



Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Instituto de Química de Araraquara

**"Influência de fontes de N na produção de ácido clavulânico por
Streptomyces clavuligerus"**

Leticia Cristina Gutierrez Domingues

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de Araraquara da Universidade
Estadual Paulista, para obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo

Bolsa: CAPES

ARARAQUARA-SP

2007

“A maior revolução de nossos tempos é a descoberta de que ao mudar as atitudes internas de suas mentes, os seres humanos podem mudar aspectos externos de suas vidas”

William James

*Ao meu marido Orlando e
meu filho Felipe, meus
amores.*

RESUMO

O ácido clavulânico (AC) é um composto β -lactâmico que, apesar de não ter atividade antibiótica significativa, é um potente inibidor de β -lactamases produzidas por bactérias resistentes a antibióticos β -lactâmicos. O efeito sinérgico do AC com penicilinas e cefalosporinas resulta no bloqueio do sítio ativo de β -lactamases e, assim, protege aqueles antibióticos conferindo-lhes um maior espectro de ação. O AC é produzido industrialmente por linhagens de *Streptomyces clavuligerus* em meios contendo fontes de N provenientes de matérias primas vegetais de baixo custo que rendem altas concentrações de produto. Porém, estes complexos protéicos, assim como estimulam o crescimento e a produção, também podem conter componentes desconhecidos que afetam negativamente o processo. Neste contexto, a utilização de meios sintéticos contendo aminoácidos (AA) pode ser uma boa alternativa. A maioria dos AA é bem assimilada por *S. clavuligerus* mas apenas alguns favorecem a produção de AC. Asn e Pro, por exemplo, favorecem o crescimento celular, enquanto Orn e Arg são precursores do AC e estimulam sua síntese. Desta forma, meios contendo aminoácidos como fontes de N podem apresentar vantagens significativas, pois, além de direcionar o processo de produção de AC, resultam em caldos mais homogêneos e menos viscosos que promovem melhorias na transferência de massa e calor, nas condições de monitoramento e controle, bem como nos processos de separação, recuperação e purificação do produto. No presente trabalho, utilizou-se a metodologia de planejamento fatorial de experimentos 2^2 , com replicatas do ponto central, para otimizar empiricamente a proporção molar entre glicerol e Orn do meio suplementar sintético de processo contínuo intermitente em frascos agitados agitados (250 rpm, 28°C). A etapa contínua era iniciada após 48 h de batelada em meio contendo glicerol como substrato limitante, extrato protéico de soja Soytone como principal fonte de N e sais (pH 6,8 $\pm$ 0,2). Amostragem e suplementação de meio eram feitas a cada 24 h, mantendo-se o volume reacional constante ($D = 0,005\text{h}^{-1}$). Os planejamentos foram realizados em faixas de concentração (no frasco, a cada adição) de 40,2 a 109,8 mM de glicerol e 0 a 10 mM de Orn. O meio suplementar com a proporção ótima glicerol:Orn ($\sim$ 40:1) forneceu ao meio reacional, a cada adição, 87mM de glicerol e 2,12mM de Orn. Nestas condições obteve-se (472 $\pm$ 18) mg/L de AC em frascos agitados, em 144 h de processo. A mesma proporção foi testada utilizando-se 80% das concentrações originais de glicerol e Orn obtendo-se, em 144 h, $\sim$ 590 mg/L de AC em frascos agitados e 930 mg/L em biorreator tipo tanque agitado e aerado (5 L). Estes resultados corroboraram a eficiência da proporção molar otimizada.

ABSTRACT

The clavulanic acid (CA) is a β – lactam compound that despite not having significant bioactivity, is a potent inhibitor of β – lactamases produced by bacteria resistant to β – lactam antibiotics. The synergistic effect of CA with penicillins and cephalosporins results in blockade of the active site of β – lactamases and protects those antibiotics by giving them a greater spectrum of action. The CA is industrially produced by strains of *Streptomyces clavuligerus* in media containing N source of low-cost vegetable raw materials that yield high concentrations of the product. However these complex media, as well as stimulates growth and the production, may also contain unknown components that affect negatively the process. Then the use of synthetic media containing amino acid (AA) may be a good alternative. Most of AA is well metabolized by *S. clavuligerus* but only some of them induce the production of CA. Asn and Pro, for example, promote cell growth, while Orn and Arg are precursors of CA and stimulate its synthesis. Thus media containing amino acids may be significantly advantageous because, in addition to provide a direction for the process, result in more homogeneous and less viscous broths that promote improvements in heat and mass transfer, monitoring and controlling of the process, as well as in the processes of separation, recovery and purification of the product. In this work, the factorial design 2^2 of experiments methodology was used to optimize empirically the molar ratio between glycerol and Orn of the synthetic supplementary medium of an intermittent continuous process in shaken flasks (250rpm, 28°C). The continuous process started after 48 h of batch process in a medium containing glycerol as limiting substrate, proteic extract from soybean (Soytone) as the main source of N and salts (pH $6,8 \pm 0,2$). Sampling and medium supplementation were accomplished every 24 h, keeping the reactional volume constant ($D = 0,005\text{h}^{-1}$). The investigated concentration ranges (in the flask, at each supplementation) were 40.2 to 109.8 mM to glycerol and 0 to 10 mM of Orn. The best molar proportion of glycerol : Orn ($\sim 40:1$) was obtained with (in the flask, at each addition) 87 mM of glycerol and 2.12 mM of Orn. This supplementation provided (472 ± 18) mg/L CA in shaken flasks, at 144h of process. The same proportion was tested with 80% of the original concentrations of glycerol and Orn, and the production at 144h was ~ 590 mg/L CA in shaken flasks and 930 mg/L in stirred tank bioreactor (5L working volume) operated in the same continuous mode. These results reinforced the efficiency of the optimized molar ratio.

