo. A concentração celular atingiu o valor mais elevado quando o cultivo foi conduzido a 30°C e foi muito similar aos resultados observados no cultivo a 25°C, enquanto que à 20°C a velocidade de crescimento celular e a concentração de células durante o período de fermentação foram menores. Apesar do menor crescimento a 20°C, o decaimento de células devido à morte celular foi reduzida pelo efeito da baixa temperatura e, provavelmente, estendeu a viabilidade celular contribuindo para o maior acúmulo de AC observado. O coeficiente de rendimento celular em relação ao glicerol ($Y_{X/G}$) reduziu cerca de 0,33 vezes a 20°C (0,37 g/g) em relação aos 30°C (0,55 g/g). Por outro lado, o coeficiente de rendimento do AC em relação ao glicerol ($Y_{AC/G}$) foi favorecido pela temperatura reduzida a 20°C (58,5 mg/g), cerca de 5,2 vezes maior do que o valor obtido a 30°C (11,6 mg/g). Estes resultados indicam que a temperatura que favorece o crescimento de células de *S. clavuligerus* e que favorece o acúmulo de AC no caldo de cultivo foram bastante diferentes e deve ser considerada para o processo de melhoria da produção de AC.

3.3.2. Cultivos em batelada com redução de temperatura

Uma vez constatado que as temperaturas ideais para o crescimento de células e formação de AC são diferentes, foi proposto um outro conjunto de ensaios com o uso de redução de temperatura durante o curso do cultivo, esperando que beneficiasse o crescimento celular no início do processo e, posteriormente, a redução de temperatura favorecesse a produção líquida de AC. O efeito de redução da temperatura na produção de AC foi então investigado alterando a temperatura do processo após ter alcançado o máximo crescimento celular e assim minimizar o efeito da massa total de células de acordo com as diferentes condições de temperatura. A **Figura 3.4** mostra o perfil das concentrações de AC, glicerol e células em cultivos B30-30 (controle) e empregando redução da temperatura, B30-25, B30-20 e B25-20 na fase de produção.

Figura 3.4 - Perfis de concentração ao longo do tempo nos cultivos controle (B30-30) e com redução de temperatura 30 para 25°C (B30-25), 30 para 20°C (B30-20) e 25 para 20°C (B25-20): (a) AC (C_{AC}) e (b) glicerol (C_G) e células (C_X).



Na fase inicial, as culturas foram mantidas a 30 e 25°C até o consumo total de glicerol. As velocidades de consumo de glicerol (r_G) nos cultivos a 30 e 25°C foram muito semelhantes (aproximadamente 0,45 mg/L/h) e a exaustão de glicerol ocorreu próximo a 50 h de cultivo. Neste momento, a temperatura foi reduzida para valores de 25 e 20°C. Em todos os cultivos com redução de temperatura a produção de AC mostrou um aumento repentino quando a temperatura foi reduzida e o glicerol foi esgotado no caldo, provavelmente devido à eliminação do efeito de inibição ou repressão associado à fonte de carbono e também à redução da degradação de AC pela baixa temperatura. Embora estes valores C_{ACmax} tenham sido menores do que os obtidos em cultivos em

batelada a temperatura constante (B25-25 e B20-20), a redução da temperatura aumentou C_{ACmax} por cerca de 2,2 vezes no cultivo B30-20 e 2,9 vezes no cultivo B30-25 em relação ao cultivo controle (B30-30). No cultivo B25-20, C_{ACmax} foi 4 vezes maior em relação ao controle.

Os crescimentos celulares (C_{Xmax} , g/L) nos cultivos B30-30, B30-25, B30-20 e B25-20 foram muito semelhantes atingindo valores máximos de 9,12; 9,15; 9,53 e 9,7 g/L, respectivamente, embora o decaimento devido à morte celular ocorreu mais lentamente após a mudança de temperatura para 20°C, como já discutido para os ensaios anteriores.

Nos cultivos com a redução da temperatura, todos os parâmetros relacionados com a produção de AC (C_{ACmax} , P_{ACmax} , $Y_{AC/G}$ e $Y_{AC/X}$) foram melhorados se comparado com o controle (B30-30), mas não se comparados com os cultivos conduzidos a temperatura reduzida constante, B25-25 e B20-20. A maior produção líquida de AC foi de 683,4 mg/L no cultivo B25-20 e deveu-se principalmente à redução da degradação a baixa temperatura, uma vez que um valor alto de r_G na fase inicial representa uma desvantagem para a produção de AC por *S. clavuligerus*.

3.3.3. Cultivos em batelada com pulsos de glicerol

Glicerol é essencial para a biossíntese de AC e é umas das melhores fontes de carbono para o processo de produção de AC (ELSON e OLIVER, 1978, BAGGALEY et al., 1997; IVES e BUSHELL, 1997). Chen et al. (2002) relataram que a biossíntese de AC durante fermentação em incubador rotativo por *S. clavuligerus* foi prolongada com alimentação de glicerol e a produção aumentou para 270 mg.L⁻¹ se comparado com o controle (115 mg/L) que não recebeu alimentação de glicerol. Neste trabalho, o efeito da alimentação por pulsos de glicerol na produção de AC por *S. clavuligerus* foi estudada sob temperaturas constantes de 30, 25 e 20°C e com redução de temperatura de 30 para 25°C, 30 para 20°C e 25 para 20°C, após o consumo de glicerol inicial.

3.3.3.1. Cultivos em batelada com pulsos de glicerol a temperatura constante

Nos ensaios em batelada a 30°C, o primeiro pulso se deu em 48 h de cultivo. Em seguida, pulsos adicionais de glicerol foram dados quando a concentração de glicerol no meio era inferior a 4 g.L⁻¹. O segundo pulso foi dado às 66 h de cultivo, o

terceiro às 84 h e o quarto em 108 h. As **Figuras 3.5, 3.6, 3.7 e 3.8** representam os resultados de produção de AC, crescimento celular e consumo de glicerol obtidos para os cultivos em batelada com pulsos a 30°C BP30-30-1, BP30-30-2, BP30-30-3 e BP30-30-4, respectivamente.

Figura 3.5 – Perfis de concentração de (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 1 pulso de glicerol a 30°C (BP30-30-1).

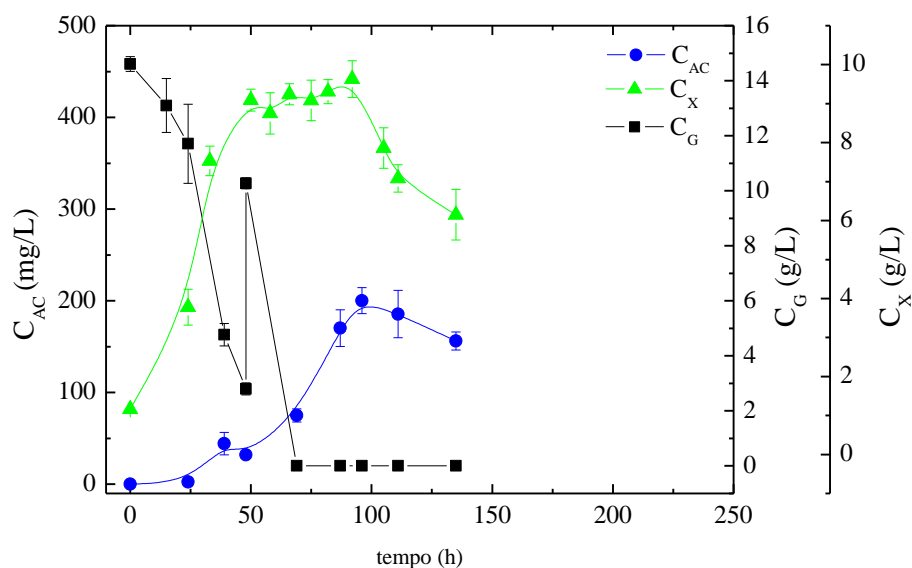


Figura 3.6 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 2 pulsos de glicerol a 30°C (BP30-30-2).

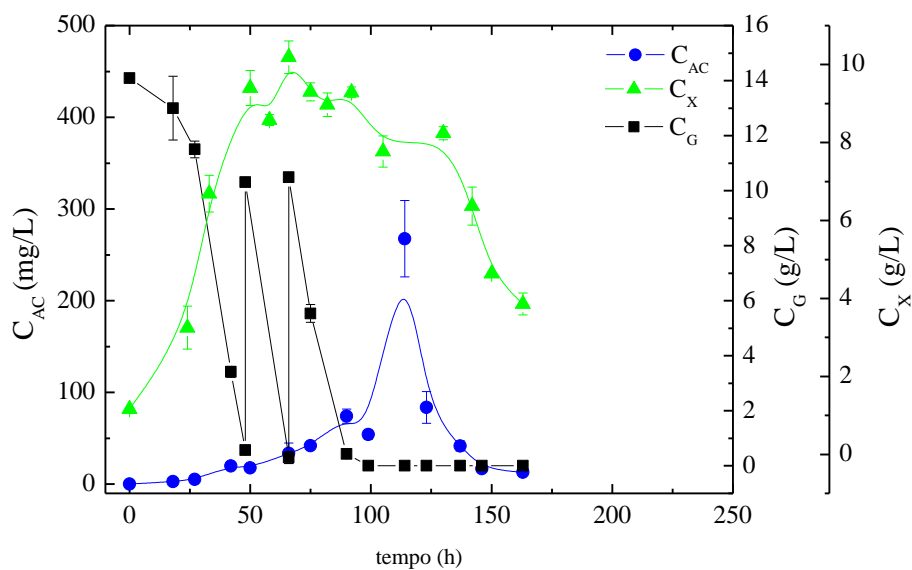


Figura 3.7 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 3 pulsos de glicerol a 30°C(BP30-30-3).

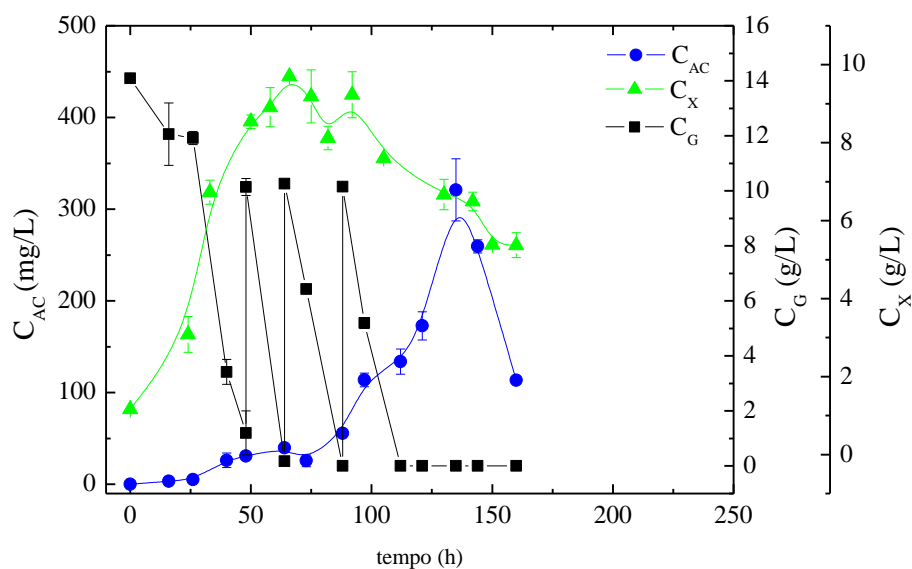
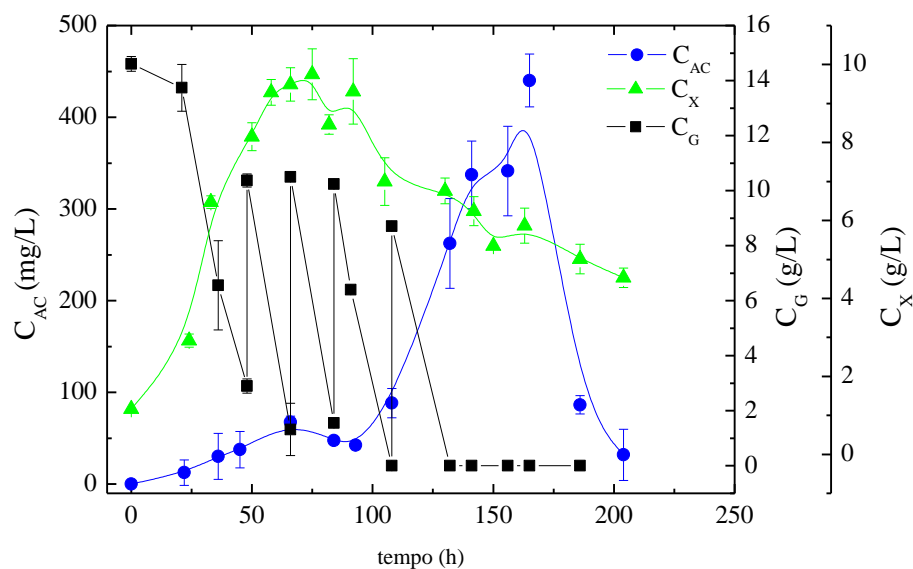


Figura 3.8 – Perfis de concentração de (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 4 pulsos de glicerol a 30°C(BP30-30-4).



Em todos os cultivos a 30°C com pulsos de glicerol a produção de AC aumentou com o aumento no número de pulsos, confirmando o observado por Chen et al. (2003). As velocidades de consumo de glicerol foram muito semelhantes nos ensaios e variaram entre 0,320 e 0,386 g/L/h, valor superior ao obtido no cultivo controle (0,268 g/L/h)

(**Tabela 3.3**). Apesar das concentrações máximas de AC obtidas terem aumentado com o número de pulsos, em geral as produtividades máximas ($P_{ACmáx}$) do processo foram inferiores à observada no cultivo controle (2,7 mg/L/h) variando entre (1,7 e 2,7 mg/L/h). As máximas concentrações celulares (C_{Xmax}) foram observadas em 66 h de cultivo e atingiram valores médios de aproximadamente 9,7 g/L nos cultivos a 30°C. Os coeficientes de rendimento de glicerol em AC ($Y_{AC/G}$) foram inferiores ao obtido no cultivo controle (11,6 mg/g). Isso sugere que o glicerol foi rapidamente consumido e mais direcionado ao metabolismo primário celular em detrimento da biossíntese de AC. No entanto, nota-se pelos resultados de rendimento de células em produto ($Y_{AC/X}$) que, em geral, os valores foram superiores ao controle (10,4 mg/g), indicando que para uma mesma massa de células foram produzidas maiores quantidades de AC. Esse efeito está provavelmente associado ao aumento da viabilidade celular dado pelo excesso de fonte de carbono nos cultivos com pulsos de glicerol.

A **Figura 3.8** ilustra o melhor resultado obtido para produção de AC a 30°C que ocorreu no ensaio com 4 pulsos de glicerol (BP30-30-4). A máxima concentração de AC foi de 440,1 mg/L, cerca de 2,6 vezes maior que a observada no ensaio controle.

Na sequência são apresentados os resultados dos perfis de concentração de AC, células e glicerol ao longo do tempo nos ensaios em batelada com pulsos de glicerol e temperatura constante a 25°C, ilustrados nas **Figura 3.9, 3.10, 3.11 e 3.12**.

Figura 3.9 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 1 pulso de glicerol e temperatura de 25°C (BP25-25-1).

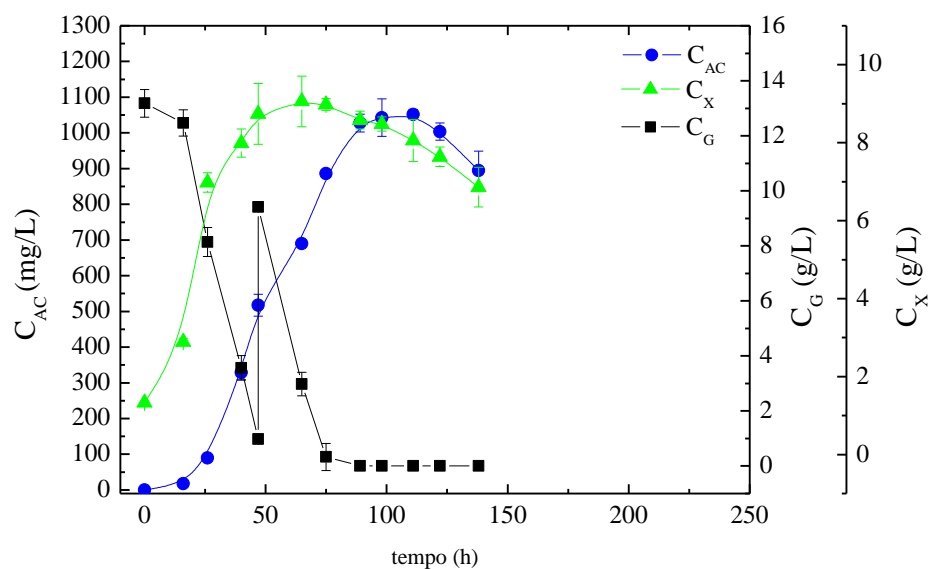


Figura 3.10 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 2 pulsos de glicerol e temperatura de 25°C (BP25-25-2).

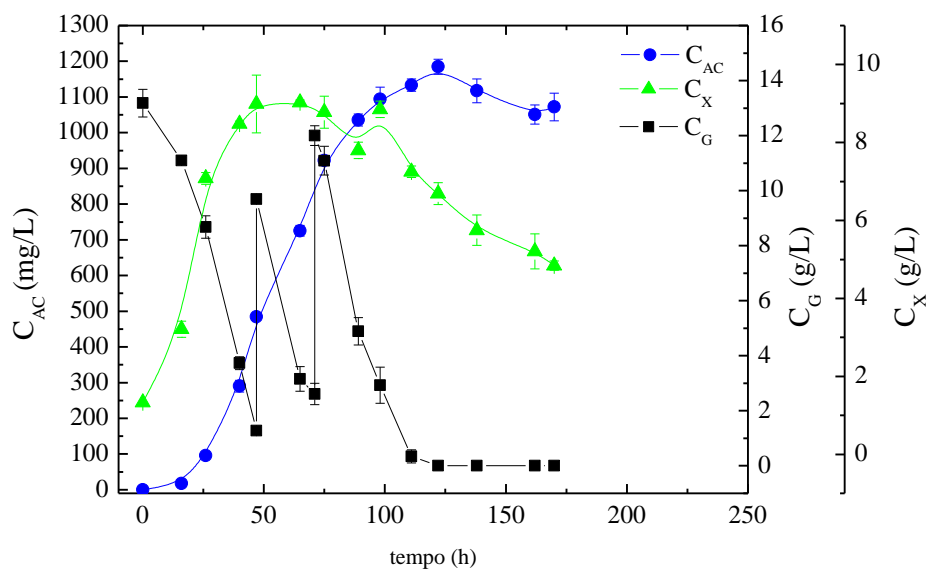


Figura 3.11 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 3 pulsos de glicerol e temperatura de 25°C (BP25-25-3).

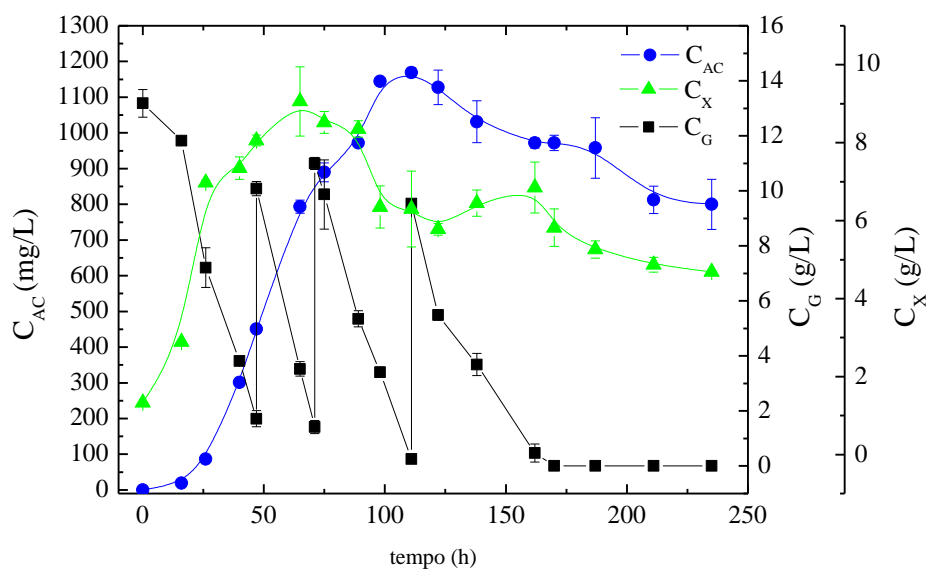
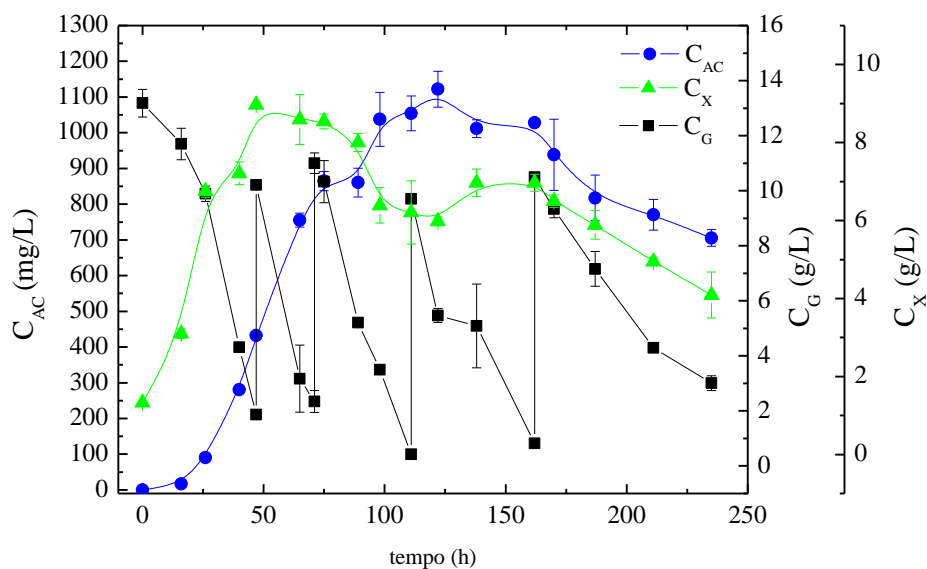


Figura 3.12 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 4 pulsos de glicerol e temperatura de 25°C (BP25-25-4).



Em todos os cultivos a 25°C, pulsos adicionais de glicerol foram dados como descrito anteriormente nas 47^a, 71^a, 111^a e 162^a h de cultivo.

As velocidades de consumo de glicerol para este conjunto de ensaios foram próximas à do cultivo controle (0,268 g/L/h) com variações entre 0,196 e 0,284 g/L/h, sendo que nos cultivos com 1 e 2 pulsos o consumo foi mais rápido. Os valores de

C_{ACmax} aumentaram com o número de pulsos até o segundo pulso quando se atingiu o valor máximo observado (1184,6 mg/L – BP25-25-2). No entanto, as C_{ACmax} de 1169,0 e 1122,1 mg/L observadas nos cultivos com 3 (BP25-25-3) e 4 (BP25-25-4) pulsos de glicerol, respectivamente, ficaram muito próximas à observada no cultivo BP25-25-2, rendendo altos valores de produtividade volumétrica máxima (P_{ACmax}).

As máximas concentrações celulares (C_{Xmax}) para os cultivos com pulsos de glicerol a 25°C atingiram valores próximos a 9 g/L às 65 h de cultivo, valor um pouco inferior aos cultivo a 30°C (9,7 g/L). No entanto a baixa temperatura desacelerou a velocidade de morte celular. Nesse sentido, observou-se um alto coeficiente de rendimento células em AC ($Y_{AC/X}$), resultando em valores de até 14 vezes maiores que o cultivo controle (B30-30).

Os resultados dos cultivos com pulsos de glicerol a temperatura constante de 20°C estão ilustrados nas **Figuras 3.13, 3.14 e 3.15**. Neste conjunto de ensaios, o decréscimo da concentração de AC acumulada em caldo de cultivo se deu antes do final do terceiro pulso, portanto o perfil das concentrações de AC, células e glicerol do ensaio BP20-20-4 se assemelha aos resultados obtidos para o ensaios BP20-20-3. Os resultados principais do ensaio BP20-20-4 estão apresentados na **Tabela 3.3**.

Figura 3.13 – Perfis de concentração de (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 1 pulso de glicerol e temperatura de 20°C (BP20-20-1).