SUMÁRIO

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1) INTRODUÇÃO	1
2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1) Ácido clavulânico	3
2.2) O gênero <i>Streptomyces</i>	4
2.2.1) A espécie <i>Streptomyces clavuligerus</i>	5
2.3) Meios de produção de ácido clavulânico	6
3) MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1) Material	8
3.1.1) Microrganismo	8
3.1.2) Meios de cultura	8
3.2) Equipamentos	11
3.3) Métodos	12
3.3.1) Métodos Analíticos	12
3.3.2) Procedimento Experimental	13
4) RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1) Formulação dos meios de cultura – considerações gerais	15
4.2) Seleção de fontes de N do meio de fermentação principal	15
4.3) Avaliação Qualitativa – seleção de AA	16
4.3.1) Condições de suplementação do meio	16
4.3.2) Avaliação do modo contínuo intermitente em frascos agitados	17
4.3.3) Seleção do AA do meio suplementar	19
4.4) Avaliação Quantitativa – otimização da proporção de glicerol e Orn no meio suplementar	22
4.4.1) Considerações gerais	22
4.4.2) 1º Planejamento Fatorial	23
4.4.3) 2º Planejamento Fatorial	26
4.4.4) Suplementação com altas concentrações de glicerol	31
4.4.5) 3º Planejamento Fatorial	33
4.4.6) Avaliação final da proporção de glicerol e ornitina no meio suplementar	38

4.5) Processo em biorreator convencional	38
5) CONCLUSÕES	41
6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** - Estrutura química do ácido clavulânico 3
- Figura 2.2** - Esquema proposto por Ives e Bushell (1997) para os principais fluxos do carbono na biossíntese de AC por *S. clavuligerus* ATCC 27064; os fluxos em negrito competem com a produção de AC 7
- Figura 3.1** - Etapas de preparo de inóculo (frascos agitados a 250 rpm, 28°C) 13
- Figura 3.2** - Procedimento da fermentação principal em frascos agitados no modo contínuo intermitente (250 rpm, 28°C) 14
- Figura 4.1** - (A) Biomassa ($\square$, $\blacksquare$), glicerol ($\circ$, $\bullet$) e (B) AC ($\star$, $\blackstar$) resultantes de cultivo em batelada em meios contendo somente o aminoácido Asn (símbolos vazios) ou o extrato protéico de soja Soytone (símbolos cheios) como fonte de N (razão C/N = 4) 16
- Figura 4.2** - Biomassa e consumo de glicerol resultantes de cultivo em batelada em meio contendo Soytone como principal fonte de N 17
- Figura 4.3** - Cultivo em frascos agitados com adição de glicerol (4,3 g/L no frasco a cada adição) e um AA (razão mássica C/N = 20 no meio suplementar, $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante): (A) Biomassa e consumo de glicerol em meios suplementados com Leu ($\blacksquare$ e $\bullet$), Arg ($\square$ e $\circ$) Orn ($\boxtimes$ e $\boxtimes$) e Val ($\blacksquare$ e $\bullet$) e (B) AC em meios suplementados com Leu ($\star$), Arg ($\star$), Orn ($\star$) e Val ($\star$) 18
- Figura 4.4** - Cultivo em frascos agitados com adição de glicerol (4,3 g/L no frasco, a cada adição) e um AA (razão mássica C/N = 20 no meio suplementar, $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante): (A) Biomassa e consumo de glicerol em meios suplementados com Leu ($\blacksquare$ e $\bullet$), Arg ($\blacksquare$ e $\bullet$) Orn ($\boxtimes$ e $\boxtimes$), Ile ($\blacksquare$ e $\bullet$), Tre ($\blacksquare$ e $\bullet$), Val ($\blacksquare$ e $\bullet$) e nenhum AA ($\square$ e $\circ$) e (B) AC em meios suplementados com Leu ($\star$), Arg ($\star$), Orn ($\star$), Ile ($\star$), Tre ($\star$), Val ($\star$) e nenhum AA ($\star$). 19
- Figura 4.5** - Relação entre dados de biomassa em meios suplementados com glicerol e Leu ($\blacktriangle$), Arg ($\blacktriangle$), Orn ($\boxtimes$), Ile ($\blacktriangle$), Tre ($\blacktriangle$) ou Val ($\blacktriangle$) e biomassa resultante da condição controle (meio suplementar contendo somente glicerol) ($\overline{}$) 20
- Figura 4.6** - Produção específica de AC em meios suplementados com glicerol e Leu ($\blacklozenge$), Arg ($\blacklozenge$), Orn ($\boxtimes$), Ile ($\blacklozenge$), Tre ($\blacklozenge$), Val ($\blacklozenge$) ou nenhum AA (condição controle) ($\diamond$) 21
- Figura 4.7** - Cultivo em frascos agitados com adição de glicerol e 3 mM de AA (no frasco, a cada adição) ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante): (A) Biomassa e glicerol em

meios suplementados com Orn (⊠ e ⊞), Arg (■ e ●) e nenhum AA (□ e ○) e (B) AC em meios suplementados com Orn (✱), Arg (★) e nenhum AA (condição controle) (☆)

22

Figura 4.8 - 1º Planejamento Fatorial 2^2 , com duplicata do ponto central - condições de concentração de glicerol e Orn do meio suplementar de processo de produção de AC em frascos agitados ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante)

23

Figura 4.9 - 1º Planejamento Fatorial 2^2 - Dados de (A) Biomassa e consumo de glicerol e (B) AC obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante) com glicerol entre 40,2 e 53,3 mM e Orn entre 0,9 e 5,1 mM (no frasco, a cada adição)

24

Figura 4.10 - 1º Planejamento Fatorial 2^2 - Dados de produção específica de AC obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante) com glicerol entre 40,2 e 53,3 mM e Orn entre 0,9 e 5,1 mM (no frasco, a cada adição)

25

Figura 4.11 - 1º Planejamento Experimental - Superfície de resposta ajustada - (A) tri e (B) bidimensional - e dados experimentais de concentração de AC (mg/L) obtidos em 144 horas de processo *versus* concentrações de glicerol e Orn (no frasco a cada adição, em unidades originais); coeficiente de determinação 0,99311, a 95% de grau de confiança.

26

Figura 4.12 - 1º Planejamento Experimental - Valores previstos *versus* observados, de produção de AC (mg/L) em 144 horas de processo

26

Figura 4.13 - 2º Planejamento Fatorial 2^2 , com duplicata do ponto central - condições de concentração de glicerol e Orn do meio suplementar de processo de produção de AC em frascos agitados ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante)

27

Figura 4.14 - 2º Planejamento Fatorial 2^2 - Dados de (A) Biomassa e consumo de glicerol e (B) AC obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante) com glicerol entre 46,7 e 70,7 mM e Orn entre 3 e 10 mM (no frasco, a cada adição)

28

Figura 4.15 - 2º Planejamento Fatorial 2^2 - Dados de produção específica de AC obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante) com glicerol entre 46,7 e 70,7 mM e Orn entre 3 e 10 mM (no frasco, a cada adição)

29

Figura 4.16 - 2º Planejamento Experimental - Superfície de resposta ajustada - (A) tri e (B) bidimensional - e dados experimentais de concentração de AC (mg/L) obtidos em 144 horas de processo *versus* concentrações de glicerol e Orn (no frasco a cada adição, em unidades originais); coeficiente de determinação 0,99941, a 95% de grau de confiança

30

Figura 4.17 - 2º Planejamento Experimental - Valores de produção de AC (mg/L) em 144 horas de processo, previstos *versus* observados

30

Figura 4.18 - Consumo de glicerol resultante em cultivo em frascos agitados com suplementação de (concentrações resultantes no frasco a cada adição): (A) somente glicerol (☆) 98 mM, (□) 130 mM, (△) 163 mM; (B) 3 mM de Orn e glicerol (★) 98 mM, (■) 130 mM, (▲) 163 mM. Condições de suplementação: $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante

31

Figura 4.19 - Biomassa resultante em cultivo em frascos agitados com suplementação de (concentrações resultantes no frasco a cada adição): (A) somente glicerol (☆) 98 mM, (□) 130 mM, (△) 163 mM; (B) 3 mM de Orn e glicerol (★) 98 mM, (■) 130 mM, (▲) 163 mM. Condições de suplementação: $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante

32

Figura 4.20 - AC resultante em cultivo em frascos agitados com suplementação de (concentrações resultantes no frasco a cada adição): (A) somente glicerol (☆) 98 mM, (□) 130 mM, (△) 163 mM; (B) 3 mM de Orn e glicerol (★) 98 mM, (■) 130 mM, (▲) 163 mM. Condições de suplementação: $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante

32

Figura 4.21 - 3º Planejamento Fatorial 2^2 com pontos adicionais (configuração estrela) e quatro replicatas do ponto central - condições de concentração de glicerol e Orn do meio suplementar de processo de produção de AC em frascos agitados ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante)

34

Figura 4.22 - 3º Planejamento Fatorial 2^2 – Condições-padrão - Dados de (A) Biomassa e consumo de glicerol e (B) AC obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante) com glicerol entre 70,7 e 103,3 mM e Orn entre 0,62 e 3,62 mM (no frasco, a cada adição)

35

Figura 4.23 - 3º Planejamento Fatorial 2^2 – Condições adicionais - Dados de (A) Biomassa e consumo de glicerol e (B) AC obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante) com glicerol entre 64,1 e 109,8 mM e Orn entre 0 e 4,24 mM (no frasco, a cada adição)

36

Figura 4.24 - 3º Planejamento Experimental - Superfície de resposta ajustada - (A) tri e (B) bidimensional - e dados experimentais de concentração de AC (mg/L) obtidos em 144 horas de processo *versus* concentrações de glicerol e Orn (no frasco a cada adição, em unidades originais); coeficiente de determinação 0,90189 a 95% de grau de confiança

37

Figura 4.25 - 3º Planejamento Experimental - Valores de produção de AC (mg/L) em 144 horas de processo, previstos *versus* observados

37

Figura 4.26 - Dados de (A) Biomassa (□, ■) e (B) AC (☆, ★) obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante, proporção molar glicerol:Orn $\cong 40$) com glicerol e Orn: 70,7 mM e 1,72 mM (símbolos vazios) e 87 mM e 2,12 mM (símbolos cheios) (concentrações no frasco, a cada adição)

38

Figura 4.27 - Dados de biomassa (□, ■) e consumo de glicerol (△, ▲) obtidos em cultivos em frascos agitados (símbolos vazios) e em biorreator tipo tanque agitado e aerado (símbolos cheios), suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante, proporção molar glicerol:Orn $\cong 40$) com 70,7 mM de glicerol e 1,72 mM de Orn (concentrações no meio reacional, a cada 24 horas)

39

Figura 4.28 - Dados de AC em cultivos em frascos agitados (☆) e em biorreator tipo tanque agitado e aerado (★), suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante, proporção molar glicerol:Orn $\cong 40$) com 70,7 mM de glicerol e 1,72 mM de Orn (concentrações no meio reacional, a cada 24 horas)

40

Figura 4.29 - Dados de produção específica de AC em cultivos em frascos agitados (◇) e em biorreator tipo tanque agitado e aerado (◆), suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante, proporção molar glicerol:Orn $\cong 40$) com 70,7 mM de glicerol e 1,72 mM de Orn (concentrações no meio reacional, a cada adição)