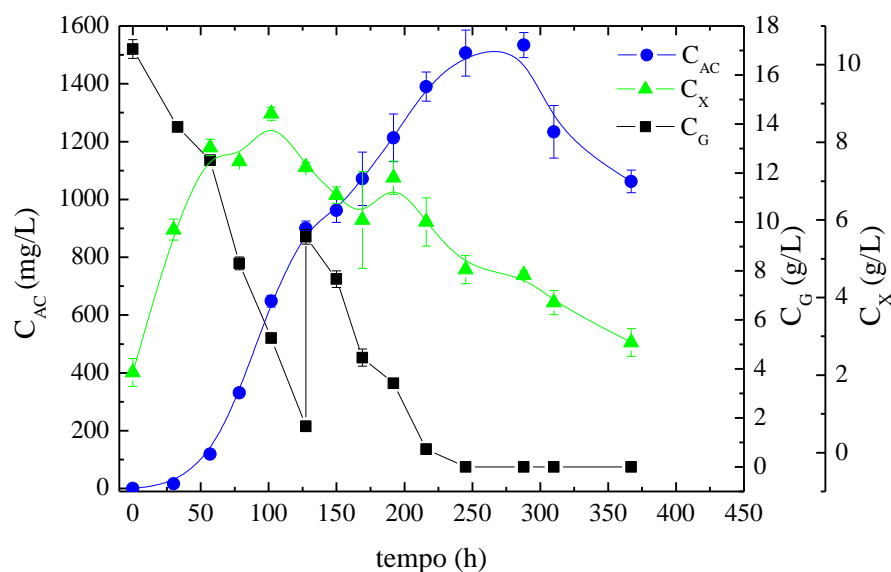


Figura 3.14 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo nos cultivos em batelada com 2 pulsos de glicerol e temperatura de 20°C (BP20-20-2)

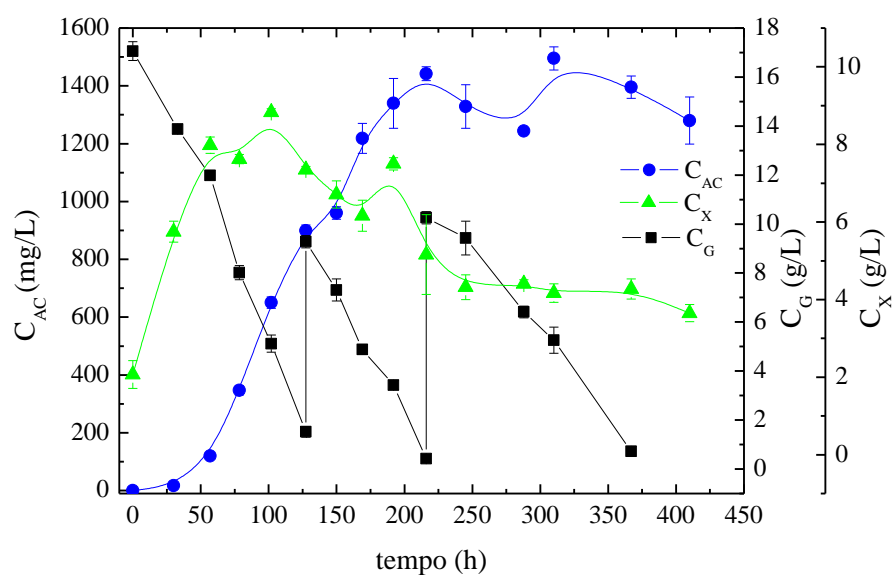
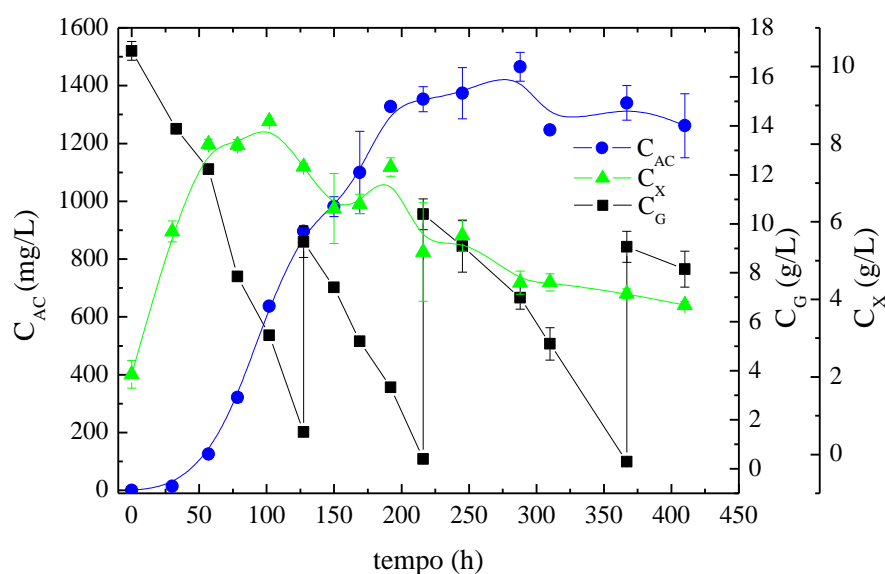


Figura 3.15 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 3 pulsos de glicerol e temperatura de 20°C (BP20-20-3).



Neste conjunto de ensaios, os pulsos de glicerol foram dados nas 127^a, 216^a e 367^a h de cultivo. A concentração máxima de AC (C_{ACmax}) de 1534,3 mg/L foi observada para o cultivo com um pulso de glicerol (BP20-20-1) às 288 h de cultivo. Este resultado provavelmente está relacionado à redução da inibição ou repressão causados pela fonte de carbono e evidenciados pela reduzida velocidade de consumo de

glicerol pelas células (0,102 g/L/h).

As concentrações celulares nos cultivos a 20°C aumentaram até a exaustão da concentração de glicerol inicial atingindo cerca de 8,4 g/L, seguida de um rápido decréscimo até o final dos cultivos. No entanto, o coeficiente de rendimento de glicerol em células ($Y_{X/G}$) para todos os cultivos a 20°C (em média 0,53 g/g) é muito próximo do resultado obtido para o cultivo controle (0,55 g/g). Isso sugere que a fonte de carbono foi mais utilizada para manutenção do metabolismo celular em detrimento do crescimento de células, o que provavelmente gerou células mais viáveis ao longo do tempo, refletindo nos maiores coeficientes de rendimento de célula em AC ($Y_{AC/X}$, cerca de 170 mg/g).

Apesar de ter sido observado os maiores valores de C_{ACmax} , as produtividades volumétrica máxima (P_{ACmax}) dos cultivos com pulsos a 20° foram baixos (em torno de 5,3 mg/L/h) em relação aos cultivos em batelada com pulsos a 25°C. Isto é resultado do maior período de duração das fermentações a 20°C.

3.3.3.2. Cultivos em batelada com pulsos de glicerol e redução de temperatura

Baseado na hipótese de que a quantidade inicial de glicerol foi consumida rapidamente pelo metabolismo primário durante a fase de crescimento celular a 30°C, prejudicando a produção de AC, esse conjunto de ensaios em batelada com redução de temperatura foi desenvolvido para avaliar a produção de AC nestas condições. A hipótese era que o uso da baixa temperatura minimizasse os efeitos de degradação levando ao maior acúmulo de AC no caldo de fermentação.

Os gráficos dos perfis de concentração de AC, células e glicerol ao longo do tempo para os ensaios em batelada com pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 25°C estão ilustrados nas **Figuras 3.16, 3.17, 3.18 e 3.19**.

Figura 3.16 – Perfis de concentração de (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 1 pulso de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 25°C (BP30-25-1).

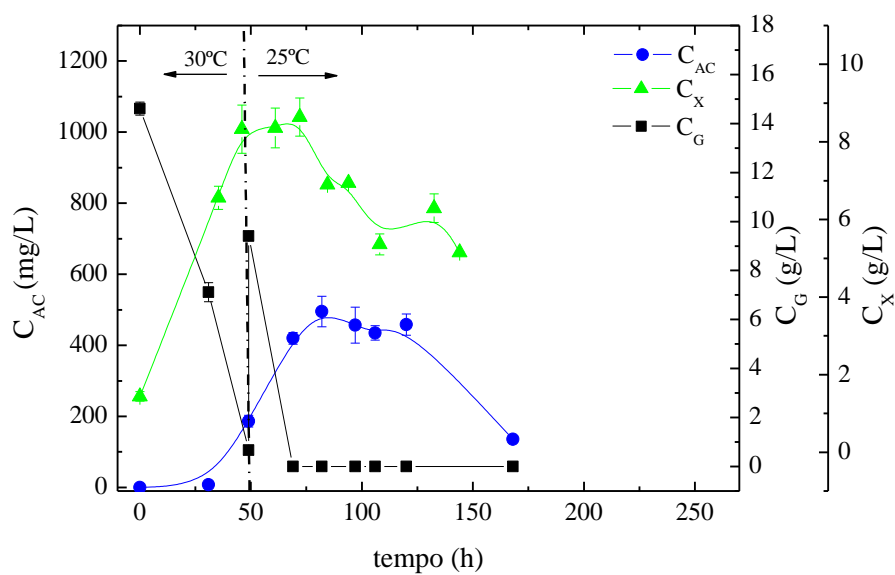


Figura 3.17 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 2 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 25°C (BP30-25-2).

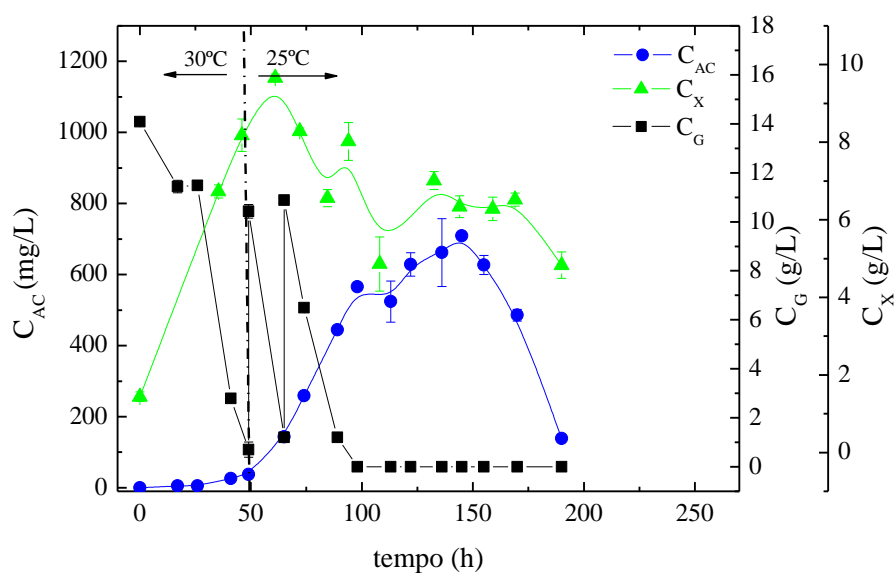


Figura 3.18 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 3 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 25°C (BP30-25-3).

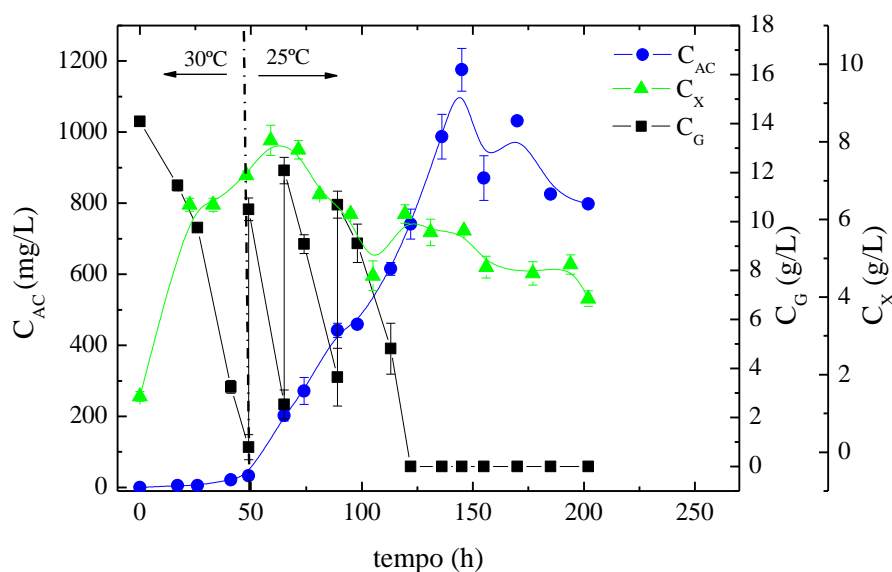
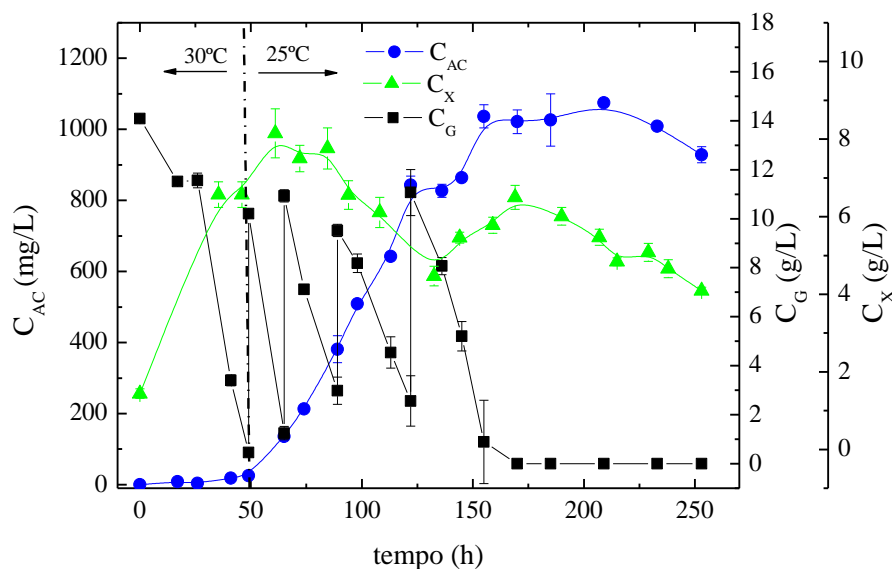


Figura 3.19 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 4 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 25°C (BP30-25-4).



Em todos os cultivos com pulso de glicerol e redução de temperatura de 30 para 25°C, a redução de temperatura ocorreu em 49 h de cultivo, após a exaustão de glicerol no caldo de cultivo. Pulsos adicionais de glicerol foram dados como descrito

anteriormente nas 71^a, 89^a e 122^a h de cultivo.

As velocidades de consumo de glicerol para este conjunto de ensaios foram superiores à do cultivo controle, com variações entre 0,308 e 0,342 g/L/h. As concentrações máximas de AC aumentaram com o número de pulsos até o terceiro pulso quando se atingiu o valor máximo. A concentração máxima de AC obtida no ensaio BP30-25-3 foi superior à obtida no cultivo BP30-25-4, sugerindo que o glicerol em excesso possa estar atuando como inibidor na biossíntese de AC. Ainda assim, observa-se que em todos os cultivos com redução de temperatura para 25°C a concentração máxima de AC foi bastante superior à do cultivo controle, atingindo valores de mais de 1 g/L. Além disso, os coeficientes de rendimento de glicerol em AC ($Y_{AC/G}$) foram muito superiores ao obtido no cultivo controle.

As células atingiram máxima concentração em caldo de cultivo logo após a exaustão da concentração inicial de glicerol em todos os cultivos, atingindo valores médios de 9 g/L. Com o efeito da redução da temperatura, a concentração celular foi reduzida no caldo de fermentação chegando a valores entre 6 e 8 g/L no final dos cultivos.

O cultivo BP-30-25-3 apresentou os melhores resultados desse conjunto de experimentos (**Figura 3.18**). Pode-se observar que a produção máxima de AC foi de 1115,6 mg/L, aproximadamente 6,6 vezes superior à obtida no cultivo controle. Além disso, também foi observada uma alta produtividade volumétrica em AC de 8,1 mg/L/h. A velocidade de consumo de glicerol foi de 0,331 g/L/h, cerca de 1,23 vezes maior que a verificada no cultivo controle. Novamente, as altas velocidades de consumo de glicerol observadas geram produtos de degradação intracelular que inibem a síntese de AC. A produção de AC obtida no cultivo BP-30-25-4 foi semelhante à obtida no cultivo BP-30-25-3, no entanto maior quantidade de fonte de carbono foi utilizada.

Para os demais cultivos com pulsos de glicerol, a redução de temperatura de 30 para 20°C ocorreu em 50 h de cultivo quando houve a exaustão de glicerol no caldo de fermentação (**Figura 3.20, 3.21, 3.22 e 3.23**). Os demais pulsos foram dados nas 68^a, 160^a e 239^a h de cultivo.

Figura 3.20 – Perfis de concentração de (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 1 pulso de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 20°C (BP30-20-1).

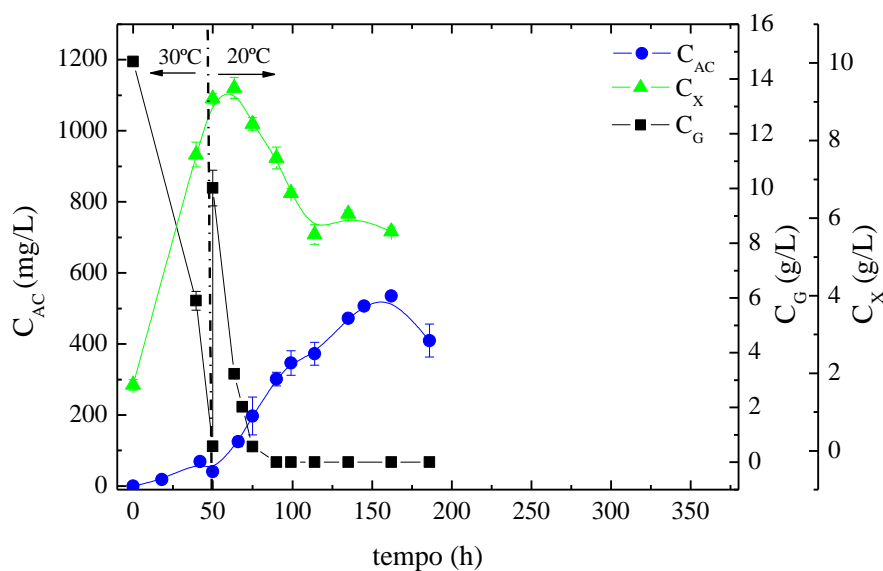


Figura 3.21 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 2 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 20°C (BP30-20-2).

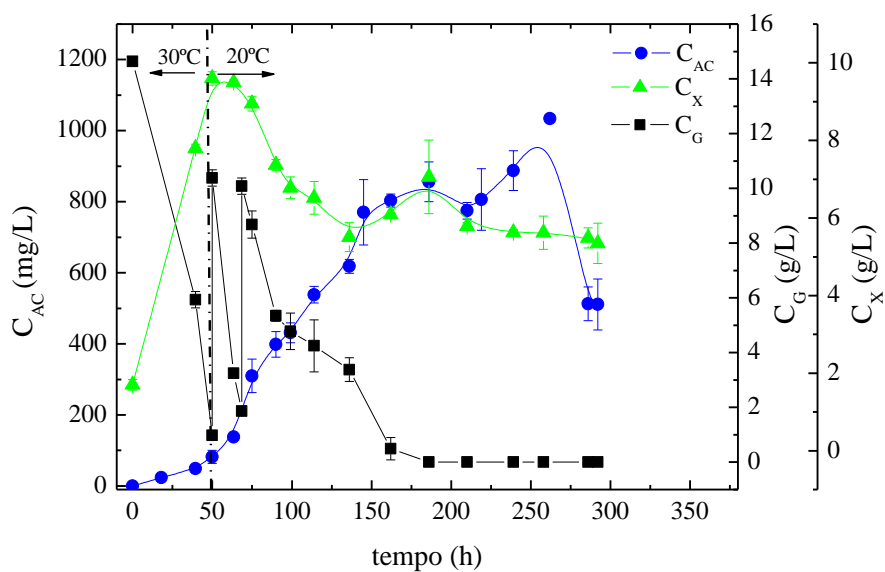


Figura 3.22 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 3 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 20°C (BP30-20-3).

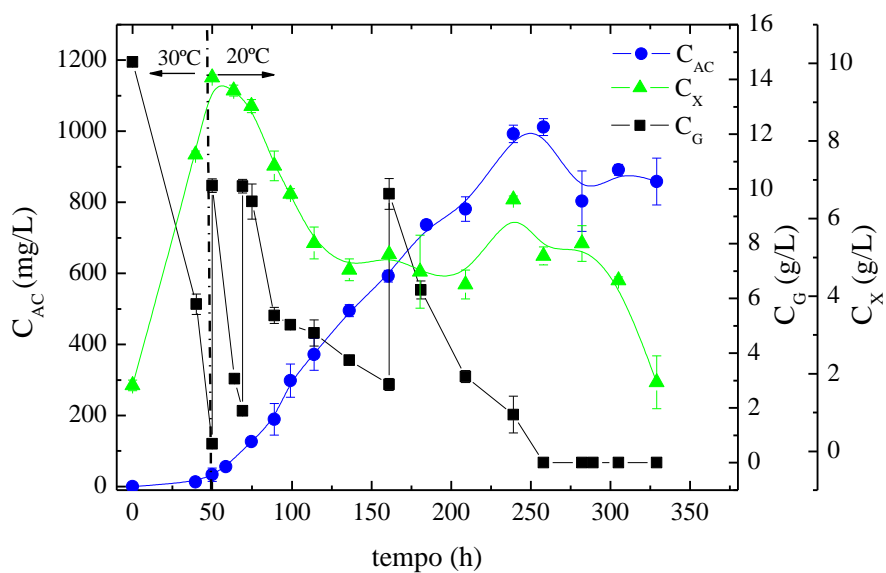
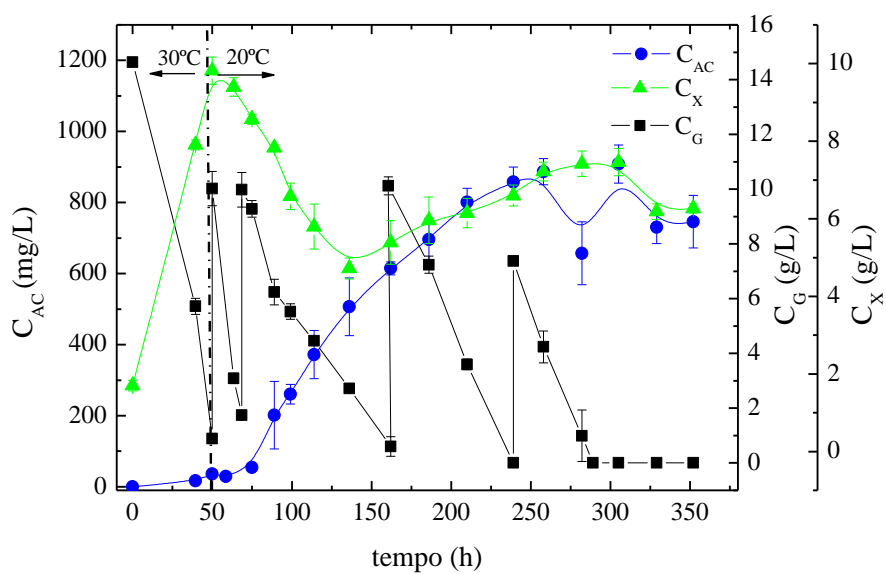


Figura 3.23 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 4 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 30 para 20°C (BP30-20-4).



Neste conjunto de ensaios, a velocidade de consumo de glicerol foi inferior às dos demais ensaios com redução de temperatura e pulsos de glicerol, sugerindo que a baixa temperatura regulou a velocidade de consumo de glicerol. Como observado na **Tabela 3.3**, as concentrações máximas de AC, produtividades máximas ($P_{ACmáx}$) e os coeficientes de rendimento glicerol em AC ($Y_{AC/G}$) obtidos nesses cultivos foram superiores às obtidas no cultivo controle, ressaltando a importância da temperatura no processo de otimização do AC.

Nestes ensaios, a concentração celular máxima também foi observada logo após a exaustão da concentração inicial de glicerol, seguida de um declínio causado pela redução da temperatura. No entanto, com o aumento de pulsos de glicerol, observou-se uma tendência de crescimento celular após chegar a uma concentração mínima por volta das 150 h de cultivo, sugerindo que a redução de temperatura causa uma alteração na fisiologia celular prejudicando o acúmulo de células no caldo de fermentação. No entanto, o excesso de fonte de carbono parece restabelecer a velocidade de crescimento celular.

Nestas condições, os melhores resultados foram obtidos no cultivo com 2 pulsos (BP30-20-2). A **Figura 3.21** ilustra os resultados obtidos nesse ensaio. A produção máxima de AC foi de 1034,2 mg/L, o que representa 6,1 vezes a produção máxima obtida no cultivo controle. Durante um longo período, 150 às 250 h de cultivo, a concentração de AC foi mantida em altos níveis, provavelmente devido à menor degradação de AC no caldo de fermentação nesta temperatura e à redução dos efeitos de inibição pela fonte de carbono, uma vez que a velocidade de consumo de glicerol foi 0,196 g/L/h.

Em seguida são apresentados os resultados dos cultivos com pulsos de glicerol e redução de temperatura de 25 para 20°C (**Figuras 3.24, 3.25, 3.26 e 3.27**).

Figura 3.24 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 1 pulso de glicerol e com redução de temperatura de 25 para 20°C (BP25-20-1).

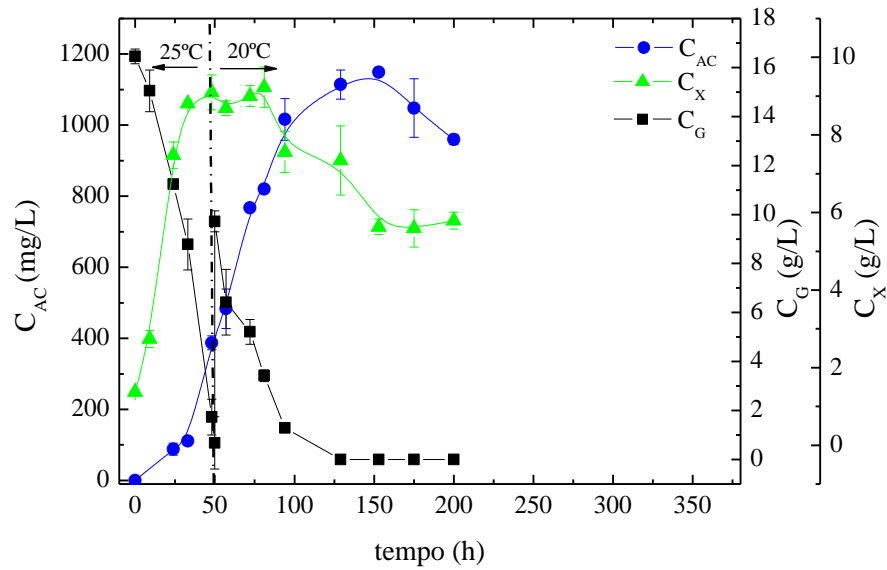


Figura 3.25 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 2 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 25 para 20°C (BP25-20-2).