40

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Meio de reativação de <i>S. clavuligerus</i> indicado pela ATCC (meio ISP1), adicionado de extrato de malte (Kieser <i>et al.</i> 2000)	8
Tabela 3.2 - Meio de preparo do inóculo principal (MI)	9
Tabela 3.3 - Meio da fermentação principal (MFP)	9
Tabela 3.4 - Meios suplementares ^(*) da etapa de avaliação qualitativa (proporção mássica constante C/N = 20)	10
Tabela 3.5 - 1º Planejamento Fatorial 2 ² , com duplicata do ponto central – condições de concentração de glicerol e Orn no meio suplementar ^(*) de processo de produção de AC em frascos agitados ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante)	10
Tabela 3.6 - 2º Planejamento Fatorial 2 ² , com duplicata do ponto central – condições de concentração de glicerol e Orn no meio suplementar ^(*) de processo de produção de AC em frascos agitados ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante)	10
Tabela 3.7 - Meios de suplementação ^(*) contendo altas concentrações de glicerol	11
Tabela 3.8 - 3º Planejamento Fatorial 2 ² , com pontos adicionais e quadruplicata do ponto central – condições de concentração de glicerol e Orn no meio suplementar de processo de produção de AC em frascos agitados ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante)	11

1) INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, os antibióticos têm sido os agentes mais eficazes contra doenças infecciosas causadas por bactérias. Atualmente, os principais grupos de antibióticos aplicados clinicamente são os β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), aminoglicosídeos e tetraciclinas. A crescente resistência bacteriana a estes agentes, decorrente do uso contínuo e indiscriminado dos antibióticos e da evolução natural e defesa dos organismos às condições ambientais, tem motivado a busca por agentes terapêuticos mais eficazes. O principal mecanismo atribuído à resistência bacteriana a antibióticos β -lactâmicos é a ação de β -lactamases, enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico daqueles agentes tornando-os ineficazes no tratamento de doenças (Madigan et al., 1997; Elander, 2003; Brakhage et al., 2005).

Ao longo dos últimos 50 anos, o combate às infecções bacterianas, cada vez mais agressivas, tem gerado antibióticos semi-sintéticos mais potentes derivados dos antibióticos naturais e a descoberta de novos compostos, como nocardicina, tienamicina e ácido clavulânico (AC), com destaque para este último que, embora não tenha atividade antibiótica significativa, é um potente inibidor de β -lactamases. O efeito sinérgico do AC com penicilinas e cefalosporinas resulta no bloqueio do sítio ativo de β -lactamases e, assim, na proteção daqueles agentes, conferindo-lhes um maior espectro de ação (Baggaley et al., 1997; Townsend, 2002; Bersanetti et al., 2005).

O AC é produzido industrialmente através de cultivos submersos de linhagens de *Streptomyces clavuligerus* em reatores convencionais tipo tanque agitado e aerado, utilizando-se meios de cultura complexos contendo fontes de carbono e energia e fonte de N proveniente de matéria prima vegetal de baixo custo. Embora o emprego de fontes complexas resulte em concentrações mais altas de produto, a utilização de meios solúveis (sintéticos ou semi-sintéticos) oferece vantagens muito significativas ao processo como um todo, como a obtenção de caldos mais homogêneos e menos viscosos, que promovem melhorias com relação a transferência de massa e calor, condições de monitoramento e controle, bem como simplificação de processos de separação, recuperação e purificação do produto (Elander, 2003; Zhang e Greasham, 1999).

É importante destacar que os meios solúveis descritos na literatura para o cultivo de *S. clavuligerus* na produção de AC referem-se essencialmente a estudos visando a elucidação da rota biossintética do composto e/ou sua regulação metabólica, não havendo praticamente dados disponíveis relativos ao melhoramento da produção utilizando-se este tipo de meios (Romero et al, 1984; Valentine et al, 1993; Ives e Bushell 1997; Minãmbres

et al 1991). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral formular um meio suplementar sintético para utilização em processo contínuo de produção de AC por *S. clavuligerus* 27064, contendo uma proporção molar ótima de glicerol e um AA.

Para atingir o objetivo proposto, foram cumpridos os seguintes objetivos específicos:

(I) Identificar o AA mais adequado dentre os integrantes do principal fluxo de átomos de carbono da rota biossintética de AC para compor, juntamente com o glicerol, o meio suplementar sintético do processo contínuo.

(II) Buscar empiricamente a proporção molar ótima de glicerol e o AA selecionado, através de metodologia de planejamento experimental.

(III) Avaliar o meio suplementar otimizado em processo contínuo intermitente conduzido em maior escala (biorreator tipo tanque agitado e aerado de 5 L de volume útil).

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) Ácido clavulânico

O uso contínuo e indiscriminado de antibióticos, desde suas primeiras aplicações clínicas, somado à evolução natural e defesa dos organismos às condições ambientais, tem sido a principal causa da crescente resistência bacteriana àqueles agentes. A contínua exposição de bactérias patogênicas a penicilinas e cefalosporinas resultou na capacidade bacteriana de produzir β -lactamases que inativam aqueles antibióticos através da hidrólise do anel β -lactâmico. Segundo Rang e Dale (1997), a incidência de estafilococos resistentes a penicilinas tem aumentado muito rápido e, atualmente, 80 a 90% de *Staphylococcus* isolados a partir de cepas hospitalares produzem β -lactamases.

Para contornar este problema, foram desenvolvidas penicilinas semi-sintéticas (metecilina, cloxacilina e flucloxacilina) menos sensíveis à hidrólise pelas β -lactamases produzidas por estafilococos. De forma semelhante foram desenvolvidas as cefalosporinas de 1ª geração após a descoberta da inativação β -lactâmica por microrganismos resistentes. Desde então, a produção e o mecanismo de ação de β -lactamases têm sido intensivamente estudados. Durante a década de 1960 muitos trabalhos foram desenvolvidos na expectativa de descobrir compostos β -lactâmicos estáveis à ação das β -lactamase produzidas não só por *Staphylococcus*, mas também por bactérias patogênicas Gram negativas.