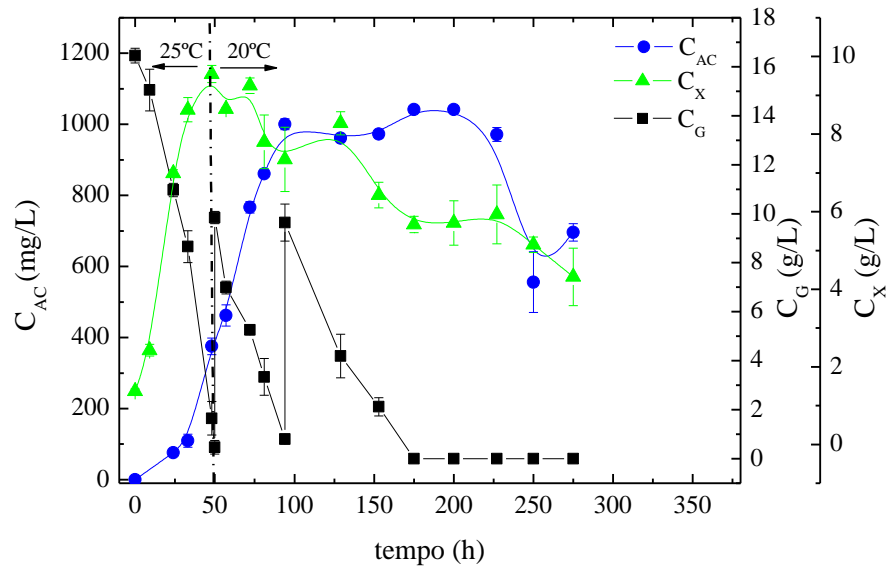


Figura 3.26 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 3 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 25 para 20°C (BP25-20-3).

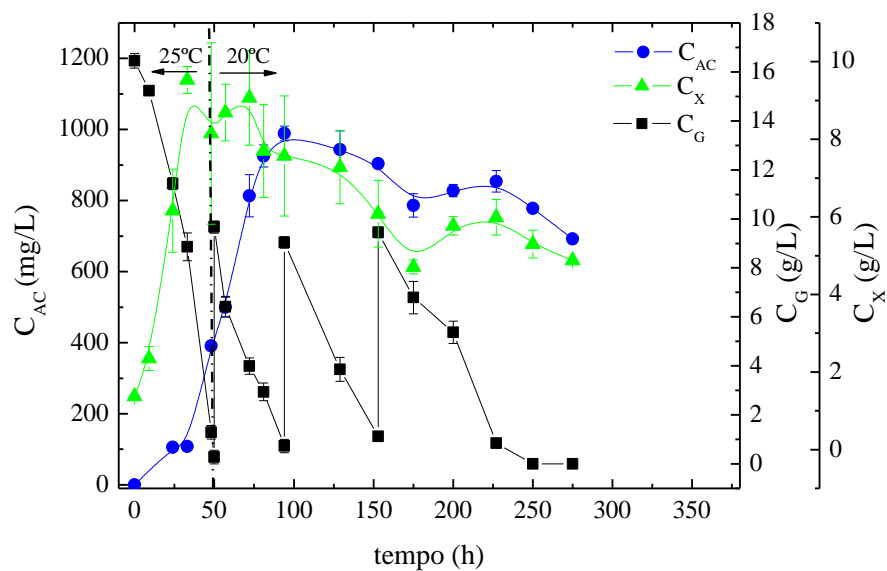
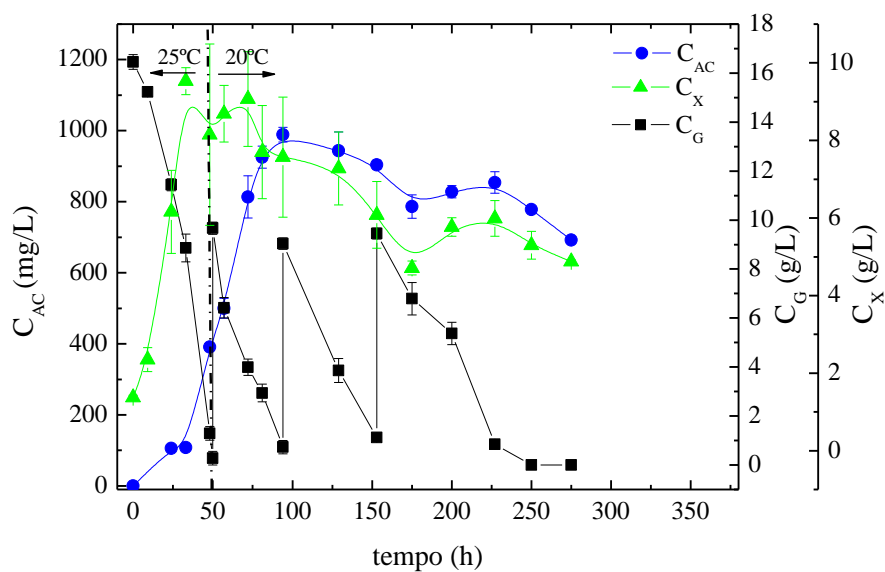


Figura 3.27 – Perfis de concentração de AC (C_{AC}), células (C_X) e glicerol (C_G) ao longo do tempo no cultivo em batelada com 4 pulsos de glicerol e com redução de temperatura de 25 para 20°C (BP25-20-4).



O efeito da temperatura na concentração de células (C_X) foi o mesmo observado nos demais ensaios já discutidos. A concentração celular atinge um valor máximo (aproximadamente 9,5 g/L) logo após a exaustão da concentração inicial de glicerol (fase de crescimento), seguida de um decréscimo contínuo ao longo do tempo após a redução de temperatura de 25 para 20°C. Nestas condições, as máximas concentrações de AC observadas foram próximas a 1 g/L e os melhores resultados de produção de AC foram obtidos no cultivo com 1 pulso (BP25-20-1). A **Figura 3.24** ilustra os resultados obtidos nesse ensaio. A produção máxima de AC foi de 1149,1 mg/L, o que representa 6,8 vezes a produção máxima obtida no cultivo controle.

3.4. Ensaio de degradação de AC

Com o objetivo de se determinar qual a melhor condição de temperatura que aliasse uma melhor produção com menor degradação de AC no caldo de cultivo, foi realizado um estudo da cinética de hidrólise desse antibiótico em diferentes temperaturas e em diferentes tempos ao longo do processo fermentativo.

Foram retiradas amostras nos cultivos em batelada com redução de temperatura ao final de cada um dos quatro pulsos em cada temperatura avaliada (BP30-20-4, BP30-25-4 e BP30-30-4) para posterior estudo de degradação. As amostras foram assepticamente centrifugadas e filtradas em membranas de 0,22 μm para serem utilizadas nos ensaios de hidrólise. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para fins comparativos, o ensaio utilizado como controle foi o realizado a 30°C, sendo os demais resultados comparados com os obtidos nesse.

As constantes de degradação de AC relativas ao modelo de degradação de pseudoprimeira ordem (k_{dAC} , h^{-1}) foram estimadas pelo ajuste do modelo não linear aos dados experimentais obtidos. Os ajustes obtidos para o cálculo das constantes de hidrólise (k_{dAC}) no sobrenadante dos caldos de cultivo podem ser visualizados nas **Figuras 3.28, 3.29 e 3.30** e **Tabelas 3.4, 3.5 e 3.6**, juntamente com os coeficientes de correlação referentes aos ajustes.

Figura 3.28 – Perfis da degradação de AC ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-30-4: 78 h ($r^2=0,990$), 96 h ($r^2=0,98$), 120 h ($r^2=0,96$) e 144 h ($r^2=0,990$).

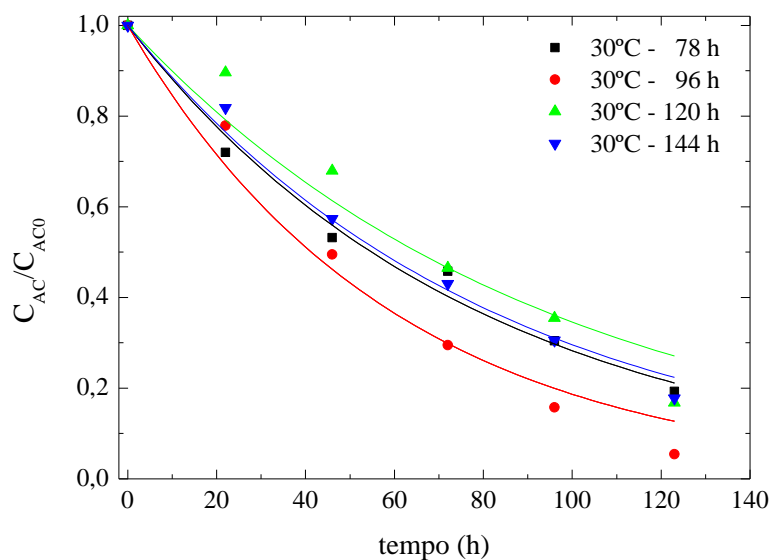


Tabela 3.4 – Constantes de degradação de AC (k_{dAC}) ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-30-4.

tempo (h)	k_{dAC} (h^{-1})	r^2
78	$0,01264 \pm 0,00059$	0,990
96	$0,01678 \pm 0,00133$	0,98
120	$0,01062 \pm 0,00107$	0,96
144	$0,01218 \pm 0,00054$	0,990

Figura 3.29 – Perfis da degradação de AC ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-25-4: 72 h ($r^2=0,94$), 96 h ($r^2=0,92$), 129 h ($r^2=0,90$) e 177 h ($r^2=0,81$)

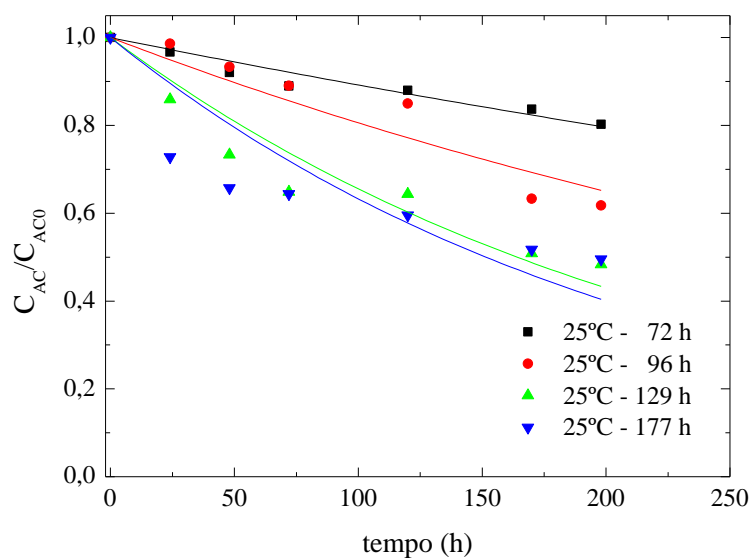


Tabela 3.5 – Constantes de degradação do AC (k_{dAC}) ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-25-4.

tempo (h)	k_{dAC} (h^{-1})	r^2
72	$0,00114 \pm 0,00007$	0,94
96	$0,00216 \pm 0,00023$	0,92
129	$0,00422 \pm 0,00038$	0,90
177	$0,00458 \pm 0,00071$	0,81

Figura 3.30 – Perfis da degradação de AC ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-20-4: 81 h ($r^2=0,86$), 129 h ($r^2=0,92$), 168 h ($r^2=0,83$) e 216 h ($r^2=0,91$).

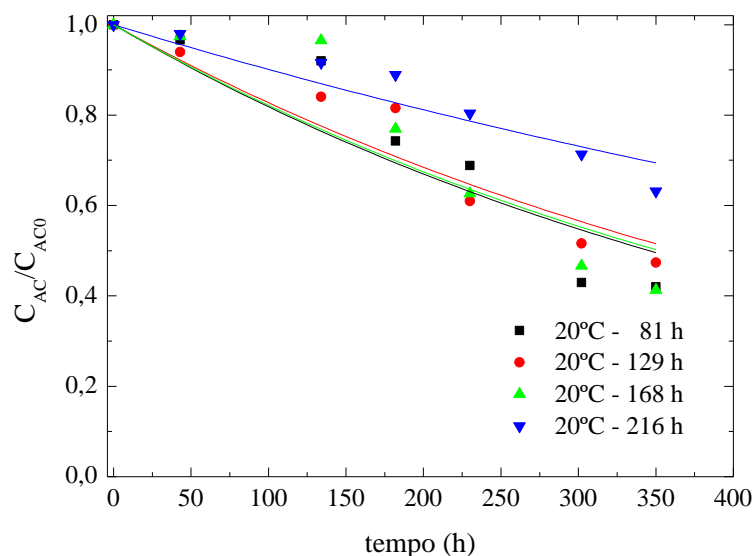


Tabela 3.6 – Constantes de degradação de AC (k_{dAC}) ao final de cada pulso de glicerol no cultivo BP30-20-4.

tempo (h)	k_{dAC} (h^{-1})	r^2
81	0,00200±0,00028	0,86
129	0,00189±0,00018	0,92
168	0,00197±0,00031	0,83
216	0,00104±0,00010	0,91

Observa-se que a constante de degradação de AC (k_{dAC}) no caldo de fermentação aumenta com o aumento de temperatura como já retratado em outros trabalhos (ROUBOS et al., 2002; BERSANETTI et al., 2004; MARQUES et al., 2009), confirmando que a molécula de AC assim como outros compostos beta-lactâmicos é altamente instável em temperaturas mais elevadas.

Para fins comparativos, pode-se representar a degradação em cada um dos cultivos por uma constante de degradação global de AC (k_{dAC} global) como a média das constantes de degradação obtidas ao longo dos cultivos nas diferentes temperaturas, uma vez que os valores não tiveram uma variação muito grande. A **Tabela 3.7** apresenta os valores de k_{dAC} globais juntamente com os desvios-padrão.

Tabela 3.7 - Constantes globais de degradação de AC (k_{dAC} globais) obtidas nos caldos de cultivo em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	k_{dAC} global (h^{-1})
30	0,01306±0,00263
25	0,00303±0,00016
20	0,00173±0,00046

Bersanetti et al. (2004) investigaram o efeito da temperatura entre 10 e 40°C sob condições controladas de pH de 6,2 e 7,0, na degradação de AC em caldos de fermentação utilizando um meio de cultura similar ao utilizado neste estudo. Os autores observaram que a hidrólise de AC é maior quanto maior a temperatura para ambas as condições de pH estudadas e que a molécula de AC é mais estável em pH em torno de 6,2. As constantes cinéticas de hidrólise (k_{dAC}) obtidas por Bersanetti et al. (2004) para as temperaturas de 20, 25 e 30°C em pH 6,2 foram 0,0218, 0,0256 e 0,0294 h^{-1} , respectivamente. A 30°C, a constante de degradação de AC foi 2,2 vezes superior à obtida neste estudo.

No trabalho de Bersanetti et al. (2004), todos os caldos de cultivo utilizados para o estudo de degradação de AC em diferentes temperaturas foram obtidos de cultivos realizadas a 28°C, enquanto que neste estudo os caldos utilizados foram provenientes de cultivos obtidos nas mesmas condições de temperaturas que os ensaios de degradação foram realizados (20, 25 e 30°C). A temperatura do processo fermentativo influencia o metabolismo celular que gera diferentes concentrações dos produtos metabólicos extracelulares liberados para o de caldo de cultivo. Esta diferença pode justificar as maiores constantes de degradação obtidas por Bersanetti et al. (2005) para as demais temperaturas, 20 e 25°C, cerca de 12,7 e 8,5 vezes superiores aos valores obtidos neste estudo para as mesmas condições.

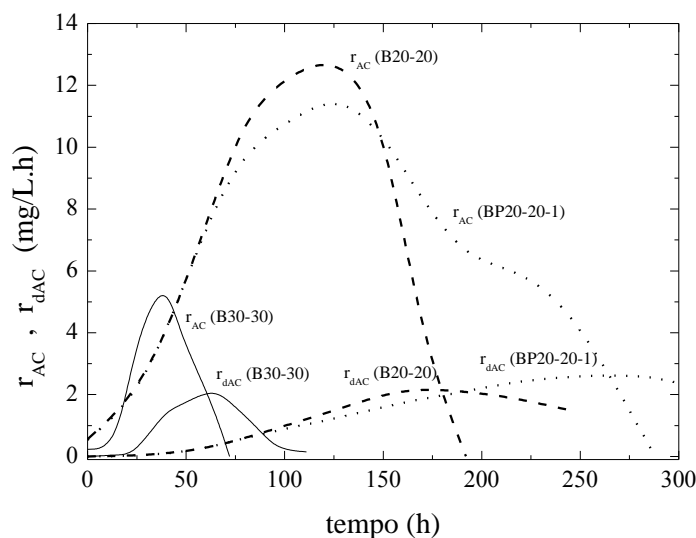
Em outro trabalho, Marques et al. (2009) investigaram o efeito da temperatura (24-40°C) na degradação de AC durante a fermentação de *S. clavuligerus* DAUPFE 3060 utilizando um meio de cultura complexo proposto por Maranesi et al. (2005). Nesse trabalho, os autores verificaram que a degradação de AC aumentou com o aumento de temperatura, no entanto os valores estimados das constantes cinéticas de hidrólise (k_{dAC}) de AC a 25 e 30°C foram iguais a 0,030 e 0,039 h^{-1} , cerca de 13 e 2,3 vezes superiores aos valores da constante de degradação global obtidos neste estudo para as mesmas condições de temperatura, o que aliado a outros fatores já comentados,

pode ser causado pela diferença na composição dos meios de cultura.

Neste estudo observou-se que a constante de degradação de AC no meio de fermentação a 30°C foi 4,3 vezes superior que a mesma observada a 25°C e aproximadamente 7,5 vezes superior que a obtida a 20°C. A maior estabilidade de AC observada nas temperaturas de 20 e 25°C em relação à 30°C (controle) não se deve apenas ao efeito da baixa temperatura na minimização da degradação da molécula de AC, como também ao efeito dos componentes presentes no caldo de fermentação. Sabe-se que o metabolismo microbiano é mais lento em baixas temperaturas, o que leva ao menor acúmulo de enzimas e outros metabólitos que interferem na estabilidade da molécula de AC, como o íon amônio resultante do metabolismo de proteínas e que, de acordo com Roubos et al. (2002), aumenta consideravelmente a velocidade de degradação de AC. Embora a constante global de degradação de AC a 25°C tenha sido 1,8 vezes superior que a obtida à 20°C, observando os desvios-padrão conclui-se que esses valores são estatisticamente iguais, o que sugere que nesta faixa de temperatura a hidrólise de AC não é tão pronunciada. Possivelmente, nas condições de baixa temperatura e baixas concentrações de componentes tóxicos, condições que aliadas levam à maior estabilidade de AC na faixa de temperatura de 20 a 25°C em relação ao controle.

De posse dos valores médios de (k_{dAC}), foi possível ainda obter os perfis das velocidades de degradação (r_{dAC}) e das velocidades líquidas médias de geração de AC (r_{AC}) (**Equações 3.6 e 3.7**) durante o decorrer dos cultivos e avaliar os efeitos individuais de temperatura em r_{dAC} e r_{AC} . Este procedimento foi aplicado para o cultivo controle (B30-30) e para os cultivos com melhores resultados em termos de produção de AC (B20-20 e B20-20-1) (**Figura 3.31**).

Figura 3.31 - Perfis de velocidades de produção de AC (r_{AC}) e de degradação (r_{dAC}) durante os cultivos B30-30, B20-20 e BP20-20-1.



As máximas velocidades de degradação AC (r_{dACmax}) foram semelhantes para todos os cultivos. Nos cultivos em baixa temperatura (20°C), as maiores concentrações acumuladas de AC compensaram os menores valores de k_{dAC} no cálculo de r_{dAC} e o contrário foi observado no cultivo B30-30, resultando nos perfis semelhantes de r_{dAC} para os cultivos a 20 e 30°C. No entanto, as relações obtidas entre as velocidades máximas de degradação e de produção de AC (r_{dACmax}/r_{PACmax}) foram muito mais baixas, cerca de 0,2 para os cultivos realizados 20°C, em comparação com o valor de 0,38 obtido para o cultivo controle. Comparando os resultados dos cultivos B20-20 e BP20-20-1, observou-se que houve uma diminuição na r_{AC} após o pulso de glicerol no cultivo BP20-20-1 (às 125 horas). No entanto, os valores de r_{AC} ainda permaneceram elevados em relação aos de r_{dAC} durante as subseqüentes 100 h de cultivo, resultando no elevado acúmulo de AC no caldo.

3.5. Conclusões

A produção de AC por *S. clavuligerus* em cultivos em mesa incubadora rotativa foi aumentada através da manipulação da temperatura de operação. A produção líquida máxima de AC foi obtida para o cultivo BP20-20-1, de 34,3 mg/L, com uma produtividade de 5,3 mg/L/h. Tal resultado pode ser atribuído ao lento consumo da fonte de carbono e redução da velocidade de degradação de AC a 20°C.

A comparação entre as velocidades de produção de AC (r_{AC}) e degradação (r_{dAC}) mostrou que a baixa temperatura teve maior influência sobre a produção de AC em relação à de redução da degradação do AC, contribuindo para um grande acúmulo de produto.

Os resultados demonstraram que *S. clavuligerus* pode crescer bem a baixa temperatura, com uma duração prolongada da viabilidade celular e que a degradação de AC é reduzida em menores temperaturas.

O efeito benéfico da menor temperatura em cultivos para a produção de AC por *S. clavuligerus* pode ser particularmente atraente para aplicações industriais, uma vez que temperatura é uma variável de fácil manipulação e controle.

Capítulo 4

**CULTIVOS DE *Streptomyces clavuligerus*
EM ALTA CONCENTRAÇÃO DE
GLICEROL PARA PRODUÇÃO DE
ÁCIDO CLAVULÂNICO**

RESUMO

O ácido clavulânico (AC) é um composto beta-lactâmico que possui atividade inibidora contra enzimas beta-lactamases. A influência da concentração de glicerol (15, 30 e 60 g/L) e da temperatura de operação (20 e 25°C) na produção de AC utilizando uma linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* (ATCC 27064) foi investigada em ensaios em mesa incubadora rotativa. A maior concentração de AC (1543 mg/L) e maior produtividade (7,41 mg/L/h) foram obtidas a 20°C para concentração de glicerol de 30 g/L em 208 h de cultivo. Acima destas concentrações a produção de AC no caldo foi significativamente afetada pela fonte de carbono.

4.1. Introdução

Desde 1930, com o advento da introdução da penicilina na ciência médica para o tratamento de doenças infecciosas, vem se observando um crescente aumento da resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos. O tratamento contra as bactérias resistentes é hoje mais difícil do que no passado. A descoberta e aplicação do ácido clavulânico foram importantes para diminuir a resistência a estes antibióticos. Por isso, esse composto tem sido aplicado com sucesso na área clínica (BAGGALEY et al., 1997). O AC é um potente inibidor da classe de enzimas “serina” beta-lactamases, responsáveis pela resistência bacteriana à classe de antibióticos beta-lactâmicos, e é utilizado como sal de potássio em associação com amoxicilina, prescrito como co-amoxiclav (Augmentin®) ou como ticarcilina (Timentin®).

O AC é tradicionalmente produzido por via fermentativa do micro-organismo *Streptomyces clavuligerus*. Muitos estudos têm focado a manipulação de meios de cultura e controle de alimentação em operações de processo contínuo ou batelada alimentada para a melhoria dos rendimentos de produção do AC (MAYER e DECKWER, 1996; CHEN et al., 2002; 2003; NETO et al., 2005; TEODORO et al., 2006; 2010). Em sua maioria, os meios de cultura empregados para produção de AC contém glicerol como fonte de carbono e energia. No entanto, Chen et al. (2002) observaram que concentrações de glicerol maiores que 20 g/L em fermentações conduzidas a 28°C geram um menor acúmulo de AC no caldo de cultivo, devido aos efeitos de repressão e inibição causados pelo excesso de fonte de carbono. Mayer e Deckwer (1996) avaliaram o efeito de diferentes velocidades de alimentação de glicerol, como fonte de carbono em cultivos utilizando a linhagem mutante de *S. clavuligerus* DSM 738. Neste trabalho, os autores mantiveram o controle de alimentação da fonte de

carbono de modo a obter uma concentração de glicerol de 1 a 4 g/L no caldo resultando em concentrações de AC de 400-500 mg/L em 90 h de cultivo.

Em trabalho anterior, Costa e Badino (2012) concluíram que as maiores velocidades de produção de AC (r_p) foram alcançadas em fermentações conduzidas em temperaturas mais baixas. Esse resultado foi atribuído principalmente à redução dos efeitos de repressão e inibição pela fonte de carbono que foram controlados por uma lenta velocidade de assimilação pelas células atribuída a baixa temperatura. Diante disso, procurou-se avaliar também os efeitos da alta concentração de glicerol na produção de AC em cultivos a baixa temperatura, esperando constatar que fermentações conduzidas a baixa temperatura e altas concentrações de glicerol não causasse efeitos negativos na biossíntese de AC uma vez que, em baixa temperatura, os efeitos negativos dos catabólitos gerados do metabolismo do glicerol são reduzidos. Além disso, a maior disponibilidade de fonte de carbono poderia prolongar a viabilidade das células. A hipótese elaborada foi que o efeito desses fatores aliados poderia refletir numa maior produção de AC.