No caldo de cultura de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 foi observado um metabólito com pronunciada ação inibitória de β -lactamases. Este composto, denominado ácido clavulânico (AC) (Figura 2.1), foi isolado pela primeira vez em 1976, por pesquisadores da Beecham Pharmaceutical Research Division, do caldo fermentativo daquela linhagem. O inibidor contém um anel β -lactâmico em sua estrutura e apresenta baixa atividade antibacteriana, sendo um inibidor de β -lactamases produzidas por bacilos Gram negativos e estafilococos (Brown et al, 1976; Butterworth, 1984).

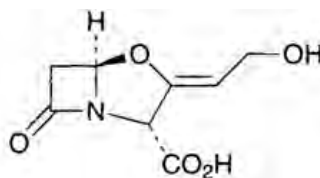


Figura 2.1 – Estrutura química do ácido clavulânico

O AC é termolábil (Eckers et al, 1996) e altamente susceptível à degradação em soluções aquosas em valores de pH menores que 4 e maiores que 8 (Bersanetti et al, 2000).

O efeito sinérgico do AC com penicilinas e cefalosporinas protege estes antibióticos conferindo-lhes um maior espectro de ação. A amoxicilina associada ao AC é a droga preferencial contra *Neisseria gonorrhoea* (cocos Gram negativos causadores da gonorréia) e contra muitas bactérias do gênero *Staphylococcus* produtores de β -lactamase (cocos Gram negativos causadores de feridas e furúnculos). É também muito ativo contra *Pseudomonas* e algumas espécies de *Klebsiella* (Rang e Dale, 1997).

Atualmente, o exemplo mais relevante da combinação de AC com antibióticos susceptíveis a β -lactamases é o fármaco Augmentin™ (no Brasil, Clavulin™), da GlaxoSmithKline. Sua formulação consiste da penicilina semi-sintética amoxicilina e do AC na forma de sal potássico (clavulanato de potássio), na proporção 4:1. Em nível mundial, Augmentin foi a segunda droga mais vendida da SmithKlineBeecham em 1999, perfazendo um total de 1,8 bilhões de dólares (Chemical Market Reporter Website, 2000). Após a fusão SmithKlineBeecham - Glaxo, em 2001, as vendas de Augmentin aumentaram cerca de 15% com relação ao ano 2000. Atualmente, este medicamento representa cerca de 50% das vendas de antibióticos da empresa e foi recentemente aprimorado através de nova formulação (Augmentin XR™, setembro 2002) (GlaxoSmithKline plc Annual Report, 2004, <http://www.gsk.com>).

2.2) O gênero *Streptomyces*

Podemos encontrar muitas informações sobre microrganismos do gênero *Streptomyces* no Manual Bergey's de Bacteriologia (Locci, 1989). São organismos amplamente distribuídos pelo ambiente terrestre e aquático. Desenvolvem-se na forma de micélio ramificado, com hifas vegetativas de 0,5 a 2,0 μ m de diâmetro. Ao atingir a maturidade, ocorre septação das hifas e formação de cadeias de esporos. Solos e ferragens são as maiores reservas destes organismos. No solo, encontram-se grande quantidade de artrósporos que germinam em presença de nutrientes exógenos, formando rapidamente micélios, os quais voltam à forma de esporos com exaustão dos nutrientes. A produção de gosto e odor de terra em ambiente onde se encontra, é atribuída a este grupo de microrganismos.

São microrganismos estritamente aeróbios, Gram positivos, quimiorganotróficos e não fastidiosos, cuja maioria cresce em pH em torno da neutralidade e temperatura de 30°C. Para sua nutrição e crescimento necessitam apenas de uma fonte de C apropriada, nitrogênio inorgânico e sais minerais. As fontes de carbono mais utilizadas pelas bactérias do gênero são a celobiose, glicose, glicerol, trealose e manose; as fontes de N incluem

amônio, arginina, asparagina e nitratos. Embora o crescimento ocorra em simples meios de cultura sintéticos, a produção de esporos é normalmente melhor naqueles com grande quantidade de fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais (meios de cultura complexos).

Muitos são os critérios utilizados para a classificação de *Streptomyces*, estando os principais relacionados à morfologia das cadeias de esporos, cor da massa de esporos, pigmentação do substrato micelial, pigmentos difusíveis, atividade antimicrobiana, atividade enzimática, resistência a antibióticos, uso das fontes de carbono e nitrogênio. Poucas espécies são patogênicas ao homem e animais.

Quanto à estabilidade genética, bactérias do gênero *Streptomyces* exibem uma alta frequência de rearranjos genômicos com potencial para afetar várias centenas até milhares de quilobases. Em meio sólido as colônias de *Streptomyces* são altamente diferenciadas, consistem em micélio vegetativo com crescimento radial, micélio aéreo e esporos. Essa diferenciação morfológica normalmente é associada com a diferenciação fisiológica.

Cada compartimento de hifa de *Streptomyces* contém diversas cópias do cromossomo, enquanto o esporo contém apenas uma. Os diferentes compartimentos das hifas comunicam-se por sinais intra e extracelulares que mudam durante as etapas de diferenciação. Este complexo ciclo de vida está associado com a produção de uma ampla variedade de metabólitos secundários, dos quais os antibióticos são de grande interesse econômico. O DNA cromossomal de *Streptomyces* é susceptível a muitas deleções incluindo genes geneticamente instáveis. Muitos desses genes são associados com o metabolismo secundário. Mais de 25% do genoma pode ser deletado sem afetar a sobrevivência do correspondente mutante e um estado semelhante ao mutante pode desenvolver-se quando as condições tornam-se limitantes durante o ciclo de vida, levando a uma modulação da instabilidade genética (Dary et al., 1999).