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos em cultivos em batelada com alta concentração de glicerol e baixa temperatura e os resultados comparados com os de cultivo em batelada à 30°C (ensaio controle).

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, conservado na forma de células vegetativas a -70°C e suspensas em solução crioprotetora contendo 10% v/v de glicerol.

4.2.2. Meios de cultura

Meio de cultura de reativação

Em todos os ensaios foi utilizado o meio de cultura de reativação proposto por Rosa et al. (2005), descrito na **Tabela 4.1**. O pH foi ajustado em 6,8 e o meio de cultura esterilizado a 121°C e 1 atm por 15 minutos.

Tabela 4.1 - Meio de cultura de Rosa et al. (2005)

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	21
Peptona bacteriológica	10
Extrato de levedura	1
Extrato de malte	10
Tampão MOPS	21
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75
Solução de sais*	(1mL/L)

* Composição (g/L de água destilada): MnCl₂.4H₂O, 1,0; FeSO₄.7H₂O, 1,0; ZnSO₄.7H₂O, 1,0; água destilada.

Meios de cultura de crescimento e produção

Os meios de cultura de inóculo e de produção tiveram a mesma composição e foram baseados no meio proposto por Teodoro et al. (2006), (**Tabela 4.2**).

Tabela 4.2 - Meio de cultura de Teodoro et al. (2006) modificado.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	15 / 30 / 60
Proteína isolada de soja	25
Tampão MOPS	21
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75
Solução de sais*	(1mL/L)

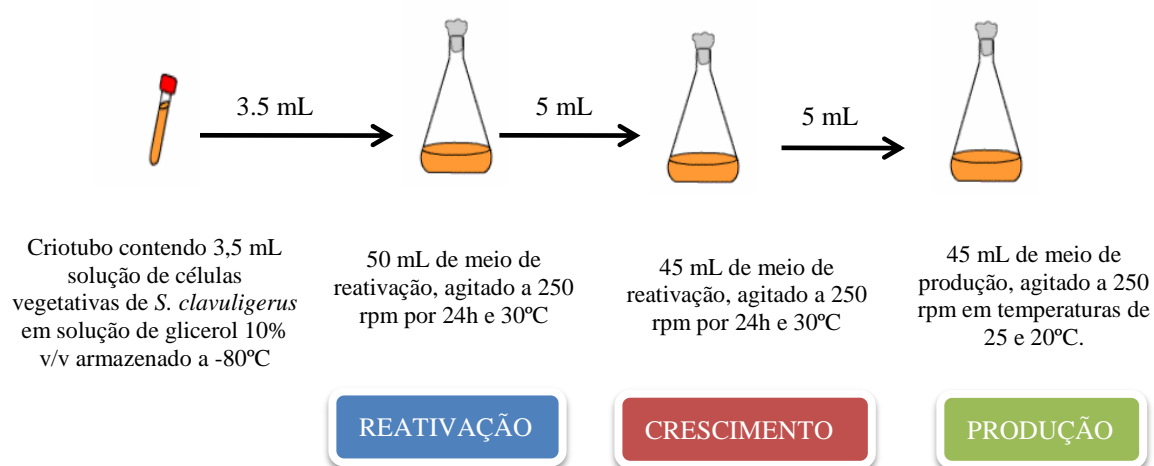
Como já mencionado no capítulo anterior, o meio de cultura original proposto por Teodoro et al. (2006) contém óleo de soja (1g/L) na sua composição. Neste estudo, o óleo de soja foi retirado da constituição do meio de cultura de produção e inóculo para garantir que os resultados em termos de produção de AC fossem exclusivamente em função do consumo de glicerol como única fonte de carbono.

4.2.3. Procedimento experimental

O procedimento para execução dos cultivos em mesa incubadora rotativa foi descrito por Rosa et al. (2005) e consiste de três etapas: reativação do micro-organismo, crescimento e produção, sendo que os meios de cultura estão representados nas **Tabelas 4.1 e 4.2.**

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 incubados por 24 h a 30°C e 250 rpm (etapa de reativação) em mesa incubadora rotativa, modelo G25 (New Brunswick Scientific Co.). Em seguida, 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 de produção. Estes foram incubados por 24 h a 30°C e 250 rpm (etapa de crescimento). Esta etapa foi repetida para dar início da fase de produção, exceto que os cultivos foram incubados em diferentes temperaturas para avaliação dos resultados (25 e 20°C) (**Figura 4.1**).

Figura 4.1 - Procedimento experimental para cultivos de *S. clavuligerus* em mesa incubadora rotativa.



Ensaios:

B25: T=25°C – C_{G,0}=15 g/L

B20: T=20°C - C_{G,0}=15 g/L

B25(30): T=25°C - C_{G,0}=30 g/L

B20(30): T=20°C - C_{G,0}=30 g/L

B20(45): T=20°C - C_{G,0}=60 g/L

Os cultivos em batelada foram realizados em triplicata.

4.2.4. Metodologia Analítica

Análise da concentração de glicerol

A concentração de glicerol foi determinada por método enzimático utilizando um kit para triacilglicerídeos (Triglycerides GPO-PAP, Liquid Stable Monoreagent, Laborlab, Brasil). A curva de calibração foi obtida com solução de glicerol diluída em água em concentrações crescentes até 1 g/L.

Análise da concentração de AC

A concentração de AC foi analisada pelo método espectrofotométrico proposto por Bird et al. (1982) que mede a absorvância do produto da reação de derivatização do AC com imidazol em comprimento de onda de 311 nm. A curva de calibração foi obtida com solução de Clavulin® na forma de clavulanato de potássio diluído em água em várias concentrações crescentes até 50 mg/L.

Análise da concentração celular

O método proposto por Mayer e Deckwer foi usado para determinar a concentração de células na presença de partículas sólidas. A concentração de células em massa seca em cultivos empregando meio solúvel foi medida e correlacionada com a densidade óptica a 600 nm (DO_{600}), o que gerou um modelo linear que descreve a relação entre concentração de células em termos de massa seca e DO_{600} . Nas culturas com meio contendo partículas insolúveis (isolado de proteína de soja, IPS), o caldo foi decantado durante 45 s (o tempo necessário para precipitar o IPS) e a DO_{600} foi medida. O valor de concentração celular foi obtido a partir da equação de regressão linear descrita acima.

Análise da concentração de íons NH_4^+

A concentração do íon NH_4^+ foi medida pelo método do fenato (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater; 21ª ed. 2005, 4500 F. 4-114), que se fundamenta na reação do íon NH_4^+ com o fenol produzindo um composto azul conhecido como azul de iodiofenol. A cor resultante é lida em espectrofotômetro em

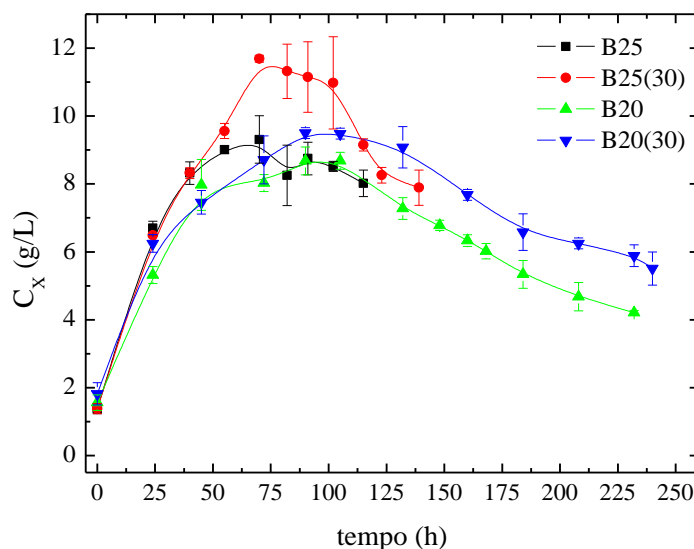
comprimento de onda de 630 nm. A curva de calibração foi obtida com solução de acetato de NH_4^+ diluído em água em concentrações crescentes até 1 mg/L.

4.3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos permitiram avaliar alguns aspectos do efeito do aumento da concentração de glicerol na produção de AC em cultivos conduzidos a baixa temperatura. Foram realizados ensaios em mesa incubadora rotativa utilizando 15 ou 30 g/L de glicerol, a fim de verificar se a concentração de glicerol realmente inibiria a produção de AC mesmo em baixas temperaturas, como observado em outros estudos conduzidos em temperaturas mais altas. O pH e as concentrações celulares, de glicerol, de íons NH_4^+ e de AC foram medidos periodicamente ao longo do cultivo.

Na **Figura 4.3** são apresentadas as curvas de crescimento de *S. clavuligerus* nas temperaturas de 25 e 20°C para os cultivos realizados com concentrações de glicerol de 15 (B20; B25) e 30 g/L (B25(30); B20(30)).

Figura 4.3 – Curvas de crescimento de *S. clavuligerus* durante os cultivos B25; B25(30); B20 e B20(30).

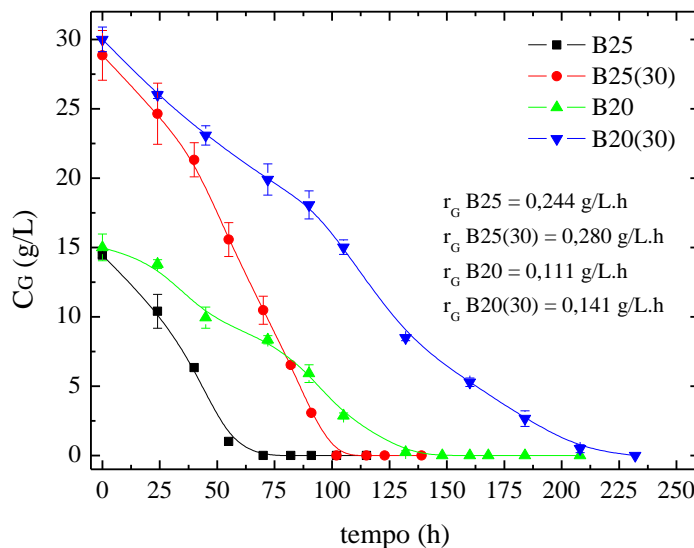


Como esperado, o crescimento celular foi mais lento a 20°C em comparação a 25°C após as 25 h de cultivo e a máxima concentração celular ($C_{x_{max}}$) em fermentações contendo 15 g/L de glicerol foi obtida no ensaio conduzido a 25°C (9,01 g/L em 65 h), enquanto que a 20°C este valor atingiu 8,68 g/L em 90 h de cultivo. No entanto, o

aumento da concentração de glicerol prolongou o crescimento celular e aumentou a concentração celular final máxima ($C_{x_{max}}$). A partir das 72 h de cultivo, a concentração celular foi maior para o cultivo B20(30) em relação ao cultivo B20, atingindo valores de 9,5 g/L em 90 h, o que parece razoável uma vez que o excesso de fonte de carbono é utilizado para crescimento celular.

Como pode ser observado na **Figura 4.4**, a velocidade de consumo de glicerol (r_G) dos cultivos com maior concentração de glicerol a uma mesma temperatura (B25(30) e B20(30)) foi maior que a obtida para o cultivo com menor concentração de glicerol (B25 e B20) (**Tabela 4.3**). Isso se deve ao maior crescimento celular observado para os ensaios com maior concentração de glicerol. No entanto, para os cultivos a 20°C esse parâmetro foi quase a metade do observado a 25°C, o que proporcionou uma lenta assimilação da fonte de carbono pelas células reduzindo os efeitos negativos da fonte de carbono.

Figura 4.4 – Perfil do consumo de glicerol ao longo do tempo durante os cultivos B25; B25(30); B20 e B20(30).



As variações de pH e de concentração de íons NH_4^+ nos cultivos podem ser visualizadas nas **Figuras 4.5 e 4.6**.

Figura 4.5 – Variação de pH ao longo do tempo durante os cultivos B25; B25(30); B20 e B20(30).

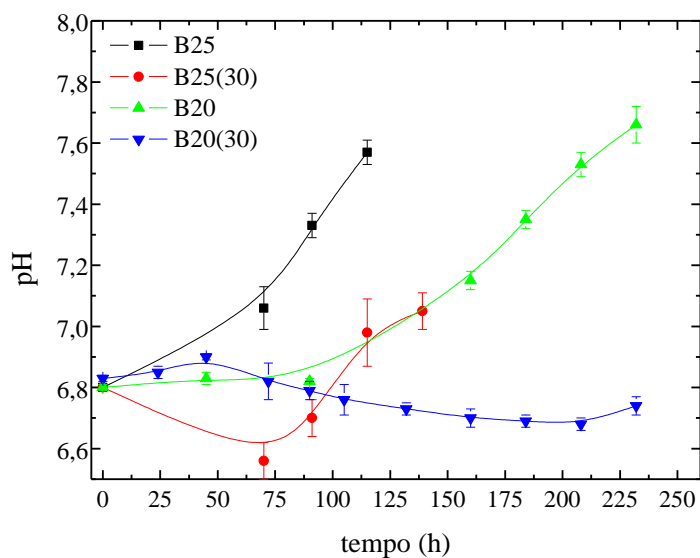
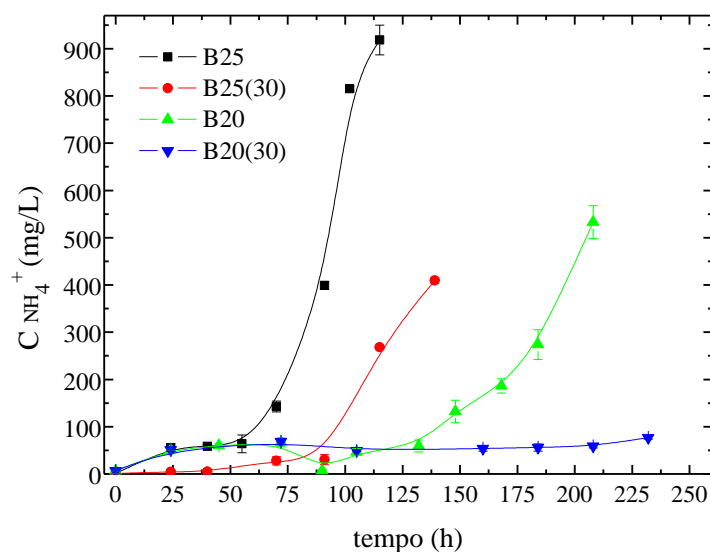


Figura 4.6 – Variação de NH_4^+ ao longo do tempo durante os cultivos B25; B25(30); B20 e B20(30).

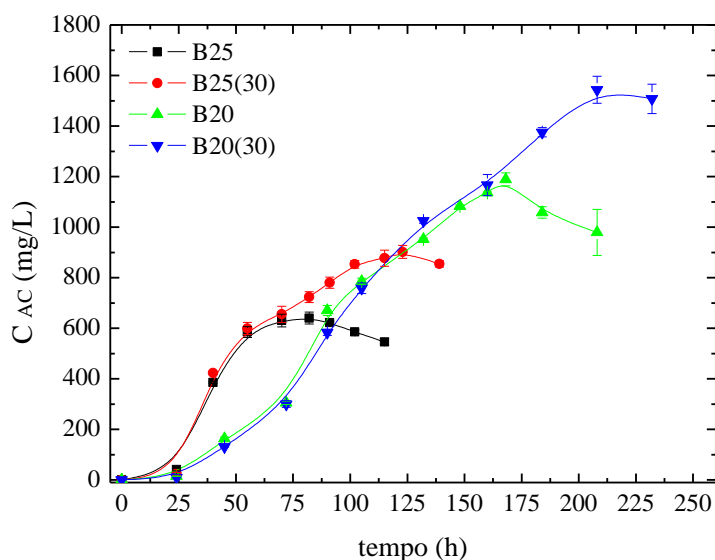


Nos cultivos com maior concentração de glicerol, o pH se manteve estável por mais tempo. O excesso de fonte de C também reduziu o acúmulo íons NH_4^+ no caldo de cultivo, uma vez que reduz a necessidade de metabolizar proteína como fonte de carbono. Enquanto o glicerol está presente no meio, a proteína é metabolizada em baixos níveis, se dispondo apenas como fonte de N para o crescimento e manutenção celular. Quando o glicerol acaba, as células passam a utilizar a proteína para essas

necessidades. O metabolismo de aminoácidos gera NH_3 que, em meio aquoso, pode ser encontrado na forma de íons NH_4^+ , que se acumula no caldo e contribui para a degradação da molécula de AC de acordo com ROUBOS et al. (2002).

O efeito das concentrações de glicerol de 15 e 30 g/L na produção de AC pode ser observado na **Figura 4.7**.

Figura 4.7 – Perfil da concentração de AC ao longo do tempo durante os cultivos B25; B25(30); B20 e B20(30).



Observa-se que nas duas temperaturas testadas a concentração de AC aumentou com o aumento da suplementação de glicerol em meio de cultivo. Este efeito provavelmente está associado ao aumento de biomassa e da viabilidade celular nesses cultivos. Além disso, o aumento de pH e o excesso de íons NH_4^+ nos cultivos em baixa concentração de glicerol podem ter acelerado a degradação da molécula de AC, contribuindo para o menor acúmulo no caldo.

Considerando uma mesma temperatura, a concentração de glicerol em meio de cultivo aumentou C_{ACmax} e a produtividade em AC no processo. A maior C_{ACmax} de 1543 mg/L foi observada em 208 h de cultivo no ensaio B20(30), que gerou também a maior produtividade observada, 7,41 mg/L.h (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.3 – Parâmetros de fermentação dos cultivos B25; B25(30); B20 e B20(30).

	B25	B25(30)	B20	B20(30)	B30 (15)
C_{ACmax} (mg/L)	615	902	1189	1543	169
P_{ACmax} (mg/L/h)	6,80	7,33	7,10	7,41	2,7
r_G (g/L/h)	0,244	0,280	0,111	0,141	0,268
$Y_{AC/G}$ (mg/g)	77,5	77,2	166,0	201,0	11,6
$Y_{X/G}$ (g/g)	0,62	0,41	0,47	0,25	0,55
$Y_{AC/X}$ (mg/g)	68,7	77,1	132,0	162,4	11,6

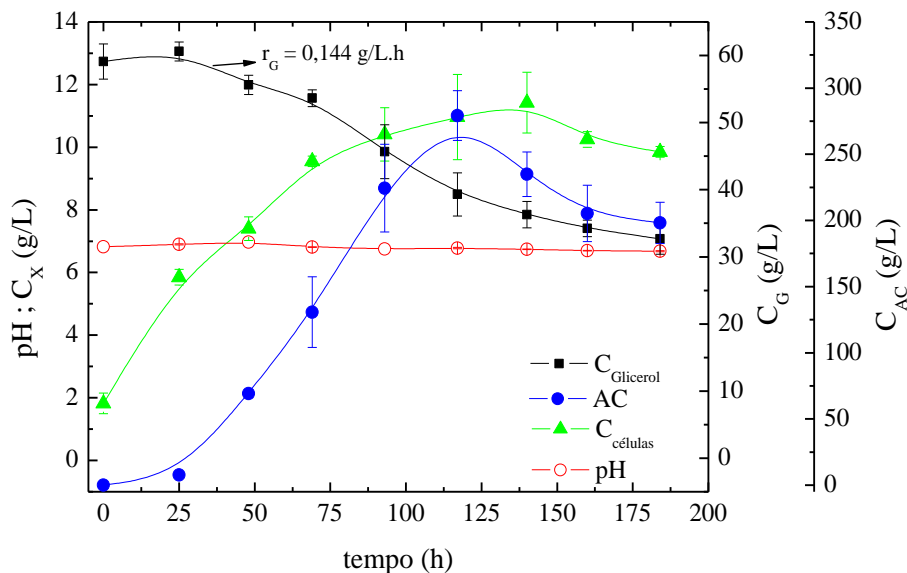
A massa de glicerol convertida em produto ($Y_{AC/G}$) se manteve semelhante nos cultivos B25 e B25(30), no entanto a massa de glicerol convertida em células ($Y_{X/G}$) foi menor no cultivo B25(30), indicando que o excesso de fonte de carbono foi utilizado para outras reações do metabolismo celular.

De um modo geral, as produtividades do processo e os coeficientes de rendimento $Y_{AC/G}$, $Y_{X/G}$ e $Y_{AC/X}$ foram melhorados com a redução da temperatura em relação às fermentações conduzidas a 30°C, como observado no trabalho de Costa e Badino (2012), bem como com o aumento da concentração de glicerol.

O objetivo deste trabalho foi conhecer o efeito da velocidade de consumo de glicerol (r_G) presente em altas concentrações na produção de AC. Verificou-se que, para a temperatura de 25°C, os valores de r_G permaneceram semelhantes ao do cultivo a 30°C, indicando que neste caso, o maior acúmulo de AC observado a 25°C deve ser atribuído à redução da degradação da molécula durante o cultivo. A menor degradação deve estar relacionada à redução da temperatura, além do controle de pH e da menor concentração de íons NH_4^+ que aceleram sua hidrólise. Para a temperatura de 20°, os valores de r_G foram significativamente menores para ambas as condições testadas, rendendo um maior acúmulo de AC no caldo de cultivo. Isso confirma hipótese elaborada de que, além dos efeitos citados, a velocidade de consumo de glicerol está associada aos efeitos de inibição e repressão causados pela rápida metabolização do glicerol pelas células e que nestas condições, a presença da fonte de carbono em maior concentração (30 g/L) ainda não reprimiu ou inibiu a síntese de AC.

Com base nos resultados obtidos anteriormente foi realizado cultivo a 20°C contendo 60 g/L de glicerol (B20(60)). Os resultados podem ser visualizados na **Figura 4.8**.

Figura 4.8 – Perfil de pH e de concentrações de AC, glicerol e células ao longo do tempo durante o cultivo B20(60).



Neste cultivo, o pH se manteve estável e o crescimento celular apresentou o mesmo perfil das demais fermentações, atingindo concentração máxima de 11,42 g/L. O valor de r_G (0,143 mg/L.h) se manteve próximo ao do obtido para o cultivo B20(30) (0,141 g/L.h), no entanto a produção de AC foi significativamente afetada pelo excesso de glicerol. A máxima concentração de AC atingiu valores de 279 mg/L às 117 h de cultivo seguida de uma rápida queda no caldo, provando que nestas condições o glicerol afeta negativamente a biossíntese de AC. Pode-se dizer que o binômio concentração de glicerol e temperatura varia para cada condição testada. Chen et al. (2002) observaram que em concentrações superiores a 20 g/L o glicerol atuou como repressor da síntese de AC em cultivos a 28°C. Este trabalho mostrou que deve-se considerar a temperatura de operação do processo de produção de AC e a velocidade de consumo da fonte de carbono para apontar a concentração de glicerol que atua como limitante. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para esclarecer os efeitos da concentração de glicerol sob o metabolismo de síntese de AC e sob a fisiologia celular.

4.4. Conclusões

A produção de AC em mesa incubadora rotativa foi potencializada com o aumento da concentração de glicerol no meio de cultivo até 30 g/L. A maior produção de AC, de 1543 mg/L, foi obtida para o cultivo B20(30), com produtividade de 7,4 mg/L/h. Os resultados confirmaram que o glicerol é um repressor da síntese de AC, no entanto a concentração limitante desta variável depende das condições de temperatura do cultivo e da composição do meio utilizado.

É importante lembrar que os maiores valores de concentração máxima de AC (C_{ACmax}) obtidas nos ensaios em batelada e batelada com pulsos de glicerol em diferentes temperaturas se limitaram a valores próximos a 1500 mg/L (TEODORO et al., 2010; COSTA e BADINO, 2012). Isso pode ser um indicativo de que nesses níveis de concentração, o AC cause danos celulares ou atue como inibidor da sua própria biossíntese, limitando uma maior produção de AC e justificando a necessidade da avaliação de fermentação extrativa proposta nesta tese.

Capítulo 5

**EFEITOS DO ÍON AMÔNIO e DO pH
NA DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO
EM SOLUÇÃO AQUOSA E EM CALDO DE
CULTIVO**

RESUMO

O Ácido clavulânico (AC) é um importante inibidor de beta-lactamases produzido por via fermentativa. Durante o bioprocesso de produção, muitos fatores influenciam No acúmulo do AC no caldo de cultivo. O efeito do pH (6,5 e 7,5) e da concentração de íons amônio (0; 300; 500; 700 e 1000 mg/L) na degradação de AC foi investigado em soluções aquosas de AC preparadas com medicamento comercial (Clavulin®). A degradação de AC a 25°C em caldos de cultivos com diferentes tempos de fermentação foi relacionada com os efeitos do pH e da concentração de íons amônio resultantes da metabolização de derivados proteicos pelas células. Os maiores valores de constantes de degradação ($0,0098 \text{ h}^{-1}$) foram obtidos para pH=7,5 e concentração de íons amônio de 1000 mg/L.

5.1. Introdução

Ácido clavulânico (AC) é um importante inibidor de beta-lactamases e é produzido por via fermentativa por indústrias farmacêuticas há vários anos. Por ser quimicamente instável, o mesmo se decompõe ainda na etapa de produção, comprometendo os rendimentos do processo. O conhecimento dos fatores que levam à degradação da molécula de AC é essencial para definir condições operacionais que amenizem a perda do produto durante o processo de produção deste antibiótico.

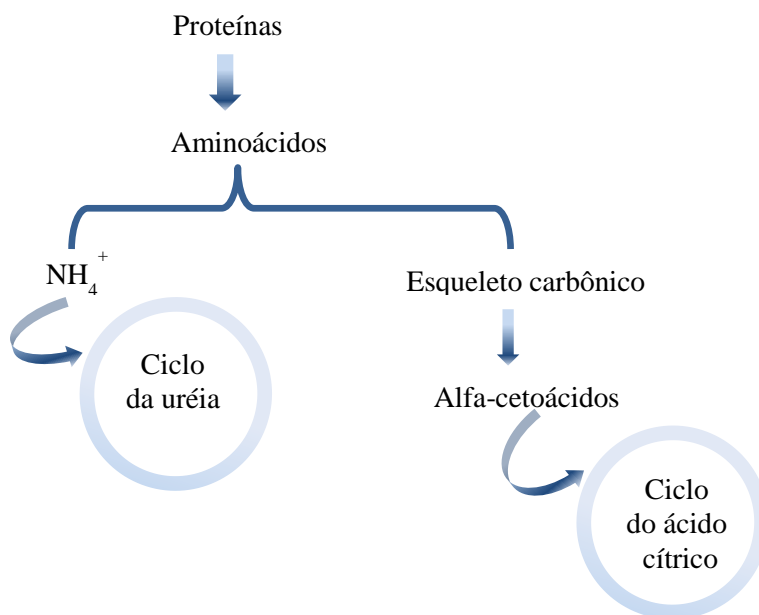
Ainda há pouca informação disponível na literatura científica a respeito da degradação do AC. A maioria dos estudos de cinética da degradação do AC estão focados com particular interesse para os efeitos da temperatura e pH em ensaios em solução aquosa de AC (HAGINAKA et al., 1981 ; MAYER E DECKWER, 1996). BERSANETTI et al. (2005) exploraram a degradação do AC em caldos de cultivo e observaram que a hidrólise de AC em caldo de fermentação é muito maior que em solução aquosa do medicamento comercialmente obtido. Os autores também concluíram que a degradação de AC segue uma cinética de pseudo-primeira ordem. Marques et al. (2010) estudaram os efeitos da temperatura na degradação de AC em caldos de cultivo e obtiveram constantes de degradação de AC (k_{dP}) iguais a $0,028 \text{ h}^{-1}$ a 28°C e $0,036 \text{ h}^{-1}$ a 32°C.

Haginaka et al. (2001) sugeriram que a degradação de AC é altamente dependente do pH seguindo uma curva do tipo parabólica da degradação em função do pH, com um mínimo de pH igual a 6,4. Isto significa que o AC é altamente instável em meios ácidos e básicos. Além disso, a temperatura também tem um considerável efeito na degradação do AC. Bersanetti et al. (2004) investigaram a degradação do AC em diferentes temperaturas (10 a 40°C) e verificaram que a estabilidade do AC diminuiu com o aumento da temperatura. Roubos et al. (2002) verificaram que o AC também é

instável em meios de cultivo que contêm alta concentração de nitrogênio na forma de sais de amônio e aminoácido.

Em processos fermentativos, a amônia (NH_3) é um subproduto comum do metabolismo microbiano e é derivada do catabolismo dos aminoácidos livres resultantes da degradação das proteínas. Em meio aquoso, a amônia é hidrolisada formando íon amônio (NH_4^+) e íons hidroxila (OH^-). As reações que envolvem a formação de amônia se iniciam com o metabolismo de degradação dos aminoácidos, conhecidas como reações de transaminação. No citosol, os grupos amino da maioria dos aminoácidos são transferidos para o grupo aceptor, o alfa-cetoglutarato, para formar glutamato e um alfa-cetoácido. Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos (alfa-cetoácidos) são encaminhados para as reações do ciclo do ácido cítrico e o íon NH_4^+ é enviado para as reações do ciclo da ureia (**Figura 5.1**) (LEHNINGER, 2003).

Figura 5.1 – Esquema do catabolismo dos aminoácidos (Adaptado de Lehninger, 2003).



No capítulo 4 foi mostrado que após o esgotamento da fonte de carbono no meio de cultura, há um grande acúmulo de íon NH_4^+ no caldo de fermentação nos processos de produção de AC. No entanto, poucos relatos na literatura mostram o efeito de altas concentrações deste produto no acúmulo do AC. Por isso, faz-se necessário obter mais informações a respeito dos fatores que levam à degradação da molécula de AC durante o processo de produção a fim de se reduzir as causas de baixos rendimentos.

Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito de diferentes concentrações de íons NH_4^+ (0; 300; 500; 700 e 1000 mg/L) em duas condições de pH (6,5 e 7,5) na degradação da molécula AC.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Ensaio de degradação de AC em solução aquosa

Estudos de degradação de AC foram realizados a 25°C em cinco concentrações de íons NH_4^+ (0; 300; 500; 700 e 1000 mg/L) e dois valores de pH (6,5 e 7,5).

Foram preparadas soluções aquosas contendo 250 mg/L de AC a partir do medicamento Clavulin®. As soluções foram tamponadas com tampão MOPS na concentração de 10 g/L e o pH ajustado em 6,5 e 7,5, respectivamente. Os estudos de hidrólise de AC em solução aquosa foram conduzidos em Erlenmeyers de 100 mL contendo 25 mL de solução de AC. Uma massa de acetato de amônio, previamente autoclavada, foi adicionada à solução aquosa de AC de modo a se obter concentrações de íons NH_4^+ iguais a 0; 300; 500; 700 e 1000 mg/L. Os frascos foram incubados em mesa incubadora rotativa a 25°C e 200 rpm. A concentração de AC foi medida periodicamente a cada 20 h por um período total de 100 h. Os ensaios foram feitos em duplicata.

5.2.2. Ensaio de degradação de AC em caldos de cultivo

Caldos de cultivos em batelada a 25°C com concentração inicial de glicerol de 15 g/L (B25) foram utilizados para estimar as constantes de degradação de AC (k_{dP} em h^{-1}) de caldo de fermentação. Amostras de caldo de cultivo nos tempos de 32, 48, 82 e 122 h foram centrifugadas, esterilizadas em membranas de 0,22 μm e usadas nos ensaios de degradação de AC. A concentração de íons NH_4^+ no caldo de cultivo foram medidas pelo método do fenato.

Os estudos de hidrólise foram conduzidos em Erlenmeyers de 100 mL contendo 25 mL de sobrenadante de cultivo. Os frascos foram incubados em mesa incubadora rotativa a 25°C e 200 rpm. A concentração de AC foi medida periodicamente a cada 20 h por um período total de 170 h. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.2.3. Determinação da constante de degradação do AC (k_{dAC})

A constante de degradação de AC (k_{dAC}) foi obtida através de um modelo de pseudo-primeira ordem (**Equação 5.3**):

$$dC_{AC}/d_t = -k_{dAC} \cdot C_{AC} \quad \text{(Equação 5.1)}$$

$$\ln \frac{C_{AC0}}{C_{AC}} = k_{dAC} \cdot t \quad \text{(Equação 5.2)}$$

$$C_{AC} = C_{AC0} \cdot e^{-k_{dAC} \cdot t} \quad \text{(Equação 5.3)}$$

onde:

C_{AC0} : concentração inicial de AC no caldo de cultivo [mg/L];

C_{AC} : concentração de AC no caldo de cultivo no tempo 't' [mg/L];

k_{dP} : constante de degradação de AC [h^{-1}].

Os resultados experimentais obtidos de k_{dP} em solução aquosa e em caldo de fermentação foram comparados.

5.2.4. Metodologia Analítica

Análise da concentração de íons NH_4^+

A concentração do íon NH_4^+ foi medida pelo método colorimétrico do fenato (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater; 21^oed. 2005, 4500 F. 4-114). A formação da coloração se fundamenta na reação do íon NH_4^+ com o fenol produzindo um composto azul, conhecido como azul de indofenol. A absorbância da cor do produto resultante foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 630 nm. A curva de calibração foi obtida com solução de acetato de NH_4^+ diluído em água em concentrações crescentes até 1 mg/L.

Análise da concentração de AC

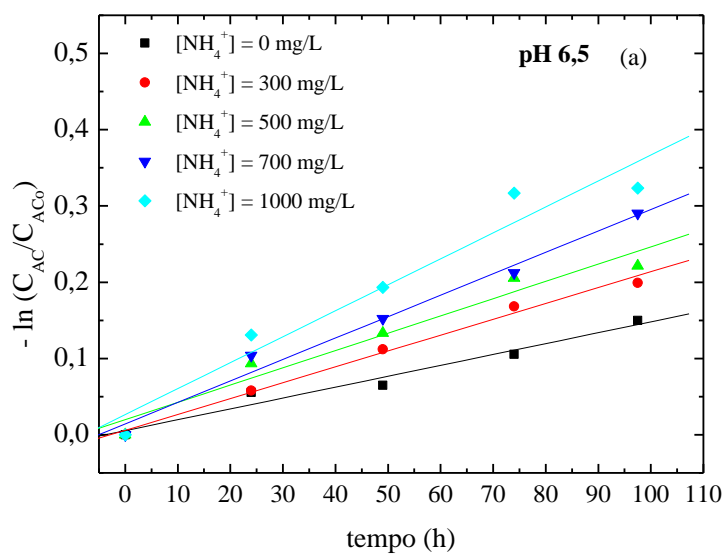
A concentração de AC foi analisada pelo método espectrofotométrico proposto por Bird et al. (1982) que mede a absorbância do produto da derivatização do AC com imidazol em comprimento de onda de 311 nm. A curva de calibração foi obtida com solução de Clavulin® na forma de clavulanato de potássio diluído em água em concentrações crescentes até 60 mg/L.

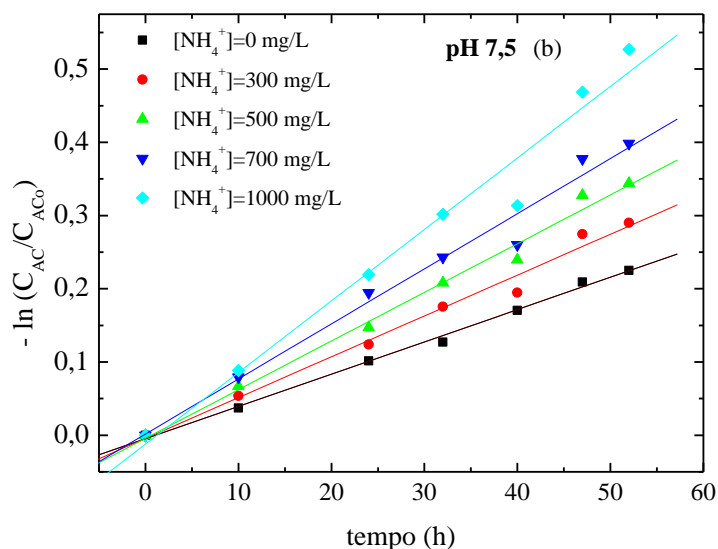
5.3. Resultados

5.3.1. Ensaio de degradação de AC em solução aquosa

As **Figuras 5.2a e 5.2b** ilustram os resultados de degradação de AC a 25°C obtido de solução aquosa de Clavulin® em concentrações de íons NH_4^+ iguais a 0; 300; 500; 700 e 1000 mg/L em valores de pH's 6,5 e 7,5. A degradação do AC devido ao efeito do pH foi considerada para a concentração de NH_4^+ igual a 0 (ensaio controles). As linhas representam o ajuste linear aos dados experimentais usados para calcular k_{dAC} .

Figura 5.2 – Gráfico de $\ln(C_{AC0}/C_{AC})$ em função do tempo para determinação da constante de degradação de AC (k_{dAC}) em solução aquosa com diferentes concentrações de NH_4^+ em: (a) pH 6,5 e (b) pH 7,5. As retas representam os ajustes do modelo linear aos dados experimentais.





A Tabela 5.1 apresenta os valores de constante de degradação de AC (k_{dAC}) em solução aquosa de Clavulin® em diferentes pHs e concentrações de NH_4^+ .

Tabela 5.1 – Constantes de degradação do AC (k_{dAC}) para solução aquosa em diferentes concentrações de NH_4^+ em solução aquosa de Clavulin®

		$[NH_4^+]$ (mg/L)				
pH 6,5		0	300	500	700	1000
k_{dAC} (h^{-1})		0,0015±0,0003	0,0021±0,0001	0,0024±0,0002	0,0031±0,0001	0,0036±0,0002
r^2		0,98	0,990	0,93	0,98	0,93
		$[NH_4^+]$ (mg/L)				
pH 7,5		0	300	500	700	1000
k_{dAC} (h^{-1})		0,0044±0,0001	0,0055±0,0001	0,0068±0,0001	0,0079±0,0001	0,0098±0,0001
r^2		0,99	0,99	0,99	0,98	0,97

Como esperado, considerando apenas o efeito do pH, observa-se que as constantes cinéticas de degradação de AC (k_{dAC}) aumentaram progressivamente, alcançando valores de $0,0015 h^{-1}$ em pH 6,5 e $0,0044 h^{-1}$ em pH 7,5, o que corresponde à diminuição na meia-vida de 667 h a 232 h. Bersanetti et al. (2005) estudaram a degradação de AC em solução aquosa e obtiveram valor de k_{dAC} a 25 °C e pH 6,2 de $0,0053 h^{-1}$, cerca de 2,86 vezes maior que o obtido neste estudo para pH 6,5. A causa desta variação pode ter sido o tampão utilizado para manutenção do pH da solução aquosa durante os experimentos. Bersanetti et al. (2005) utilizaram tampão fosfato (40 mM), enquanto neste estudo o tampão utilizado foi o MOPS na concentração de 10 g/L

(47 mM). Apesar das concentrações utilizadas serem próximas, não se tem conhecimento dos efeitos individuais dos componentes do sistema-tampão na degradação da molécula do AC, o que pode justificar a diferença entre os valores de k_{dP} encontrados no presente trabalho e no de Bersanetti et al. (2005) obtidos para condições próximas de pH e temperatura.

O valor de k_{dAC} também aumenta progressivamente com a concentração de íons NH_4^+ presente na solução aquosa, até um valor máximo de $0,0036\text{ h}^{-1}$ em pH 6,5 e $0,0098\text{ h}^{-1}$ em pH 7,5 na concentração de 1000 mg/L de NH_4^+ . Observou-se que para as duas condições de pH testadas, o efeito da concentração de íons NH_4^+ na degradação de AC foi significativa na faixa de concentração de 500 mg/L de NH_4^+ , chegando a representar um aumento de 60 e 54% da degradação em relação aos ensaios controle (sem adição de íons NH_4^+) em pHs 6,5 e 7,5, respectivamente. Na máxima concentração de íons NH_4^+ avaliada (1000 mg/L), os aumentos chegaram a 120 e 153% em pHs 6,5 e 7,5, respectivamente.

5.3.2. Ensaio de degradação de AC em caldos de cultivo

A degradação do AC foi também avaliada em caldos de cultivo correspondentes a diferentes tempos de cultivo em batelada a 25°C (B25). De posse dos valores para k_{dP} em diferentes concentrações de íons NH_4^+ e valores de pH para solução aquosa, foi possível compará-los com os resultados de degradação do AC em caldo de fermentação obtidos de cultivos em batelada a 25°C .

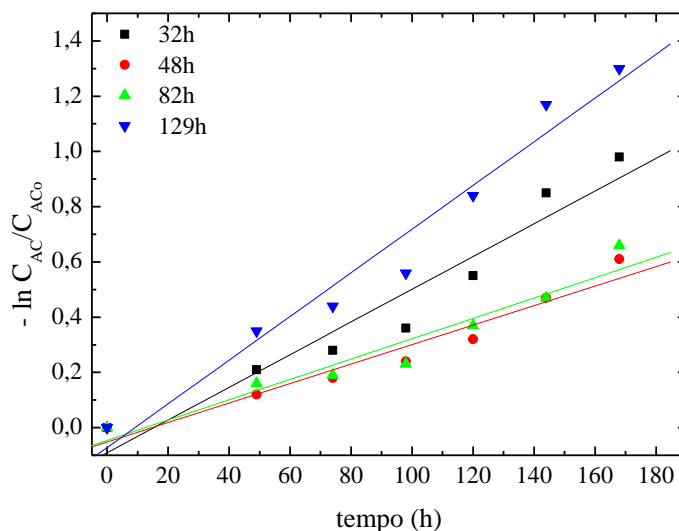
O pH, as concentrações iniciais de AC (C_{AC0}) e de íons NH_4^+ ($[NH_4^+]$) presentes nas amostras de caldos de cada tempo de cultivo avaliados, bem como as constantes de degradação de AC (k_{dAC}) obtidas pelo ajuste do modelo linear aos dados experimentais estão apresentadas na **Tabela 5.2 e 5.3**.

Tabela 5.2 – Condições experimentais das amostras de caldo do cultivo B25.

Tempo (h)	pH	$[NH_4^+]$ (mg/L)	C_{AC0} (mg/L)
32	6,84	60,0	63,2
48	6,74	89,0	204,1
82	6,94	324,0	459,1
122	7,33	918,1	446,0

A **Figuras 5. 3** ilustra os resultados de degradação de AC a 25°C obtidos em caldo de cultivo de diferentes tempos de fermentação (32, 48, 82 e 122 h).

Figura 5.3 – Gráfico de $\ln(C_{AC0}/C_{AC})$ em função do tempo para determinação da constante de degradação de AC (k_{dAC}) em caldos de cultivo. As retas representam os ajustes do modelo linear aos dados experimentais.



As constantes de degradação de AC (k_{dAC}) obtidas pelo ajuste do modelo linear aos dados experimentais estão apresentadas na **Tabela 5.3**.

Tabela 5.3 – Constantes de degradação do AC (k_{dAC}) para amostras de caldo de cultivo em diferentes tempos de fermentação.

Tempo (h)	$[\text{NH}_4^+]$ (mg/L)	k_{dAC} (h^{-1})	r^2
32	59,2	$0,0059 \pm 0,0003$	0,93
48	89,0	$0,0035 \pm 0,0001$	0,95
82	324,0	$0,0037 \pm 0,0003$	0,94
122	918,1	$0,0079 \pm 0,0002$	0,96

Assim como os resultados obtidos nos ensaios em solução aquosa e de acordo com os relatos da literatura científica, os valores de k_{dAC} aumentaram à medida em que aumenta o pH e a concentração de íons NH_4^+ . No entanto, a amostra referente ao tempo de 32 h com concentração de íons NH_4^+ de 60 mg/L e pH 6,84 resultou num maior valor de k_{dAC} em ($0,0059 \text{ h}^{-1}$) quando comparada com os valores obtidos em pH 6,5 e 7,5 contendo concentração de íons NH_4^+ de 300 mg/L, $0,0021$ e $0,0055 \text{ h}^{-1}$,

respectivamente. Isto sugere que outros componentes presentes no meio de cultivo também atuam como agentes de hidrólise de AC. Outra explicação para o resultado observado é a re-metabolização do AC pelo próprio micro-organismo para produzir outros metabólitos secundários ou também a modificação estrutural da molécula de AC para que não cause danos celulares durante a fase de crescimento (MAYER e DECKWER, 1996).

Os resultados de k_{dAC} para as amostras dos tempos 48 e 82 h foram semelhantes, apesar das concentração de íons NH_4^+ ser 3,64 vezes maior para o tempo de 82 h e o pH ser maior. No entanto, estes resultados estão dentro da faixa esperada de k_{dAC} obtidos para solução aquosa. No tempo de 122 h com concentração de íons NH_4^+ de 918 mg/L e pH 7,33, o valor de $k_{dAC}=0,0079 \text{ h}^{-1}$ está dentro da faixa esperada como mostra os resultados obtidos para solução aquosa ($0,0036 \text{ h}^{-1}$ para pH 6,5 e $0,0098 \text{ h}^{-1}$ para pH 7,5).

No que diz respeito às possíveis razões para degradação de AC pode-se considerar que o resultado da ação de metabólitos ou enzimas produzidas pelo micro-organismo produtor ou compostos de meio de cultura, bem como a re-metabolização do AC são mais evidentes na fase de crescimento celular (82 h). Já na fase estacionária, os principais fatores de degradação da molécula são o pH e a concentração de íons NH_4^+ . Ao final da etapa de crescimento, a concentração de íons NH_4^+ em caldo de cultivo aumenta significativamente e sua contribuição para degradação de AC nesse ambiente deve ser considerada.

5.4. Conclusões

AC é mais estável em pH 6,5 que em pH 7.5, tanto em solução aquosa quanto em caldo de cultivo.

A presença de íons NH_4^+ no caldo de fermentação tem um efeito significativo na degradação do AC.

As constantes de degradação de AC em caldo de cultivo são maiores à medida que se prolonga o tempo do processo. A amônia liberada pelo metabolismo proteico e acumulada no caldo de cultivo tem um importante efeito na degradação da molécula de AC durante o processo de produção deste composto.

Capítulo 6

**ESTUDOS DE ADSORÇÃO DE ÁCIDO
CLAVULÂNICO EM ADSORVENTES
ALTERNATIVOS E RESINA DE TROCA IÔNICA
PARA APLICAÇÃO EM FERMENTAÇÃO
EXTRATIVA**

RESUMO

Ácido clavulânico (AC) é um composto beta-lactâmico produzido pelo metabolismo secundário de *Streptomyces clavuligerus*, que possui um amplo espectro contra a ação de enzimas beta-lactamases. Materiais adsorventes alternativos têm sido utilizados em muitos processos de recuperação de biomoléculas como açúcares, aminoácidos, antibióticos e etanol, entre outras. Neste estudo, foram avaliados os potenciais de remoção de AC por três materiais alternativos (carvão ativado, hidrotalcita calcinada, clinoptilolita) e uma resina de troca iônica Amberlite IRA 400, conhecida por sua eficiência na remoção de AC, com potencial aplicação para estudos de fermentação extrativa. O pH, o tempo de equilíbrio e o potencial de remoção pelos adsorventes foram avaliados na remoção de AC de caldo de cultivo. A resina IRA 400 mostrou ser mais adequada para aplicação em fermentação extrativa de AC por causar pequena variação de pH no caldo de cultivo e atingir rapidamente o equilíbrio, além de apresentar boa capacidade de adsorção de AC.

6.1. Introdução

A fermentação extrativa pode representar uma solução tecnológica para a limitação da produtividade de processos causada pelo acúmulo de produto no caldo de fermentação. Como o próprio nome sugere, o conceito se aplica a um método que integra simultaneamente as etapas de produção e extração da molécula de interesse.

Durante o processo de produção de AC por *S. clavuligerus*, as condições típicas de temperatura (28-30°C), os componentes do caldo de cultivo, condições de pH e as próprias células, aceleram a decomposição do produto e levam à baixa produtividade (MAYER e DECKWER, 1996; ROUBOS et al., 2002). Outros aspectos importantes que devem ser considerados no bioprocesso é a limitação da síntese de produto que pode ser causada por altas concentrações no caldo de cultivo e o efeito citotóxico causado pelo produto, que pode causar danos à viabilidade celular. Um exemplo típico é a produção de etanol por leveduras. Altas concentrações deste produto no meio levam à redução da viabilidade celular e à diminuição do rendimento do processo (BAI et al., 2008).

Em relação à produção de AC, Teodoro et al. (2010), estudando a produção de AC em biorreator convencional de 10 L operado em batelada alimentada com alimentação de glicerol e ornitina, obtiveram uma produção máxima próxima de 1,6 g/L. Durante a realização do presente trabalho de doutorado, observou-se que nos ensaios de produção de AC, as máximas produções atingiram valores de 1543 mg/L em cultivos a 20°C com concentração de glicerol de 30 g/L em ensaios conduzidos em mesa

incubadora rotativa. Outras alternativas propostas no presente trabalho otimizaram a produção de AC, no entanto os valores obtidos não ultrapassaram a produção de 1500 mg/L de AC. Esta limitação pode ser um indicativo de que o AC seja citotóxico a partir deste limite de concentração, caracterizando um processo de inibição pelo produto. Para examinar esse efeito, esta etapa do trabalho propôs investigar a remoção do AC do caldo durante o cultivo a partir do uso de adsorventes adequados. Num primeiro momento, foi testada a eficiência de diferentes tipos de adsorventes com potencial para remoção de AC. Em seguida, foi realizado um processo de fermentação extrativa para avaliar o efeito da remoção de AC na concentração celular e na sua própria biossíntese.

Dentre os processos comumente utilizados nas operações de separação e purificação de AC destaca-se o processo de adsorção em fase sólida. De acordo com Gubulin (1990), o processo de adsorção é um fenômeno em que uma fase fluida (adsortivo) é colocada em contato com uma fase sólida (adsorvente) e na interface de separação entre as duas fases ocorre uma fonte de atração entre o adsorvente e as espécies químicas (adsorbatos) presentes na fase fluida.

O AC se caracteriza por apresentar carga elétrica em condições de pH neutro ($pK_a=2,5$), o que permite com que o processo de adsorção por troca iônica seja o método mais satisfatório e amplamente empregado para purificação do AC (SILVA et al. 2009). Apesar de ser uma técnica muito utilizada em operações de purificação de AC, não se tem relatos na literatura da utilização de resinas de troca iônica como ferramenta para de remoção de AC 'in situ' durante o processo fermentativo.