2.2.1) A espécie *Streptomyces clavuligerus*

Streptomyces clavuligerus é uma bactéria filamentosa do grupo dos actinomicetos, já conhecida anteriormente como produtora de outros compostos β -lactâmicos relacionados à cefalosporina C, tais como os antibióticos cefamicina C, penicilina N e deacetoxicefalosporina C (Nagarajan et al., 1971; Liras e Martin, 2005). Posteriormente outros actinomicetos foram identificados como produtores do AC, como *Streptomyces jumonjinensis* e *Streptomyces katsurahamanus* (Foulstone e Reading, 1982; Prues e Kellett, 1983; Butterworth, 1984; Brown et al, 1984; Beechman Group, 1985).

Normalmente os microrganismos do gênero *Streptomyces* utilizam diversas fontes de carbono, no entanto *S. clavuligerus* é uma exceção, pois apresenta importantes limitações metabólicas, crescendo de maneira eficiente em meio de cultura contendo glicerol ou maltose como únicas fontes de carbono.

2.3) Meios de produção de ácido clavulânico

Os meios de cultivo de *S. clavuligerus* mencionados em trabalhos disponíveis na literatura para a produção de AC subdividem-se em sintéticos e complexos. Ambos os tipos geralmente contém glicerol como fonte de carbono e energia, suplementados com fosfato inorgânico e outros sais minerais, entre macro e micro nutrientes. As fontes de nitrogênio consistem de sais de amônio ou compostos orgânicos, com destaque para aminoácidos simples ou aqueles provenientes da peptona e da farinha de soja ou seu extrato (Butterworth, 1984; Romero et al., 1984, 1986; Lee e Ho, 1996; De Laat e Krabben, 2000; Kim et al., 2001; Chen et al., 2002).

Basicamente, os meios sintéticos citados na literatura têm sido empregados em estudos visando elucidar a complexa rota biossintética do AC, da qual já foram identificados vários compostos intermediários e enzimas, e em trabalhos sobre a regulação da biossíntese de AC em *S. clavuligerus* por fontes de carbono, nitrogênio, fosfato, enxôfre e cofatores.

Certos AA, como asparagina ou prolina, são bem adequados para o crescimento celular de *S. clavuligerus*, enquanto outros participam diretamente na rota biossintética de compostos β -lactâmicos produzidos por este microrganismo (Romero et al., 1984, 1986; DeLaat e Krabben, 2000; Kieser et al., 2000). Romero et al. (1986) verificaram que ornitina e arginina (em concentrações de 5 a 20 mM no meio), mas não ácido glutâmico ou prolina, exercem um efeito estimulatório na síntese de AC.

A origem dos átomos da molécula de AC tem sido investigada através da adição de possíveis precursores durante a fermentação (Gutman et al, 1985 ; Bycroft et al, 1988; Valentine et al, 1993). Ives e Bushell (1997) investigaram a influência de metabólitos intermediários na biossíntese de AC por *S. clavuligerus* cultivado em quimiostato em meio contendo cloreto de amônia. Estes autores verificaram que a alimentação individual de Leu, Ile, Ser e Val durante a fase estacionária, mantendo-se uma concentração de 10 mM de AA no meio, resultou em aumento da velocidade de produção que, sugeriram os pesquisadores, foi favorecida pela diminuição do desvio de átomos de carbono do piruvato para a síntese daqueles AA (fluxo anaplerótico). A Figura 2.2 reproduz o esquema postulado pelos autores para a biossíntese de AC com base nos principais fluxos do

carbono, onde as setas em **negrito** indicam os fluxos que competem com a síntese do produto e são, conforme sugerem os autores, influenciados pela alimentação dos AA.

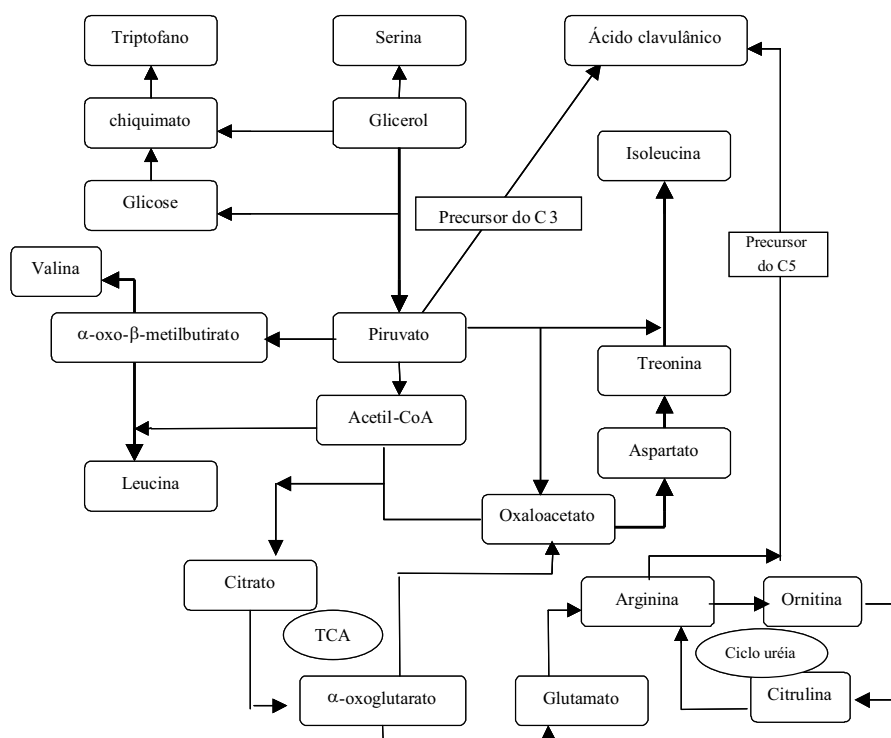


Figura 2.2 - Esquema proposto por Ives e Bushell (1997) para os principais fluxos do carbono na biossíntese de AC por *S. clavuligerus* ATCC 27064; os fluxos em **negrito** competem com a produção de AC

Por outro lado, Miñambres et al. (1991) verificaram que a Ser reprime o metabolismo do glicerol em *S. clavuligerus* e a adição de 10 mM daquele AA no meio de cultura inibiu o crescimento daquele microrganismo, mas não o de outras espécies de *Streptomyces*.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Material

3.1.1) Microrganismo

Streptomyces clavuligerus ATCC 27064, obtida da American Type Culture Collection na forma de micélios liofilizados. Após reidratação das células liofilizadas e reativação em meio apropriado (Tabela 3.1), alíquotas da suspensão micelial (~3,5 mL, 3,0 g/L) foram distribuídas em criotubos e conservadas a -70°C em solução de glicerol a 20% v/v.