Amberlite IRA 400 é uma resina de troca aniônica, macroporosa, altamente básica, carregada positivamente com grupo funcional amônio quaternário e que possui ampla aplicação nos processos de purificação e remoção de ânions. Estudos anteriores de separação e purificação de AC já documentaram a eficácia da resina IRA 400 na adsorção desse composto (ALMEIDA *et al.*, 2003). Adsorventes alternativos como carbono ativado, hidrotalcita e zeólita têm sido muito utilizados na separação, purificação e imobilização de biomoléculas como açúcares, aminoácidos e antibióticos (CHANG *et al.*, 2006; FORTE e MAUGERI, 2007)

O carvão ativado é um material com uma elevada área superficial e alta porosidade. Na superfície do carvão existem radicais ácidos e básicos, estes últimos estão associados a superfícies com grandes quantidades de oxigênio e possuem a propriedade de trocar ânions. A literatura aborda alguns estudos de adsorção de

antibióticos como ácido 6-aminopenicilânico e ciprofloxacina no tratamento de efluentes (DUTTA et al., 1999; CARABINEIRO et al., 2012).

As hidrotalcitas são hidróxidos mistos lamelares que contém cátions trivalentes e divalentes, normalmente o alumínio ou magnésio intercalados com um ânion, em geral carbonatos e sulfato. Nestas estruturas, parte dos cátions divalentes (M^{2+}) são substituídos por cátions trivalentes (M^{3+}). Esta substituição gera um excesso de cargas positivas nas lamelas, que é compensado por ânions interlamelares e lhe confere a capacidade de trocar ânion. Esse material possui uma grande área superficial, boa estabilidade térmica e alta capacidade de troca iônica. Por causa dessas características diferenciadas, as hidrotalcitas têm recebido considerável atenção quanto à suas aplicações (GOH et al., 2008). Na maioria das suas aplicações, as hidrotalcitas são utilizadas na forma calcinada, constituída de uma solução sólida de óxidos metálicos e a desidratação das suas lamelas pelo processo de calcinação permite uma troca iônica mais eficiente.

Zeólitas são sólidos inorgânicos cristalinos que contém alumínio, silício e oxigênio arranjados em uma estrutura altamente regular. Elas podem ser de origem natural ou sintéticas e apresentam alta microporosidade para adsorver moléculas de acordo com tamanho de poro. A ampla superfície interna, estabilidade térmica e suas propriedades de troca iônica fazem com que as zeólitas sejam materiais muito utilizados na purificação de açúcares e proteínas (CHANG et al., 2006; SEETHARAM e SAVILLE, 2002; AHMED et al., 1998).

No presente trabalho investigou-se o potencial de remoção de AC de caldo de cultivo utilizando resina de troca iônica IRA 400 e outros materiais alternativos como carvão ativado, hidrotalcita calcinada e zeólita (clinoptilolita), objetivando selecionar a melhor fase sólida para aplicação no processo de fermentação extrativa de AC.

6.2. Materiais e Métodos

6.2.1. Adsorventes e tratamentos

Quatro tipos de materiais (carvão ativado, hidrotalcita calcinada e zeólita e resina Amberlite IRA 400) foram examinados para adsorção de AC de caldos de cultivo. Os materiais e os procedimentos de utilização estão descritos a seguir:

1. Zeólita natural Clinoptilolita (tipo SiO_2 e Al_2O_3 , 0,4-1,0 mm de granulometria) adquirida da Indústria Celta Brasil Ltda., tratada com NaCl 4% m/v durante 10 min e secos em estufa a 70°C.

2. Carvão Ativado (granulado, 1-2 mm, Synth), lavado com água destilada e seco em estufa a 70°C.

3. Hidrotalcita (Pural ®MG70, composta de 70% de MgO) cedida pelo Dr. Marcus Bruno Soares Forte (Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas). O material foi calcinado a 500°C por 4 h.

4. Amberlite IRA 400. A resina foi tratada com solução NaCl 10% m/v por 1 h para carregar os grupos aniônicos. Em seguida, foi adequadamente lavada com H_2O ultrapura até pH atingir a neutralidade.

6.2.2. Cinética de adsorção

Para determinar o tempo necessário para atingir o equilíbrio de adsorção, 15 g de adsorvente previamente tratados foram incubados com 100 mL de caldo de cultivo contendo aproximadamente 350 mg/L de AC e pH inicial igual a 7,0 em reatores encamisados a 25°C e 600 rpm de agitação. Amostras foram periodicamente retiradas, centrifugadas a 2700·x g por 2 min e as concentrações de AC determinadas pelo método de Bird et al. (1982).

Os perfis de adsorção foram avaliados em termos de concentração relativa ao equilíbrio (C_{AC}/C_{AC0}) e capacidade de adsorção do equilíbrio (q_{eq}) determinada pela equação (Equação 6.1):

$$q = (C_{AC0} - C_{AC}) \cdot \frac{V}{m} \quad \text{(Equação 6.1)}$$

onde:

C_{AC} : concentração do AC no tempo t; (mg/L)

C_{AC0} : concentração do AC no tempo t=0; (mg/L)

V: volume da solução; (L)

m: massa do adsorvente; (m)

O adsorvente foi selecionado com base nos resultados destes experimentos e utilizado para os testes seguintes.

6.2.3. Isotermas

As isotermas foram obtidas para se determinar a capacidade máxima de adsorção de AC no equilíbrio. Para isso, foram utilizados 0,2 g do adsorvente selecionado na etapa anterior para 5 mL de solução aquosa de AC e caldo de cultivo, com concentrações de AC variando na faixa de 150 a 1250 mg/L de AC. As soluções foram incubadas em mesa incubadora rotativa a 150 rpm até atingir o equilíbrio. A concentração de AC do equilíbrio no sobrenadante foi medida. As capacidades de adsorção do adsorvente no equilíbrio (q_{eq}) foram estimadas a partir do balanço de massa (**Equação 6.2**):

$$m_{AC0} = m_{ACfinal}$$

$$C_{AC0} \cdot V = C_{ACeq} \cdot V + q_{eq} \cdot m \quad \text{(Equação 6.2)}$$

onde:

C_{AC0} : concentração inicial de AC (mg/L)

V: volume (mL)

C_{ACeq} : concentração de AC no equilíbrio (mg/L)

m: massa de resina (g)

q_{eq} : capacidade de adsorção de AC no equilíbrio (mg/g)

A capacidade de adsorção no equilíbrio (q_{eq}) foi expressa em mg de AC por g de resina. Os resultados experimentais para as isotermas a 25°C foram ajustados de acordo com o modelo de adsorção de Langmuir (**Equação 6.3**).

$$q_{eq} = \frac{q_{max} \cdot C_{ACeq}}{k_L + C_{ACeq}} \quad \text{(Equação 6.3)}$$

onde:

q_{max} : capacidade máxima de adsorção de AC no equilíbrio (mg/g)

C_{ACeq} : concentração de AC no equilíbrio (mg/L)

k_L : constante de adsorção de Langmuir (mg/L)

6.2.4. Análise da concentração de AC

A concentração de AC foi analisada pelo método espectrofotométrico proposto por Bird et al. (1982) que mede a absorvância do produto da derivatização do AC com imidazol em comprimento de onda de 311 nm. Clavulin® na forma de clavulanato de potássio foi utilizado como padrão.

6.3. Resultados

6.3.1. Ensaio de adsorção de AC

O primeiro passo no desenvolvimento de um processo de fermentação extrativa é a seleção de potenciais adsorventes. Neste estudo, quatro adsorventes foram escolhidos para análise, com base nas suas características de recuperação e de custo. Um tempo curto de equilíbrio de adsorção é desejável, a fim de minimizar o tempo de contato do caldo com o adsorvente durante a fermentação extrativa. Os adsorventes testados foram o carvão ativado, uma zeólita (clinoptilolita), hidrotalcita calcinada e a resina de troca aniônica Amberlite IRA 400, em concentrações de 15 % m/v, usando caldo de fermentação isento de células como a fase líquida. Os desempenhos dos adsorventes foram avaliados com base nas variações de concentração de AC na fase líquida e do pH ao longo de um período de 120 min, uma vez que sabe-se que o pH afeta a degradação do AC. Bersanetti et al. (2005) relataram que o AC é mais estável a pH 6,2 e é altamente instável em pHs superiores a 8,0. O pH do caldo de fermentação encontra-se na faixa de 6,8 a 7,2, sendo que para padronizar os experimentos, o pH inicial dos caldos de fermentação usados foi ajustado em 7,0.

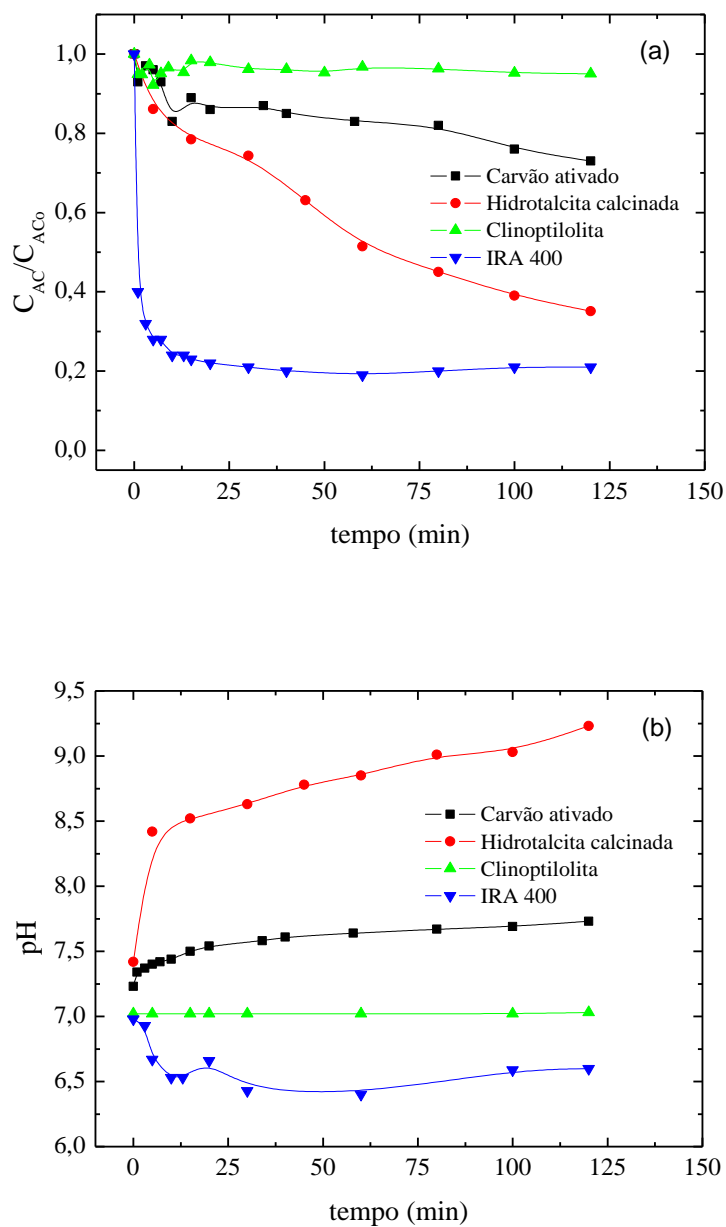
A adição de carvão ativado e hidrotalcita calcinada ao caldo de fermentação provocou o aumento de pH durante o processo de adsorção a 25 °C (Figura 1). No ensaio realizado com carvão ativado o pH atingiu o valor de 7,5 após aproximadamente 10 min, e uma baixa capacidade de adsorção de AC de 23% ($C_{AC}/C_{AC0}=0,77$) foi observada após 120 minutos (**Figura 6.1**). Hidrotalcita calcinada apresentou alta capacidade de adsorção de AC, com 65% de adsorção ($C_{AC}/C_{AC0}=0,35$) obtida após 120 min. No entanto, o pH mostrou um aumento brusco após a adição do adsorvente, alcançando o valor de 8,5 após 10 min. Este efeito também foi observado em outros estudos que empregam hidrotalcita calcinada em sistemas de adsorção (SEIDA et al.,

2001; FORTE et al., 2012). A hipótese de que o aumento do pH poderia ter degradado AC por hidrólise básica foi baseada no fato de que o equilíbrio não foi atingido mesmo após 120 min. É também conhecido que o aumento de pH não é desejável durante a fermentação extrativa, devido ao efeito negativo sobre o crescimento celular.

Quando clinoptilolita foi utilizado como adsorvente, o pH permaneceu praticamente inalterado, em torno de pH 7,0, e uma capacidade de adsorção CA constante e muito baixa de apenas 6,5% ($C_{AC}/C_{AC0}=0,935$) foi observada após 30 minutos (**Figura 6.1**).

No ensaio de adsorção com Amberlite IRA 400, o pH caiu drasticamente durante os primeiros minutos e, em seguida, manteve-se em torno de 6,5. Este foi o melhor valor obtido para os diversos adsorventes, mostrando que este adsorvente foi o mais apropriado para minimizar a degradação do AC. IRA 400 também mostrou os resultados mais promissores em termos de remoção CA, uma vez que foi capaz de adsorver 78% da AC ($C_{CA}/C_{CA0}=0,22$) sendo que a remoção com este adsorvente alcançou o equilíbrio no menor tempo (<20 min). A resina Amberlite IRA 400 foi, portanto, selecionada para estudos posteriores fermentação extrativa de AC.

Figura 6.1 – Adsorção de AC em carvão ativado, hidrotalcita calcinada, clinoptilolita e IRA 400, utilizando-se 15 g de resina para 100 mL de caldo de cultivo em reator em batelada a 25°C e 600 rpm: (a) cinéticas de adsorção e (b) perfis de pH.

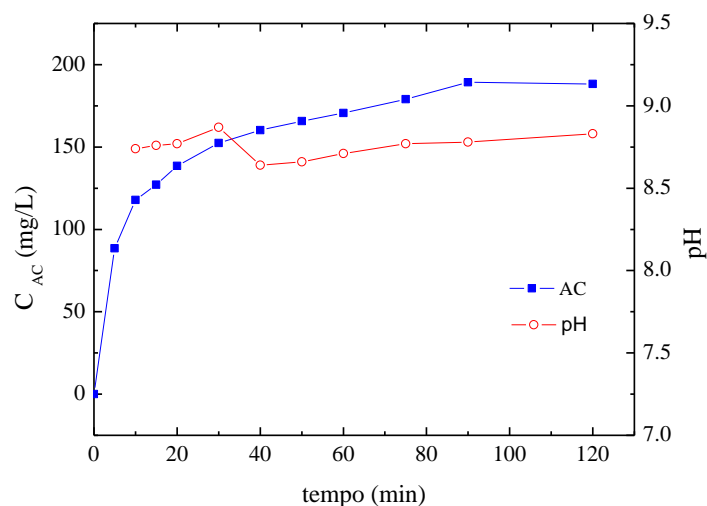


6.3.2. Etapa de dessorção de AC em IRA 400

A próxima etapa foi avaliar a recuperação do AC da resina IRA 400. Para isso, após a etapa de adsorção a resina foi lavada duas vezes com 100 mL de água ultrapura e a eluição foi realizada utilizando 100 mL de NaCl 10% m/v, mantendo-se a temperatura

de 25 °C. Amostras foram retiradas periodicamente e foram medidos a concentração de AC e o pH ao longo do processo. A etapa de dessorção está ilustrada na **Figura 6.2**.

Figura 6.2 – Perfis de C_{AC} (mg/L) e de pH durante dessorção de AC da resina IRA 400 a 25°C em processo conduzido em batelada.



Pelo gráfico da Figura 6.2 observou-se que a etapa de eluição foi mais lenta que a de adsorção e em 2 h houve a eluição de cerca de 70% da massa de AC adsorvida na resina ($m_{ACrecuperada}/m_{ACadsorvida}=0,70$).

A recuperação parcial de massa de AC recuperada pode ser devido à forte atração eletrostática entre as moléculas de AC e os sítios carregados da resina que dificultam a eluição. Outra possível explicação também pode ser atribuída à degradação do AC, uma vez que houve um aumento repentino no pH durante a etapa de dessorção, atingindo valores de 8,8. A cinética de dessorção do AC em caldo de cultivo mostrou que o tempo necessário para se atingir o equilíbrio foi de 100 min.

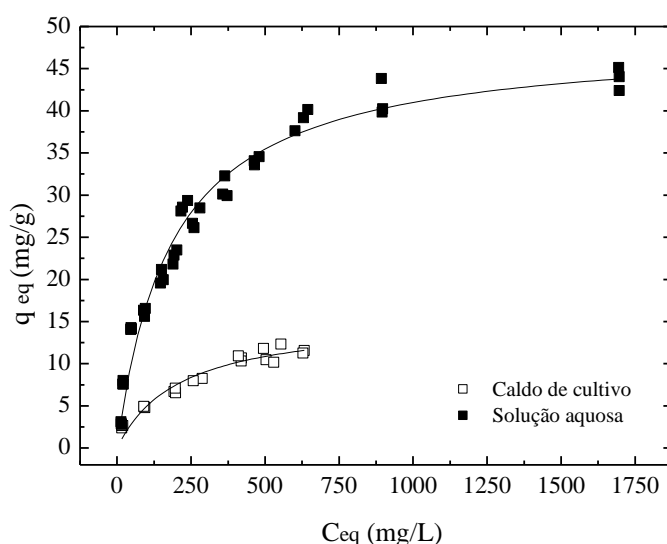
6.3.3. Isotermas de adsorção utilizando resina IRA 400

As isotermas de adsorção foram obtidas para se obter a relação entre a massa de AC adsorvida e a concentração de AC em solução no equilíbrio. Os resultados apresentaram uma indicação da capacidade máxima de adsorção do adsorvente, antes da sua utilização posterior em fermentação extrativa.

As isotermas de adsorção em resina IRA 400 a 25°C foram obtidas utilizando solução aquosa de AC (Clavulin®) e caldo de cultivo (**Figura 6.3**). O tempo atribuído

para se alcançar o equilíbrio foi estimado a partir dos resultados do ensaio de cinética de adsorção de AC. Nos ensaios de isoterma, utilizou-se um tempo de 40 min para garantir que o equilíbrio de adsorção fosse alcançado. O modelo de Langmuir ajustou-se satisfatoriamente aos resultados experimentais, como previamente documentado por Barboza et al. (2003). Os valores dos parâmetros de isoterma (capacidade máxima de adsorção, q_{\max} , e K_L) foram estimados por ajuste do modelo de Langmuir aos valores experimentais de q_{eq} e C_{ACeq} .

Figura 6.3 - Isotermas de adsorção de AC em IRA 400 usando solução aquosa de Clavulin® e caldo de cultivo a 25°C e pH 7,0. A linha representa o ajuste do modelo de Langmuir aos pontos experimentais.



O modelo de Langmuir permitiu uma descrição conveniente do processo de adsorção (**Figura 6.3**). Os componentes do caldo de cultivo reduziram a capacidade máxima de adsorção (q_{\max}) de AC de $48,55 \pm 1,20 \text{ mg}_{\text{AC}}/\text{g}_{\text{resina}}$ em solução aquosa para $14,92 \pm 1,00 \text{ mg}_{\text{AC}}/\text{g}_{\text{resina}}$ em caldo de cultivo. Estes valores podem ser comparados a outros registrados na literatura para processos de purificação de antibióticos. Silva et al. (2009) estudaram a adsorção de AC de solução aquosa de Clavulin® a 20°C em resina de troca iônica Streamline QXL e obtiveram valor de q_{\max} de $27,17 \text{ mg}_{\text{AC}}/\text{g}_{\text{resina}}$.

6.4. Conclusões

O objetivo principal deste trabalho foi fazer uma avaliação preliminar da capacidade de adsorção de alguns adsorventes alternativos com potencial uso em processos de fermentação extrativa. Observou-se que todos os adsorventes testados (clinoptilolita, carvão ativado, hidrotalcita calcinada e resina Amberlite IRA 400) apresentaram determinado potencial de remoção de AC.

A resina IRA 400 apresentou menor tempo para atingir o equilíbrio de adsorção (15 min) e menor variação de pH durante esta etapa, o que lhe conferiu o melhor potencial de aplicação em estudos de fermentação extrativa. As máximas capacidades de adsorção de AC foram de $48,55 \pm 1,20 \text{ mg}_{\text{AC}}/\text{g}_{\text{resina}}$ em solução aquosa de Clavulin® e de $14,92 \pm 1,00 \text{ mg}_{\text{AC}}/\text{g}_{\text{resina}}$ em caldo de cultivo, corroborando com a literatura de que o caldo de cultivo contém componentes iônicos que competem com o AC pelo sítio ativo da resina e reduzem a capacidade máxima de adsorção.

Capítulo 7

**FERMENTAÇÃO EXTRATIVA DE ÁCIDO
CLAVULÂNICO UTILIZANDO
RESINA DE TROCA IÔNICA**

RESUMO

A integração entre processos fermentativos e de remoção de produto é uma proposta alternativa para a obtenção de altos rendimentos do produto. O ácido clavulânico (AC) é um inibidor de beta-lactamases amplamente utilizado na prática médica. O AC é um produto obtido por via fermentativa e a regulação da sua biossíntese ainda é pouco conhecida. Há indícios de que sua produção seja limitada pelo acúmulo deste no caldo de cultivo. Portanto, a remoção do produto durante etapa de fermentação (fermentação extrativa) pode ser uma alternativa para a melhoria do processo. Neste trabalho, investigou-se o efeito da remoção de AC por resina comercial de troca iônica IRA 400 em fermentações conduzidas a 20°C em diferentes concentrações de glicerol como fonte de carbono. Os resultados indicaram um aumento de 48% na concentração máxima de AC, em comparação com cultivos nas mesmas condições realizadas sem a remoção do produto. Em cultivos com pulso de glicerol de 15 g/L e outro de concentração inicial de glicerol de 30 g/L, valores de concentração de AC máxima acumulada foram 3,34 e 3,56 vezes maiores em relação ao controle (768 mg/L). Observou-se que a remoção do produto aumentou a velocidade de produção de AC pelas células, indicando que o AC em concentrações maiores que 500 mg/L atua como inibidor da sua biossíntese.

7.1. Introdução

O uso clínico contínuo de antibióticos beta-lactâmicos causou o aparecimento de um amplo espectro de bactérias resistentes a estes compostos, sendo esta relacionada principalmente à produção de enzimas beta-lactamases pelos micro-organismos resistentes. Como resultado, os inibidores de beta-lactamases têm emergido como um modo de superar o problema da resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos. O ácido clavulânico (AC), um inibidor que tem sido utilizado com sucesso na prática clínica, é um metabólito secundário produzido pelo actinomiceto de *Streptomyces clavuligerus* (BAGGALEY *et al.*, 1997) e usado em combinação com antibióticos beta-lactâmicos que sejam sensíveis ao ataque das beta-lactamases. O AC atua inibindo especificamente os centros ativos dessas enzimas, evitando a perda funcional do antibiótico beta-lactâmico e, assim, mantém sua ação antimicrobiana. AC é utilizado sob a forma do seu sal de potássio em conjunto com amoxicilina, prescrita clinicamente como Amoxicilina (Augmentin®) e em conjunto com a ticarcilina, como Timentin®.

O tipo selvagem *S. clavuligerus* normalmente produz entre 0,1 e 1 g/L de AC em cultivo em batelada utilizando meios complexos com glicerol ou ácidos graxos como a principal fonte de carbono e derivados de soja como fonte de nitrogênio (MAYER e DECKWER 1996; GOUVEIA *et al.*, 1999; BAPTISTA-NETO *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2001; 2003; WANG *et al.*, 2005; TEODORO *et al.*, 2006; 2010; ORTIZ *et al.*, 2007;

COSTA e BADINO, 2012). A inibição pelo produto é um problema comum durante os processos fermentativos e pode causar baixos rendimentos em produto. Trabalhos anteriores mostraram que uma concentração de AC elevada (1,3 g/L) no caldo de fermentação diminuiu a velocidade de crescimento microbiano (ROUBOS et al., 2002). Num trabalho recente utilizando o tipo selvagem *S. clavuligerus*, a produção máxima AC (C_{ACmax}) de cerca de 1,6 g/L foi relatada por TEODORO et al. (2010) em cultivos em batelada alimentada em biorreatores de bancada, utilizando alimentação de glicerol e ornitina, bem como por Costa e Badino (2012) em cultivos em batelada com pulsos de glicerol sob baixas temperaturas. Este valor limitante de C_{ACmax} registrado na literatura pode ser um indicativo da inibição da produção de AC pelo próprio produto.

O uso de fermentação extrativa com a inclusão de uma resina adsorvente no meio de produção é um método eficaz para reduzir a inibição pelo produto e aumentar o rendimento do processo. As vantagens da fermentação extrativa incluem a diminuição dos efeitos tóxicos do produto sobre o crescimento microbiano, a redução da inibição pelo produto (LEE et al., 2003) e, portanto, a melhoria do rendimento em produto. Além disso, a incorporação de uma etapa de remoção do produto durante a fermentação reduz o tempo no qual o produto é exposto a condições prejudiciais de pH, temperatura e oxidação, o que é vantajoso no caso de produtos instáveis, como o AC.

Resinas adsorventes têm sido utilizadas com sucesso em fermentações com diferentes micro-organismos para a melhoria da produção de bioprodutos, incluindo pristinamicina, teicoplanina e rubradirina (MARSHALL et al., 1990; LEE et al., 2003; JIA et al., 2006). Resinas adsorventes foram usadas por Singh et al. (2003) para melhorar a produção de teicoplanina e reduzir a toxicidade auto-fúngica. Liu et al. (2012) relataram uma melhoria significativa na produção de thailandepsina A por *Burkholderia thailandensis* E264 após a otimização sistemática das condições de fermentação e inclusão de resina Diaion HP -20 para reduzir os efeitos de inibição pelo produto. Jia et al. (2006) relataram um aumento de 1,25 vezes na produção de pristinamicina em fermentação de *Streptomyces pristinaespiralis* após a adição de uma resina polimérica JD-1.

Uma vez que a molécula de AC está carregada negativamente em pH neutro, trocadores iônicos podem ser utilizados com grande eficácia em processos de recuperação da molécula. No capítulo anterior foram apresentados os resultados do estudo de adsorção de AC utilizando diferentes materiais trocadores iônicos (hidrotalcita calcinada, carvão ativado, clinoptilolita e resina Amberlite IRA 400). Os

resultados indicaram a resina Amberlite IRA 400 como apresentando o melhor potencial de aplicação nos estudos de fermentação extrativa.

Neste estudo foi avaliado os efeitos da remoção de AC por IRA 400 durante a fermentação sob diferentes condições de operação do processo.

7.2. Materiais e Métodos

7.2.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, conservada na forma de células vegetativas suspensas em solução crioprotetora com 10% v/v de glicerol a -70°C .

7.2.2. Meios de cultura

Meio de cultura de reativação

Em todos os ensaios foi utilizado o meio de cultura de reativação proposto por Rosa et al. (2005), descrito na **Tabela 7.1**. O pH foi ajustado em 6,8 e o meio de cultura esterilizado a 121°C e 1 atm por 15 minutos.

Tabela 7.1 - Meio de cultura de Rosa et al. (2005)

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	21
Peptona bacteriológica	10
Extrato de levedura	1
Extrato de malte	10
Tampão MOPS	21
K_2HPO_4	0,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,75
Solução de sais*	(1mL/L)

* Composição (g/L de água destilada): $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 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.

Meios de cultura de crescimento e produção

Os meios de cultura de inóculo e de produção tiveram a mesma composição e foram baseados no meio proposto por Teodoro et al. (2006) (**Tabela 7.2**).

Tabela 7.2 - Meio de cultura de Teodoro et al. (2006) modificado.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	15 / 30
Proteína isolada de soja	25
Tampão MOPS	21
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75
Solução de sais*	(1mL/L)

O meio de cultura original proposto por Teodoro et al. (2006) contém óleo de soja (1g/L) na sua composição. Neste estudo, o óleo de soja foi retirado da constituição do meio de cultura de produção e inóculo para garantir que os resultados em termos de produção de AC fossem exclusivamente em função do consumo de glicerol como única fonte de carbono.

7.2.3. Tratamento da resina Amberlite IRA 400

Amberlite IRA 400 foi tratada com solução NaCl 10% m/v por 1 h para carregar os grupos aniônicos. Em seguida, foi adequadamente lavada com H₂O ultra-pura até o pH atingir a neutralidade.

7.2.4. Fermentação Extrativa

O procedimento para execução dos cultivos em mesa incubadora rotativa foi descrito por Rosa et al. (2005) e consiste de três etapas: reativação do microrganismo, crescimento e produção, sendo que os meios de cultura estão representados nas **Tabelas 7.1 e 7.2**.

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 incubados por 24 h a 30°C e 250 rpm em mesa incubadora rotativa, modelo G25 (New Brunswick Scientific Co.). Frascos Erlenmeyers (500 ml) contendo 45 mL do meio inóculo foram inoculados com 5 mL de caldo de semente cultivada e incubados a 250 rpm durante 24 h a 30 ° C. Para a fase de produção da fermentação , a suspensão de inóculo foi transferida sob agitação em uma proporção de 10 % v/v a um balão de 3 L contendo o meio de produção. Alíquotas (60 mL) de meio inoculado foram transferidos para frascos de 500 mL de Erlenmeyer individuais e incubou-se a 250 rpm e 20 ° C.

Para a extração de AC durante os cultivos, 30 mL de caldo de fermentação foi centrifugado a 3725 x g e 4 °C durante 15 min . As células foram devolvidas aos frascos de agitação contendo o meio de fermentação, enquanto que os sobrenadantes foram transferidos para novos frascos contendo 3 g (10 % m/v) de resina Amberlite IRA 400, previamente tratada como descrito anteriormente e lavadas com água deionizada estéril. A resina foi lavada com água estéril para reduzir a probabilidade de contaminação do cultivo, uma vez que o seu material não permite autoclavagem. Os frascos foram incubados em incubador rotativo a 25°C e 250 rpm durante o tempo necessário para atingir o equilíbrio, conforme determinado nas experiências de cinética de adsorção apresentadas no Capítulo 6. A resina foi então separada do caldo por decantação e o caldo foi devolvido para os Erlenmeyers de modo a dar continuidade ao processo fermentativo. Este procedimento foi realizado cada vez que a concentração de AC no caldo atingiu 500 mg/L. Esta concentração foi escolhida com base no trabalho de Brethauer, 2007, que estudou o efeito da concentração de AC no crescimento celular. Neste trabalho, valores de concentração de AC até 500 mg/L não causaram dano à viabilidade celular. Todas as fermentações extrativas foram realizadas em triplicata.

7.2.4. Cultivos

Foram realizados quatro conjuntos distintos de cultivos para estudo da remoção de AC em experimentos de fermentação extrativa. As condições estão apresentadas a seguir:

- **B(15):** T=20°C - $C_{G,0}=15$ g/L. (Ensaio controle, sem remoção de AC)
- **FE(15):** T=20°C - $C_{G,0}=15$ g/L (Com remoção de AC)
- **FE(15+15):** T=20°C - $C_{G,0}=15$ g/L+15 g/L. Após esgotamento do glicerol inicial foi adicionado um volume de solução de glicerol de 150

g/L, autoclavada, de modo a se obter no caldo uma concentração de glicerol de 15 g/L.

- **FE(30):** T=20°C - C_{G,0}=30 g/L (Com remoção de AC).

7.2.5. Metodologia Analítica

A concentração de AC no caldo de fermentação foi determinada por análise espectrofotométrica em comprimento de onda de 311 nm de acordo com o método proposto por Bird et al. (1982). AC contido no produto farmacêutico Clavulin® (Glaxo SmithKline Farmacêutica, Rio de Janeiro, Brasil) foi utilizado como padrão.

A concentração de glicerol no sobrenadante foi determinada por um método enzimático usando um kit de teste de GPO-PAP triglicérides (Laborlab, Brasil).

O método proposto por Mayer e Deckwer (1996) foi usado para determinar a concentração de células (C_x) na presença de partículas sólidas. A concentração de células em massa seca em cultivos empregando meio solúvel foi medida e correlacionada com a densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀), o que gerou um modelo linear que descreve a relação entre a célula de massa seca e DO₆₀₀. Nas culturas com meio contendo partículas insolúveis (proteína isolada de soja, PIS), o caldo foi decantado durante 45 s, tempo necessário para precipitar a PIS e a densidade óptica foi medida a 600 nm (DO₆₀₀). O valor de concentração celular foi obtido a partir da equação de regressão linear entre C_x e DO₆₀₀.

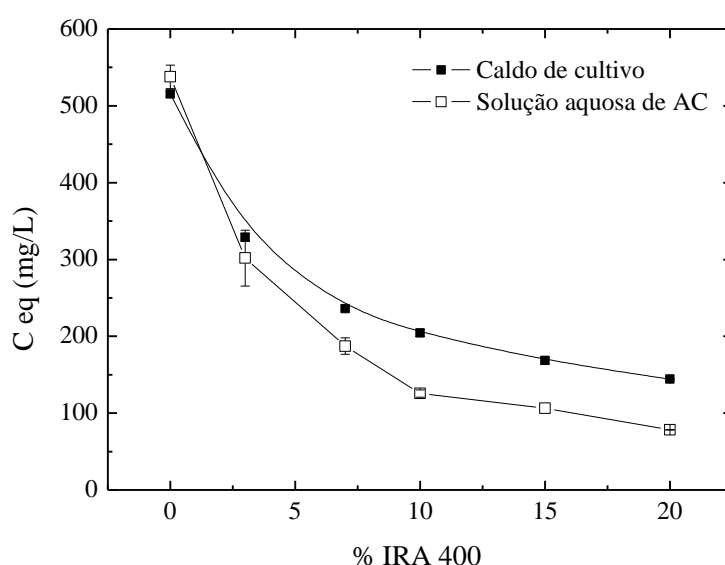
7.3. Resultados e Discussão

O AC é um metabólito secundário produzido durante a fase estacionária de crescimento microbiano e há indícios de que sua biossíntese seja inibida pelo produto. Portanto, a sua remoção do caldo de fermentação durante a fermentação pode representar uma operação importante no processo de melhoria da sua produção. Nos experimentos seguintes, a remoção de AC durante as fermentações extrativa foi realizada toda vez a concentração de AC no caldo atingiu um valor entre 500 e 600 mg/L. Uma alíquota de caldo de fermentação (30 mL) foi centrifugada, as células foram devolvidas ao Erlenmeyer e o sobrenadante foi colocado em contato com 10 % m/v de resina IRA 400 durante 20 min. O caldo de cultura foi em seguida separado da resina

por decantação, retornado para frasco de fermentação e novamente incubado em agitador rotativo, a fim de continuar o processo de fermentação. O efeito da remoção de AC nos diferentes cultivos realizados, FE(15), FE(15+15) e FE(30), foi comparado com os resultados obtidos utilizando fermentação convencional, sem remoção do produto (B(15) - cultivo convencional).

No capítulo 6 foram apresentados os valores obtidos de capacidade máxima de AC (q_{max}) em caldo de cultivo ($14,92 \pm 1,00 \text{ mg}_{AC}/\text{g}_{resina}$) obtidos dos ensaios de isoterma. No entanto, a proporção de massa de resina e massa de AC extraída do caldo de cultivo em experimentos preliminares de fermentação extrativa não mostrou ser eficaz na remoção da quantidade de massa AC pretendida, provavelmente devido a presença de células e outros componentes do caldo. Por esse motivo, outro experimento foi realizado para avaliar a carga de resina adequada para os experimentos de fermentação extrativa. A quantidade de IRA 400 para extrair uma quantidade satisfatória de AC a partir do caldo foi escolhido com base nos resultados ilustrados na **Figura 7.1**. Quando a concentração de CA atingiu 500 mg/L, a adição de 10% m/v de IRA 400 resultou na extração de aproximadamente 60% de AC presente no caldo.

Figura 7.1- Concentrações de AC no equilíbrio (C_{eq}) a partir do caldo (■) e (□) CA a partir da solução aquosa, em função da quantidade de IRA 400.

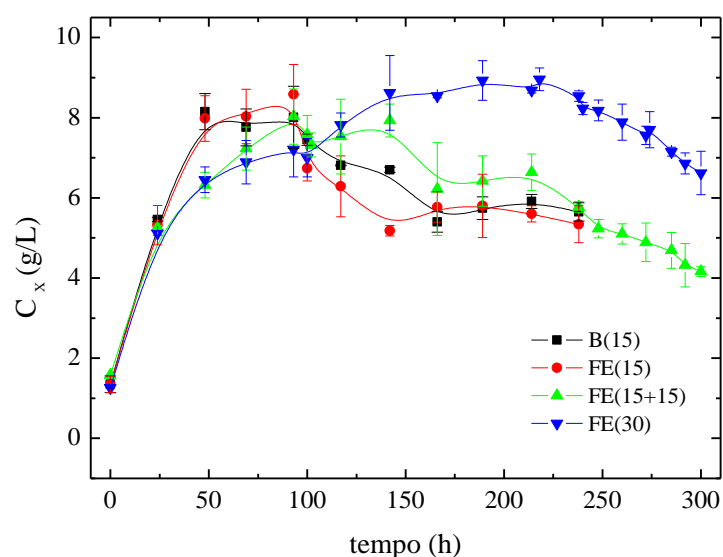


Comparando os resultados da fermentação convencional com a fermentação extrativa contendo de mesma concentração de glicerol (15 g/L - FE(15)) nota-se que a adição de IRA 400 em caldo de fermentação livre de células não afetou a concentração

celular, o pH, ou o consumo de glicerol (**Figuras 7.2, 7.3 e 7.4**).

As concentrações celulares ao longo do tempo foram semelhantes para os cultivos B(15) e FE(15), aumentando progressivamente logo após a inoculação até 50 h, passando de fase exponencial para a fase estacionária até 93 h. As concentrações máximas celulares de $8,58 \pm 0,75$ g/L (B(15)) e $8,01 \pm 0,77$ g/L (FE(15)) foram atingidas em cerca de 93 horas, antes do momento da primeira extração CA (100 h). Subsequentemente, cerca de 35% de redução nas concentrações de células foram observadas ao fim dos cultivos em 238 h. A máxima concentração celular de $8,03 \pm 0,69$ g/L obtida no cultivo com pulso de glicerol (FE(15+15)) também foi observada em 93 h de cultivo, no entanto o excesso de fonte de carbono prolongou a fase estacionária do crescimento celular neste cultivo. No cultivo com concentração de glicerol de 30 g/L (FE(30)), a máxima concentração celular ($8,93 \pm 0,49$ g/L) foi observada às 189 h. Esse efeito se deve ao excesso de fonte de carbono e energia que promove um melhor aproveitamento para manutenção das células. De um modo geral, os resultados para a fermentação extrativa indicaram que nos tempos de extração de AC (100, 142 e 189 h), as concentrações celulares foram ligeiramente menores do que os obtidos utilizando a fermentação convencional. Este resultado está provavelmente relacionado à perdas de biomassa durante o processo de extração de AC, porém sem afetar o desempenho do processo.

Figura 7.2 - Perfil da concentração de células durante fermentação convencional (B(15)) e extrativa (FE(15); FE(15+15); FE(30)) de *S. clavuligerus* a 20°C.



As **Figuras 7.3 e 7.4** apresentam os perfis da concentração de glicerol e pH durante as fermentações convencional e extrativas de *S. clavuligerus* a 20°C. Para os cultivos contendo concentração inicial de glicerol de 15 g/L, a fonte de carbono esgotou após 150 h. Nos cultivos B(15) e FE(15) observou-se um aumento repentino de pH logo após esgotamento de glicerol, com valores máximos de pH de 7,7 (B(15)) e 7,5 (FE(15+15)) no final do período de fermentação. O esgotamento do glicerol foi seguido por um aumento do consumo de proteínas (aminoácidos) como fonte de carbono com consequente liberação de amônia o que fornece uma explicação para o aumento do pH.

No cultivo FE(15+15), logo após o esgotamento do glicerol (150 h) foi dado um pulso de modo a se obter concentração de glicerol de 15 g/L no caldo de cultivo. Com o excesso de fonte de carbono nos cultivos FE(15+15) e FE(30), o pH sofreu uma pequena redução, atingindo valores próximos de 6,6. Como já discutido nos capítulos anteriores, o AC é mais estável em pHs em torno de 6,5, o que representa uma benefício na condução do processo ao reduzir os efeitos de degradação do produto.

Figura 7.3 - Perfil da concentração de glicerol durante fermentação convencional (B(15)) e extrativa (FE(15); FE(15+15); FE(30)) de *S. clavuligerus* a 20 °C.

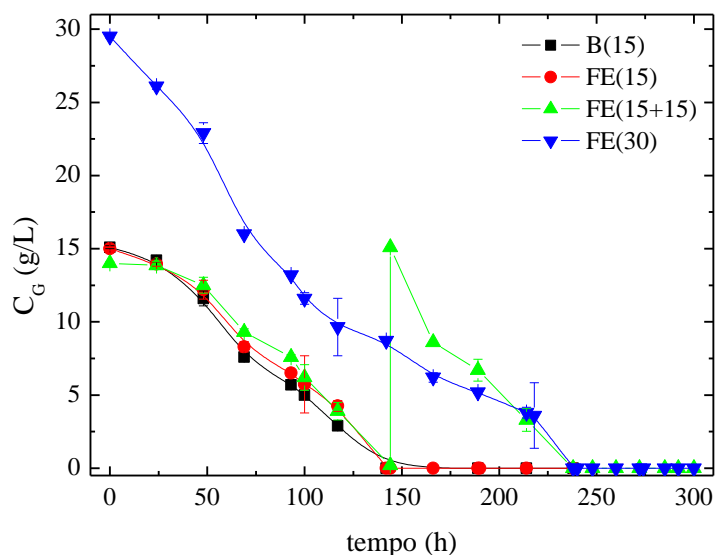
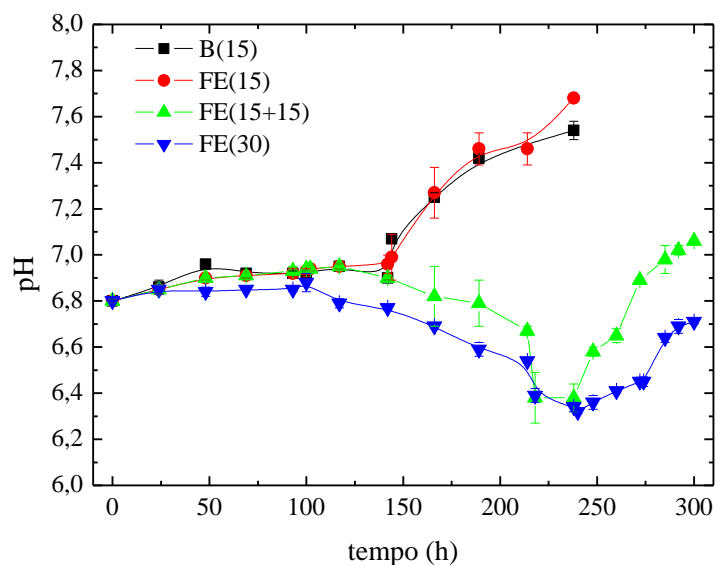
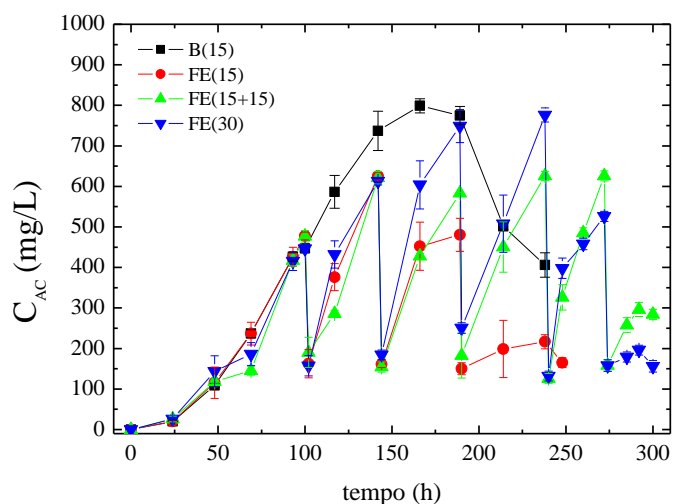


Figura 7.3 - Perfil do pH durante fermentação convencional (B(15)) e extrativa (FE(15); FE(15+15); FE(30)) de *S. clavuligerus* a 20°C.



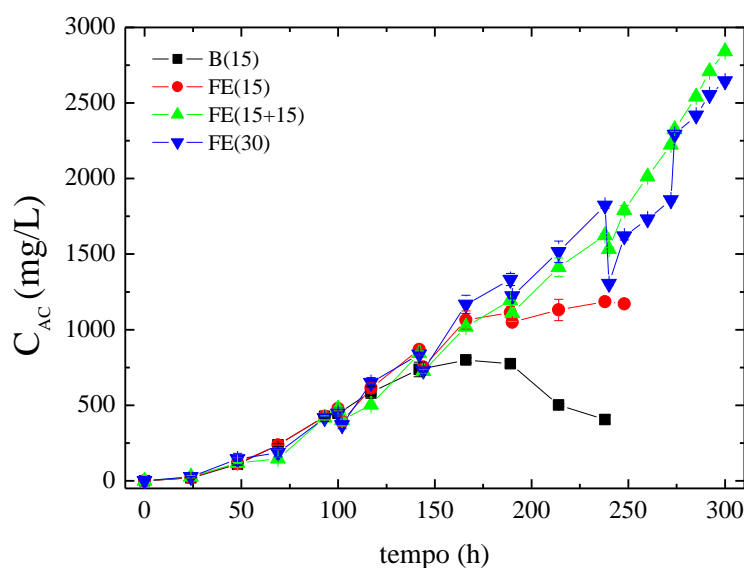
É importante ressaltar que estes resultados indicam que a operação de remoção de AC do caldo de cultivo não prejudicou o desempenho do processo, que seguiu o curso esperado.

Figura 7.4 - Perfil da concentração de AC no caldo durante as fermentações convencional (B(15)) e extrativas (FE(15); FE(15+15); FE(30)) de *S. clavuligerus* a 20 °C.



A **Figura 7.5** ilustra os perfis de concentração de AC no caldo. Os tempos de 100, 142, 189, 238 e 272 h foram os momentos em que houve remoção do produto.

Figura 7.5 - Perfil da concentração de AC acumulada durante as fermentações convencionais (B(15)) e extrativas (FE(15); FE(15+15); FE(30)) de *S. clavuligerus* a 20°C.



A **Figura 7.5** mostra os resultados de concentração de AC acumulada no caldo de cultivo considerando a massa de AC extraída e recuperada da resina. Os cálculos consideram a massa de AC extraída a partir do caldo e recuperada da resina após a dessorção em cada etapa de extração. A massa de AC removidas a partir do caldo foi determinada pela diferença entre a massa de AC no caldo de fermentação, antes e imediatamente após a extração. A massa de AC recuperada a partir da resina durante a cinética de dessorção ensaios foi equivalente a 69% da massa total adsorvida. A massa de AC adsorvida foi obtida por balanço de massa usando a seguinte equação (**Equação 7.1**):

$$m_{AC-ads} = (C_{CA-a} - C_{CA-d}) \cdot V \quad \text{(Equação 7.1)}$$

onde:

m_{CA-ads} : massa de AC adsorvida (mg)

C_{CA-a} : concentração de AC antes da extração (mg/L)

C_{CA-d} : concentração de AC depois da extração ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

V : volume do caldo de cultivo (L)

A massa de AC dessorvida (m_{CA-des}) determinada a partir ensaios de cinética de dessorção, apresentados no Capítulo 6, foi calculada usando a **Equação 7.2**:

$$m_{AC-des} = 0.70 \cdot m_{AC-ads} \quad \text{(Equação 7.2)}$$

Finalmente, a concentração de AC acumulada foi calculada pela **Equação 7.3**:

$$C_{AC-ai} = \frac{C_{ACi} \cdot V_{ai} + \sum_1^i m_{AC-desi}}{V_{di}} \quad \text{(Equação 7.3)}$$

onde:

C_{CA-ai} = concentração de AC acumulada na extração 'i' (mg/L)

V_{ai} = volume de caldo antes da extração 'i' (L)

$\sum_1^i m_{AC-desi}$ = somatória das massas de AC desorvidas em todas as extrações 'i' (mg)

V_{di} = volume de caldo após da extração 'i' (L)

Na fermentação convencional (B(15)), a produção de AC aumenta até que a fonte de carbono se esgote, atingindo um valor máximo de 798,9 mg/L às 166 h (**Figura 7.5**). Vale ressaltar que os resultados de produção de AC apresentados neste capítulo são de cultivos realizados com micro-organismo com menor viabilidade celular devido ao longo período armazenado a -80°C em ultrafreezer.

O uso de 10 % m/v de resina IRA 400 reduziu 65% da concentração de AC no caldo, em média, durante cada etapa de extração. A remoção de AC a partir do caldo de fermentação do cultivo FE(15) resultou num aumento de aproximadamente 48% na produção de AC em comparação com a fermentação convencional (B(15)), com uma concentração máxima de AC acumulada de 1180 mg/L após de 238 h de cultivo. Nos cultivos com diferentes concentrações de glicerol, FE(15+15) e FE(30), os aumentos foram significativamente maiores, atingindo valores de 3,34 e 3,56 vezes maior, respectivamente, em relação ao cultivo convencional. Os valores de concentração de AC acumulada calculados foram de 2644,8 mg/L para o cultivo FE(15+15) e de 2841,4 mg/L FE(30) ao final da fermentação.

No trabalho anterior, Costa e Badino (2012) demonstram que o valor médio da constante de degradação (K_{dAC}) a 20°C foi de $0,00173 \pm 0,00046 \text{ h}^{-1}$. Substituindo os valores de k_{dAC} e C_{AC} na **Equação 7.4**, foi possível calcular o perfil de velocidade de degradação de AC (r_{dAC} , mg/L/h). A partir de dados experimentais de acúmulo de AC (dC_{AC}/dt , mg/L/h) e de r_{dAC} , os valores de velocidade de produção de AC (r_{AC} , mg/L/h) ao longo de fermentações foram obtidos pelo balanço de massa para AC pela **Equação 7.5**.

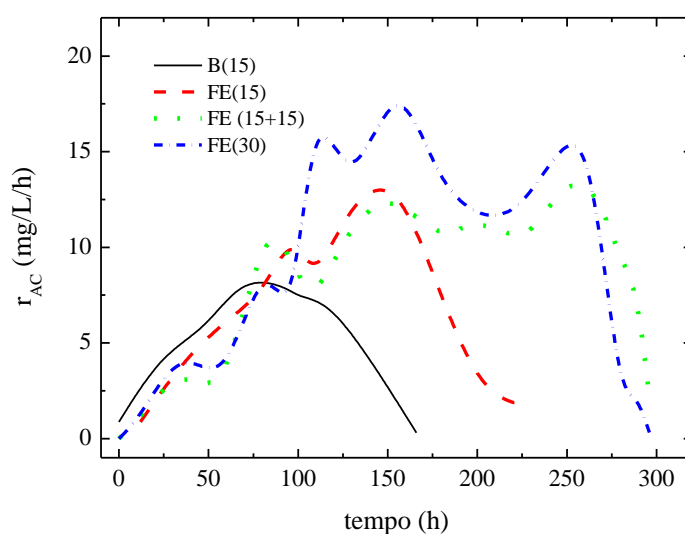
$$r_{dAC} = k_{dAC} \cdot C_{AC} \quad \text{Equação 7.4}$$

$$r_{AC} = \frac{d_{AC}}{dt} + r_{dAC}$$

Equação 7.5

Assim, foi possível obter os perfis de r_{AC} ao longo das fermentações convencional e extrativas e avaliar os efeitos individuais da extração AC termos de valores de velocidade de produção (r_{AC} , mg/L/h). A **Figura 7.6** ilustra estes perfis.