3.1.2) Meios de Cultura

(a) Meio de reativação (MR)

Micélios de *S. clavuligerus*, conservados a -70°C em solução crioprotetora (glicerol 20% v/v), foram reativados no meio de reativação (MR) descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Meio de reativação de *S. clavuligerus* indicado pela ATCC (meio ISP1), adicionado de extrato de malte (Kieser *et al.* 2000)

Componentes	Concentração (g/L)
Triptona	5,0
extrato de levedura	3,0
extrato de malte	10,0
MOPS (tampão biológico)	21,0
pH	$6,8 \pm 0,1$

(b) Meio de preparo do inóculo (MI)

O meio utilizado para o preparo do inóculo principal está descrito na Tabela 3.2. Utilizou-se Asn (7,8 g/L) como única fonte de N do meio de preparo de inóculo, somente na etapa de seleção da fonte de N do meio de fermentação principal (item 4.2).

Tabela 3.2 - Meio de preparo do inóculo principal (MI)

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	15,0
Extrato protéico de soja Soytone	15,5
Extrato de levedura	1,0
Extrato de malte	10,0
Solução de sais (*)	1,0 mL/L
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75
MOPS	21,0
pH	6,8 ± 0,1

(*) Solução de sais (em g/L): MnCl₂·4H₂O (1,0); FeSO₄·7H₂O (1,0); ZnSO₄·7H₂O (1,0)

(c) Meio-base para a fermentação principal (MFP)

O meio da fermentação principal está descrito na Tabela 3.3 e foi utilizado em todos os experimentos. Utilizou-se Asn (7,8 g/L) como única fonte de N, no lugar do extrato protéico de soja Soytone, somente na etapa de seleção da fonte de N do meio de fermentação principal (item 4.2).

Tabela 3.3 - Meio da fermentação principal (MFP)

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	15,0
Extrato protéico de soja Soytone	15,5
Extrato de levedura	1,0
Solução de sais (*)	1,0 mL/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,02
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,75
KH ₂ PO ₄	0,63
MOPS	21,0
pH	6,8 ± 0,1

(*) Solução de sais (em g/L): MnCl₂·4H₂O (1,0); FeSO₄·7H₂O (1,0); ZnSO₄·7H₂O (1,0)

(d) Meio suplementar (MS)

Nas Tabelas 3.4 a 3.8 estão listadas as composições de todos os meios suplementares utilizados.

Tabela 3.4 - Meios suplementares^(*) da etapa de avaliação qualitativa (proporção mássica constante C/N = 20)

Aminoácido	Concentração (g/L)						
Leu	–	6,6	–	–	–	–	–
Arg	–	–	2,2	–	–	–	–
Orn	–	–	–	4,3	–	–	–
Ile	–	–	–	–	6,6	–	–
Tre	–	–	–	–	–	6,0	–
Val	–	–	–	–	–	–	5,9

^(*) Todos os meios continham glicerol (36,8 g/L), MOPS (21 g/L), 10% v/v água de torneira; pH 6,8±0,2

Tabela 3.5 - 1º Planejamento Fatorial 2², com duplicata do ponto central – condições de concentração de glicerol e Orn no meio suplementar^(*) de processo de produção de AC em frascos agitados ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante)

Variável codificada		Variável em unidades originais (concentração no frasco, a cada adição)	
Glicerol (x ₁)	Orn (x ₂)	C _{Glicerol} (mM)	C _{Orn} (mM)
–1	–1	40,2	0,9
+1	–1	53,3	0,9
–1	+1	40,2	5,1
+1	+1	53,3	5,1
0	0	46,7	3,0

^(*) Todos os meios continham MOPS (21 g/L), 10% v/v água de torneira; pH 6,8±0,2

Tabela 3.6 - 2º Planejamento Fatorial 2², com duplicata do ponto central – condições de concentração de glicerol e Orn no meio suplementar^(*) de processo de produção de AC em frascos agitados ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante)

Variável codificada		Variável em unidades originais (concentração no frasco, a cada adição)	
Glicerol (x ₁)	Orn (x ₂)	C _{Glicerol} (mM)	C _{Orn} (mM)
–1	–1	46,7	3,0
+1	–1	70,7	3,0
–1	+1	46,7	10,0
+1	+1	70,7	10,0
0	0	58,7	6,5

^(*) Todos os meios continham MOPS (21 g/L), 10% v/v água de torneira; pH 6,8±0,2

Tabela 3.7 - Meios de suplementação^(*) contendo altas concentrações de glicerol

Glicerol (mM) (concentração no frasco, a cada adição)			Ornitina (mM)
98	130	163	3
98	130	163	– (**)

(*) Todos os meios continham MOPS (21 g/L), 10% v/v água de torneira; pH 6,8±0,2

(**) Condições – controle

Tabela 3.8 - 3^o Planejamento Fatorial 2², com pontos adicionais e quadruplicata do ponto central – condições de concentração de glicerol e Orn no meio suplementar de processo de produção de AC em frascos agitados ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante)