Figura 7.6 – Perfis de velocidade de produção de AC nas fermentações convencional e extrativas de AC com 10% m/v de IRA 400.



Após o início da extração (100 h), os valores de velocidade de produção de AC (r_{CA}) nas fermentações extrativas foram sempre superiores aos da fermentação convencional. Para efeitos comparativos, o valor máximo de velocidade de produção de AC (r_{ACmax}) na fermentação convencional foi de 8,4 mg/L/h em 76 h de cultivo, enquanto na fermentação extrativa FE(15) foi alcançado um valor de 13,7 mg/L/h em 155 h de cultivo, valor 63% superior que o obtido em B15, seguida de um decaimento que pode ser explicado pelo esgotamento de glicerol no caldo de cultivo. No cultivo FE(15+15) os valores de r_{ACmax} foram de 13,39 mg/L/h em 250 h de cultivo, 1,58 vezes maior que o obtido em B15. Neste cultivo, os valores de r_{AC} foram superiores a 10 mg/L/h a partir das 129 h até as 263 h, isso aconteceu porque o cultivo foi suplementado com glicerol e permitiu a maior viabilidade de produção de AC pelas células. No cultivo FE(30), este valor alcançou 19,74 mg/L/h em 155 h de cultivo, valor 2,30 vezes maior superior que o obtido no cultivo convencional (B15). Da mesma forma, que no cultivo

com pulso de glicerol, o excesso de fonte de carbono prolongou a viabilidade celular justificando valores mais altos de r_{AC} por um período mais longo (109-272 h)

Os valores mais elevados de velocidade de produção de AC (r_{AC}) nas fermentações extrativas em comparação com o processo convencional é a evidência de que a produção de AC é inibida pelo próprio produto.

Estes resultados indicam que, mantendo-se as concentrações de AC em níveis inferiores a 500 mg/L no caldo de cultivo há um aumento na velocidade de produção de AC pelas células rendendo um maior acúmulo de AC no caldo de fermentação. Os resultados, portanto, indicam fortemente que AC agiu como um inibidor da sua própria biossíntese, sendo esta informação o primeiro relato na literatura até o presente momento.

7.4- Conclusões

O uso de resina IRA 400 como adsorvente para remover AC durante o processo de fermentação resultou num aumento de 63% na produção máxima de AC, em comparação com o cultivo nas mesmas condições sem a remoção do produto. Em cultivos com pulso de glicerol de 15 g/L e concentração inicial de glicerol de 30 g/L, os valores de r_{ACmax} foram 1,58 e 2,30 vezes superiores, respectivamente, em relação ao cultivo convencional. Os resultados confirmaram a influência negativa da AC em sua própria biossíntese. O uso de fermentação extrativa, portanto, parece ser uma alternativa promissora para aumentar a produção de AC.

Capítulo 8

CONCLUSÕES GERAIS

Dos resultados apresentados neste trabalho de doutorado, conclui-se que:

- Na etapa de seleção das condições de cultivo para a produção de AC em diferentes condições de temperatura e alimentação de glicerol utilizando frascos agitados em mesa incubadora rotativa, a maior concentração máxima de AC (1534,3 mg/L) foi obtida no cultivo conduzido a 20°C com um pulso de glicerol (BP20-20-1), com correspondente produtividade volumétrica de 5,3 mg/L/h. A comparação entre as velocidades de produção (r_{AC}) e de degradação (r_{dAC}) de AC mostrou que a baixa temperatura teve maior influência sobre a produção de AC em relação à de redução da degradação do AC, contribuindo para o maior acúmulo de produto.
- Na condução do processo de produção de AC em baixas temperaturas (20 e 25°C) e altas concentrações de glicerol (30 e 60 g/L), a produção em mesa incubadora rotativa foi potencializada com o aumento da concentração de glicerol no meio de cultivo até 30 g/L. A maior produção de AC, de 1543 mg/L, foi obtida para o cultivo a 20°C e 30 g/L de glicerol, com correspondente produtividade de 7,4 mg/L/h. Os resultados confirmam que o glicerol é um repressor da síntese de AC, no entanto a concentração limitante desta variável depende das condições de temperatura e da composição do meio de cultivo utilizado.
- Nos ensaios de degradação de AC concluiu-se que AC é mais estável em pH 6,5 do que em pH 7,5, tanto em solução aquosa quanto em caldo de cultivo e que a presença de íons NH_4^+ no caldo tem um efeito significativo na degradação do AC durante o cultivo, contribuindo para o baixo rendimento do processo.
- Os estudos de seleção de resinas com potencial de remoção de AC indicaram que todos os adsorventes testados (clinoptilolita, carvão ativado, hidrotalcita calcinada e resina Amberlite IRA 400) apresentaram determinado potencial de adsorção de AC. No entanto, a resina IRA 400 apresentou menor tempo para atingir o equilíbrio de adsorção (15 min), menor variação de pH durante esta etapa e maior capacidade de extração de AC. As máximas capacidades de

adsorção de AC obtidas pelo modelo de Langmuir em IRA 400 foram de $48,55 \pm 1,20$ mg_{AC}/g_{resina} em solução aquosa de Clavulin® e de $14,92 \pm 1,00$ mg_{AC}/g_{resina} em caldo de cultivo.

- Nos ensaios de fermentação extrativa, o uso de 10 % IRA 400 reduziu 65% da concentração de AC no caldo, em média, durante cada etapa de extração. A remoção de AC a partir do caldo de fermentação do cultivo resultou num aumento de aproximadamente 48% na produção de AC, em comparação com a fermentação a 20°C sem remoção de produto. Nos cultivos com concentração inicial de glicerol de 30 g/L e 15 g/L com pulso de 15 g/L, os aumentos foram significativamente maiores, atingindo valores de 3,34 e 3,56 vezes maiores. Os valores de concentração de AC acumulada chegaram a 2644,8 mg/L no cultivo FE(15+15) e 2841,4 mg/L no cultivo FE(30). Os resultados confirmaram a influência negativa da AC em sua própria biossíntese. O uso de fermentação extrativa parece, portanto, ser uma técnica promissora para aumentar a produção de AC.

Capítulo 9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHARONOWITZ, Y.; DEMAIN, A.L. (1978); Carbon catabolite repression of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*, **Antimicrob Agents Chemother**, v.14, p.159-165, 1978.

AHMED, S.; CHUGHTAI, S.; KEANE, M.A. The removal of cadmium and lead from aqueous solution by ion exchange with NaY zeolite. **Sep. Purif Technol.**, v.13, n.1, p.57-64, 1998.

ALEXANDER, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.20, n. 1, p. 20-27, 1998.

ALMEIDA, R.M.R.G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. Continuous clavulanic acid adsorption, *Process Appl Biochem Biotechnol*, v.1, n.3, p.867-880, 2003.

BAGGALEY, K.H.; BROW, A.G.; SCHOFIELD, C.J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams, **Natural Production Report**, p.309-333, 1997.

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A. and MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biochemistry Adv**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008..

BAILEY & OLLIS, *Biochemical Engineering Fundamentals*. Mc.Graw-Hill, 1986.

BAPTISTA-NETO, A.B.; HIRATA, D.B.; CASSIANO FILHO, L.C.M.; BELLÃO, C.; BADINO, A.C.; HOKKA, C.O. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous processes, *Braz J Chem Eng*, v.22, p.557-564, 2005.

BELLÃO, C. Produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em batelada e batelada alimentada. Tese de doutorado, Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP, 2010.

BERLTER, P.A. CUSLLER, E.L.; WEI-SHOU, H. *Bioseparations: downstream processing for biotechnology*, Wiley-interscience, 1988.

BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G; Kinetic studies on clavulanic acid degradation, **Biochem Eng J**, v.23, p. 31-36, 2005.

BIDNENKO, E. Estimation of the state of the bacterial cell wall by fluorescent situ hybridization. **App Enviroment Microbiology**, v. 8, p. 3059-3062, 1998.

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.

BISSON, L. Stuck and sluggish fermentations. *Am J Viticult*. v. 50, n. 1, p. 107-119, 1999.

Box, S. J.; PS 1,563,103 1980

Box, S. J.; US pat. 4,072,569 1978.

BROWN, A.G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J.D.; READING, C., ROLINSON, G.N. Naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. **J Antibiotics**, v.29, p.668-670, 1976.

BUSTAMANTE, M.C.C.; CERRI, M.O. BADINO, A.C.. Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers. **Chem. Eng.Sci.**, v. 90, p. 92-100, 2013.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis and fermentation. In: Vandamme, E.J. **Biotechnol Indust Antibiotics**, New York, Marcel Dekker, v.22, p.225-235, 1984.

CARABINEIRO ,S.A.C.; THAVORN-AMORSRI, T.; PEREIRA, M.F.R., SERP, P., FIGUEIREDO, J.L. Comparison between acitvated carbono, carbono xerogel and carbono nanotubes for the adsorption of the antibiotic ciproflotaxin. **Catalysis Today**, v.186, p. 29-34. 2012.

CARDOSO, J.P. Process for the isolation of a pharmaceutically acceptable alkali metal salt of clavulanic acid United States CIPAN-Companhia Industrial Produtora de Antibioticos, S.A. (Castanheira do Ribatejo, PT) 6417352, 2002..

CERRI, M.O.; BADINO, A. C.. Shear conditions in clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in stirred tank and airlift bioreactors. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 35, p. 977-984, 2012.

CHANG, Y.; HUANG, R-Z.; LIN, S-Y.; CHIU, S-J.; TSAI, J-C. Equilibrium study of immobilized lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite. **Biochem. Eng. J**, v.25, n.1, p1-9. 2006.

CHEN, K.C., LIN, Y.H., TSA, C.M., HSIEH, C.H.; HOUNG, J.Y. Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with glycerol feeding; **Biotechnol Lett**, v.24, p.455-458, 2002.

CHEN, K.C.; LIN, Y.H.; WU, J.Y.; HWANG, S.C.J. Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding, **Enz Microb Technol**, v.32, p.152-157, 2003.

CHUPPA, S.; TSAI, Y.S.; YOON, S.; SHACKLEFORD, S.; ROZALES, C.; BHAT, R.; TSAY, G.; MATANGUIHAN, C.; KONSTANTINOV, K.; NAVEH, D. Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells, **Biotechnol Bioeng**, v.55, p.328-338, 1997.

CIOLA, R., Fundamentos da Catálise, Ed. Moderna, São Paulo, 1981.

COLE, M.; HOWARTH , T. T.; READING, C.; PS 1,508,977 1978.

COLE, M; HOWARTH, T.T; READING, C. Antibiotic from *Streptomyces clavuligerus*. U.S. Pat. 4,529,720. Jul 16, 1985.

COSTA, C.L.L.; BADINO, A.C. Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures and with glycerol pulses under different temperature conditions. **Biochem. Eng. J.**, v.69, p.1-7, 2012.

DEMAIN, A.L. Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. In: Shapiro S, editor. Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 127-34, 1982.

DEMAIN, A.L.; FANG, A. Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes, **Actinomycetoliga**, v.9, p.98-117, 1995.

DUTTA, M.; DUTTA, N.N.; BHATTACHARYA, K.G. Aqueous phase adsorption of beta-lactam antibiotics onto polymeric resins and activated carbon. **Sep .Purif. Technol.**, v.16, p.213-224. 1999.

ELANDER, R.P. Industrial production of β -lactam antibiotics, **Appl Microbiol Biotechnol**, v.61, p.385-392, 2003.

ELSON, S.W.; OLIVER, R.S. Studies on the biosynthesis of clavulanic acid I. Incorporation of 13 C-labeled precursors. **J Antibiot**, v. 31, p.586-592, 1978.

FORTE, M.; MAUGERI, F. Purification of clavulanic acid from fermentation broth using zeolites. **J. Biotechnol**, 131, S191, 2007.

FORTE, M.B.S; ELIAS, E.C.L.; PARTORE, H.O.; MAUGERI-FILHO, F.; RODRIGUES, I. Evaluation of clavulanic acid adsorption in MgAl-layered double hydroxides: Kinetics, equilibrium and thermodynamics studies. **Adsorption Sci Technol.**, v.30, n.1, p.65-80, 2012.

FREEMAN, A., WOODLEY, J. M.; LILLY, M. D. In situ product removal as a tool for bioprocessing, **Bio-Technol** , v.11, n.9, p.1007-1012, 1993.

FURUKAWA, K. ; OHSUYE, K. Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal α -amidating enzyme, **Cytotechnol**, v.26, p.153-164, 1998.

GHOSH, A.C.; BORA, M.M., DUTTA, N.N. Development in liquid membrane separation of beta-lactam antibiotics. **Bioseparation**, v.6, p.91-105, 1996.

GOH. K-H.; LIM, T-T.; DONG, Z. Application of layered double Hydroxides for removal of oxyanions: A review. **Water Res.**, v.42, p.1343-1368, 2008.

GOLDEN, S.A.; CHATTAWAY, F.W. End-product control of acetohydroxyacid synthetase by valine in *Penicillium chrisogenum* Q176 and a high penicillin yielding mutant. **J. Gen. Microbiol.** 59, p111-118, 1969.

GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA-NETO, A.; AZEVEDO, A.G.; BADINO A.C.; HOKKA, C.O. Improvement of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in medium containing soybean derivative; **World J Microbiol Biotechnol**, v.15, n.5, p.623-627, 1999.

GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Studies on rheology and oxygen mass transfer in the clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligeru*, **Braz J Chem Eng**, v.17, p.827-834, 2001.

GUBULIN, J.C. Transferência de massa em sistemas particulados: aspectos gerais do fenômeno de adsorção In: Freire, J T, Gubulin, JC. Tópicos especiais em Sistemas Particulados, São Carlos, v3, cap 5, p203-291. 1990.

HAGINAKA, J.; NAKAWA, T.; UNO, T. Stability of clavulanic acid in queous solutions, **Chem Pharm Bull**, v.29, p.3334-3341, 1981.

HENDRICK, V.; WINNEPENNINCKX, P.; ABDELKAFI, C.; VANDEPUTTE, O.; CHERLET, M.; MARIQUE, T.; RENEMANN, G.; LOA, A.; KRETZMER, G.; WERENNE, J. Increased productivity of recombinant tissular plasminogen activator (t-PA) by butyrate and shift of temperature: a cell cycle phases analysis, **Cytotechnol**, v.36, p.71-83, 2001.

HIRATA, D.B.; OLIVEIRA, J.H.H.L.; LEÃO, K.V.; RODRIGUES, M.I.; FERREIRA, A.G.; GIULIETTI, M.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. Precipitation of clavulanic acid from fermentation broth with potassium 2-ethyl hexanoate salt. **Sep Purif Technol**, v.66, n.3, p. 598–605, 2009.

HOWARTH, T.F.; BROWN, A.G.; KING, T.J. Clavulanic acid. **J Soc Chem Commun**, p.266-267, 1976.

JIA, B.; HIN, Z.H.; LEY, Y.H.; MEI, L.H.; LI, N.H. Improved production of pristinamycin coupled with an adsorbent resin in fermentation by *Streptomyces pristinaespiralis*. **Biotechnol. Lett.**, v.28, n. 22, p. 1811-1815, 2006.

JIANG, S.J.; YANG, Y.Y.; WANG, H.Q. Optimization of clavulanic acid fermentation, **Chinese J Antibiot**, v.29, p.335-338, 2004.

KAUFMANN, H.; MAZUR, X.; FUSSENEGGER, M.; BAILEY, J.E. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells, **Biotechnol Bioeng**, v.63, p.573-579, 1999.

KITA, A.; TONE, H.; ISHIKURA, T. OZAKI, A. Product inhibitory kinetics and effects of product removal on the fermentation. **J. Ferment. Technol.**, v.45, p. 442-451, 1968.

KORBKANDI, H.; DARKHAL P.; HOJATI, Z.; ABEDI, D.; HAMED, J.; MERAJ, M. Pourhosein overproduction of clavulanic acid by UV Mutagenesis of *Streptomyces clavuligerus*. **Iran J. Pharm. Res.**, v. 9, n.2, p. 177-181, 2010.

LALUCE, C.; ABUD, C.; GREENHALF, W.; SANCHES-PERES, M. Thermotolerant behavior in sugar cane syrup fermentation of wild type yeast strains selected under pressures of temperature high sugar and added ethanol, **Biotechnol Lett**, v. 15, p. 609-614, 1993

LECHEVALIER, H.A.; LECHEVALIER, M.P. Introduction to the order Actinomycetales. In: Star, M.P.; Stalp, H., Tryper, H.G.; Balawi, A.; Schlegel, H.G. The prokariotes: A handbook on habitats, isolation and identification of bacterias, New York, Springer-Verlag, 1981.

- LEE, J.C.; PARK, H.R., LEE, H.B., KIM, Y.B. KIM, C.J. Improved production of teicoplanin using adsorbente resina in fermentations. **Lett. App. Microbiol.**, v.37, n.3, p.196-200. 2003.
- LEE, P.C.; HOO, C.C. Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* in palm oil medium, **World J Microbiol Biotechnol**, v.12, p.73-75, 1996.
- LEHNINGER, D.N.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. 3ª ed. Sarvier. São Paulo. 2002.
- LI, R. F.; TOWNSEND, C. A. . Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*, **Metabol Eng**, v.8, n.3, p. 240-252, 2006
- LIRAS, P.; RODRIGUEZ-GARCIA,A. Clavulanic acid, a beta-lactamase inhibitor biosynthesis and molecular genetics. **App. Microbiol. Biotechnol**, v. 54, n.4, p. 467-475, 2000.
- LIVERMORE, E. D. M. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance, **Clinical Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 557-584, 1995.
- LLOYD, D.; MORRELL, S.; CARLSEN, H.; DEGN, H.; JAMES, P.; TOWLNADS, C. (1993) Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*, **Yeast**, v. 9, n. 8, p. 825-863
- LUDWIG, A.; TOMECZKOWSKI, J.; KRETZMER, G. Influence of the temperature on the shear stress sensitivity of adherent BHK 21 cells, **Appl Microb Biotechnol**, v.38, p.323-327, 1992..
- MACKENZIE, A. K.; KERSHAW, N. J.; HERNANDEZ, H.; ROBISON, C. V.; SCHOFIELD, C. J.; ANDERSSON, I. Clavulanic acid dehydrogenase: Structural and biochemical analysis of the final step in the biosynthesis of the beta-lactamase inhibitor clavulanic acid, **Biochemistry**, v. 4, n.6, p. 1523-1533, 2007.
- MARENESI, G.L; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C.O. Utilization vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, **World J Microbiol Biotechnol**, v. 21; p.509-514, 2005.
- MARQUES, D.A.V.; OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; PORTO, A.L.F.; CONVERTI, A. Kinetic and thermodynamic investigation on clavulanic acid formation and degradation during glycerol fermentation by *Streptomyces* DAUFPE 3060, **Enzyme Microb Technol**, v. 45, p.169-173, 2009.
- MARSHALL, V.P.; McWETHY, S.J.; SIROTII, J.M.; CIALDELLA J.L. The effect of neutral resins on the fermentation production of rubradirin. **J.Ind.Microbiol**, v.5, n, 5, p.283-287, 1990.
- MARTIN, J. F., McDANIEL. E. The submerged culture production of the polyene antifungal antibiotics candidin and candihexin. **Dev. Ind. Microbiol.** v.15, p.324-337, 1974.

- MARTIN, J.F.; DEMAIN, A.L. Control of Antibiotic Biosynthesis WHY IS THE BIOSYNTHESIS OF ANTIBIOTICS OFTEN DELAYED UNTIL. **Microbiol. Rev.**, v.44, n.2, p.230-251, 1980.
- MAYER, A.F.; DECKWER, W.D. Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations, **Appl Microbiol Biotechnol**, v.45, p.41-46, 1996.
- OLIVEIRA, J.H.H.L.; GRANATO, A.N.; HIRATA, D.B.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. Ácido clavulânico e cefamicina: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Quim. Nova**, v. 32, n. 8, p.2142-2150, 2009
- ONKEN, U.; WEILAND, P. Control and Optimization. In: REHM, H.J> and REED, G. ed. **Biotechnology**, Weinheim, VHC, v.2, 1985.
- ORTIZ, S.C.A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*, **Enzyme Microb Technol**, v.40, p.1071-1077, 2007.
- OZCENGIZ, G.; DEMAIN, A.L. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. **Biotechnol. Adv.**, v. 31, n.2, p. 287-311, 2013.
- PAGE, M. G. P. β -Lactamase inhibitors; **Drug Resistance Updates** v.3, p.109-125, 2000.
- PARADKAR, A.S.; MOSHER, R.H.; ANDERS, C. Application of gene replacement technology to *Streptomyces clavuligerus* strain development for clavulanic acid production, **Appl Environ Microbiol**, v.67, n.5, p. 2292-2297, 2001.
- READING, C.; COLE, M. Clavulanic acid beta -lactamase inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*, **Antimicrob Agents Ch**, v.11, n.5, p. 852-857, 1977.
- REVILLA, G.; LOPEZ-NIETY ,M.J.; LUENGO, J.M.; MARTIN, J.F. Carbon catabolite repression of penicillin biosintesis by *Penicillin chrysogenum*, **J. Antibiotics**, v.37, p.781-789, 1984.
- RIUS, N.; DEMAIN, A.L. Regulation of lysine ϵ -aminotransferase by carbon source and lack of control by phosphate in *Streptomyces clavuligerus*. **App Microbiol Biotechnol.**, v.48, p.735-737 , 1997.
- RIUS, N.; DEMAIN, A.L. Regulation of lysine e -aminotransferase by carbon source and lack of control by phosphate in *Streptomyces clavuligerus*, **Appl Microb Biotechnol**, v. 48, p.735-738, 2002.
- ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J.F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, **Appl Microb Biotechnol**, v.20, p.318-325, 1984.
- ROSA, J.C.; BAPTISTA NETO, A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*, **Bioproc Biosyst Eng**, v.27, p.99-104, 2005.

ROUBOS, J.A. ; KRABEN, P. ; DE LAAR, W.T.A.M; BABUSKAA, R. ; HEIJEN, J.J. Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch culttivations. **Biotechnol Prog**, v.18, p.451-457, 2002.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A.L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 31, p. 895–906, 2002.

SAUDAGAR, P. S.; N. S. SHALIGRAM. Immobilization of *Streptomyces clavuligerus* on loofah sponge for the production of clavulanic acid, **Bioresour Technol**, v.99, p.2250-2253, 2008.

SCRIBAN, R. Coord. Biotecnologia. Tradução M.E.G.G. Pereira et al. São Paulos, Manole, 1985.

SEETHARAM, G.; SAVILLE, B. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite. **Enzyme and Microb. Technol.**, v.31, n.6, p. 747-753, 2002.

SEIDA, Y.; NAKANO, Y.; NAKAMURA, Y. Rapid removal of dilute lead from water by Pyroaurite-like compound. **Water Res.**, v.35, n.1, p.2341-2346, 2001.

SILVA, C.S.; BOVAROTI, E ;RODRIGUES, M.I.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 32, p. 625-632, 2009

SLEIJKO, L.F. Adsorption Technology: A step-by-step approach to process evaluation and application. Marcel Dekker, 1985.

SOLTERO, F. V., JOHNSON, M.J. Continuous addition of glucose for evaluation of penicillin-producing cultures. **Appl. Microbiol.**, v. 2, p.41-44, 1954.

SRIVASTAVA, A.; ROYCHOUDHURY, P.K. SAHAI, V. Extractive lactic acid fermentation using ion-exchange resin. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 36, p.607-613, 1992.

SYNGH, M.P.; LEIGHTON, M.M.; BARBIERI, L.R.; ROLL, D.M.; URBANCE, S.E.; HOSHAN, L.; McDONALD, L.A. Fermentative production of self-toxic fungal secondary metabolites. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.37, n.7, p.335-340, 2010.

TEODORO, J.C.; BAPTISTA-NETO, A.; ARAUJO, M.L.G.C.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C.. Influence of glycerol and ornithine feeding on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Braz J Chem Eng**, v.27, n.4, p.499-506, 2010.

TEODORO, J.C.; BAPTISTA-NETO, A.; CRUZ-HERNÁNDEZ, I.L.; HOKKA, C.O.; BADINO-JR, A.C. Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol, **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, p.450-455, 2006.

TREYBAL, R.E. Mass Transfers Operation, Mc-Graw Hill, New York, 1980.

VACCARI, G.; GONZALES-VARA, R.Q.; CAMPI, A.L.; DOSI, E.; BRIGIDI, P. MATTEUZZI, E. Fermentative production of L-lactic acid by *Lactobacillus casei* DSM

20011 and product recovery using ion exchange resins. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.40, p.23-27, 1993.

VINIG, L. C. Secondary metabolism In: REHM, H. J.; REED, G. Biotechnology. Weinheim: VCH, v.4, p. 21-29, 1986.

VISSER-LUIRINK, G.; DE LAAT, W.T.A.; KLOP, J.M. Fermentation of clavulanic acid at a controlled level of ammonia; USP 6,991,925, 2006.

WANG, Y.; REN, J.I.E.; DONG, M.; LIANG, D.; XU. A Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*, **Proc. Biochemistry**, v.40, p. 1161-1166, 2004.

WHITE, D. The physiology and biochemistry of prokaryotes, New York, Oxford University Press, p.187-194, 1995.