Variável codificada		Variáveis em unidades originais (concentração no frasco a cada adição)	
Glicerol (x ₁)	Ornitina (x ₂)	C _{Glicerol} (mM)	C _{Orn} (mM)
–1	–1	70,7	0,62
+1	–1	103,3	0,62
–1	+1	70,7	3,62
+1	+1	103,3	3,62
$-\sqrt{2}$	0	64,1	2,12
$+\sqrt{2}$	0	109,8	2,12
0	$-\sqrt{2}$	87,0	0
0	$+\sqrt{2}$	87,0	4,24
0	0	87,0	2,12

(*) Todos os meios continham 21 g/L de MOPS, 10% v/v água de torneira e pH 6,8

3.2) Equipamentos

Equipamentos para as fermentações:

- Mesas rotatórias-incubadoras (New Brunswick), para os experimentos em frascos agitados, providas de controle de agitação e de temperatura.
- Biorreator convencional

Para os experimentos em fermentador convencional tipo tanque agitado e aerado, será utilizado o fermentador modelo Bioflo 2000, da New Brunswick, de 5 litros de volume útil, equipado com sistemas de monitoramento e/ou controle e de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, velocidade de agitação.

Equipamentos e aparelhos para procedimentos gerais e analíticos:

- Espectrofotômetro (UV e luz visível)
- Câmara de fluxo laminar, balanças, estufas, pHmetros, autoclaves, bombas peristálticas, centrífuga refrigerada, banhos termostatizados.
- Microcomputadores para o tratamento dos dados experimentais

3.3) Métodos

3.3.1) Métodos analíticos

(a) Concentração celular

A amostra foi filtrada à vácuo em membranas Millipore de 45 mm de diâmetro, porosidade 0,45 μm , previamente pesadas. O material celular depositado na membrana era seco a 105°C por 18 a 24 horas e pesado, após chegar em temperatura ambiente em recipiente dessecador. A biomassa era expressa em termos de massa seca de células (g de células/L de meio de cultura).

(b) Concentração de glicerol

O método utilizado foi desenvolvido por Lambert e Neish (1950). Neste método, o glicerol reage rapidamente com o ácido periódico, sendo oxidado quantitativamente a formaldeído. O curto período de tempo de reação (5 minutos) minimiza a oxidação da glicose, caso esteja presente no meio de cultura, evitando assim, interferências na avaliação do glicerol. O iodato e o periodato são reduzidos a iodo por excesso de arsenito de sódio. O formaldeído é, então, determinado diretamente em espectrofotômetro a $\lambda = 570 \text{ nm}$. A precisão do método é de aproximadamente $\pm 2\%$ em uma faixa de 10 a 40 mg/L de glicerol na amostra. Em nossos laboratórios observou-se uma boa precisão em medidas com soluções contendo até 100 mg/L de glicerol.

(c) Concentração de AC

O método utilizado foi proposto por Bird et al. (1982), que baseia-se na derivatização prévia de solução contendo AC (2 a 50 mg/L) com imidazol (60 g/L) a 30°C por 30 minutos. Depois de resfriada a solução em banho termostatizado a 20°C, determina-se o produto da reação (*1-(4-aza-8-hydroxy-6-oxo) oct-2-en-1-oylimidazol*) através de leitura

em espectrofotômetro UV, a 312 nm. Este método é específico para AC na presença de produtos de degradação. Derivados do AC e outros compostos contendo o núcleo clavam respondem bem às condições de análise, mas penicilinas praticamente não são detectadas pelo método.

3.3.2) Procedimento Experimental

O inóculo do meio de produção foi obtido através de duas pré-culturas subseqüentes de 24 horas cada uma (Figura 3.1). A fermentação principal consistia de uma batelada inicial de 48 horas em 45 mL de MFP e, a partir deste período, suplementação do meio a cada 24 horas, por 72 horas, perfazendo um total de 144 horas de processo (Figura 3.2). As amostras coletadas foram submetidas a análises de pH, concentração de células (biomassa), de glicerol (substrato limitante) e de AC (produto). Todos os experimentos foram realizados em frascos agitados (250 rpm) em mesa incubadora rotativa com controle de temperatura (28°C). O meio mais adequado foi testado em biorreator de bancada de 5 L de volume útil, tipo tanque agitado e aerado.

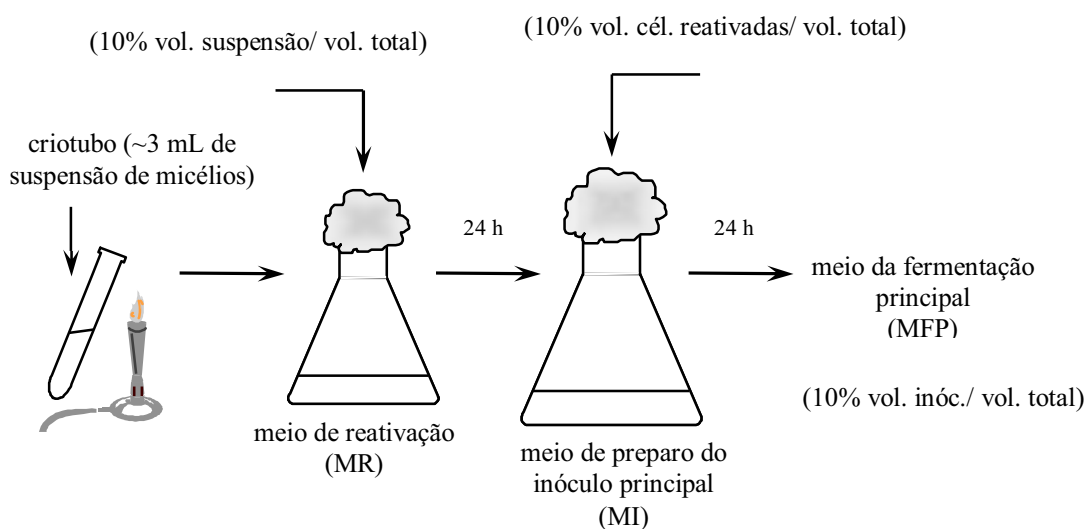
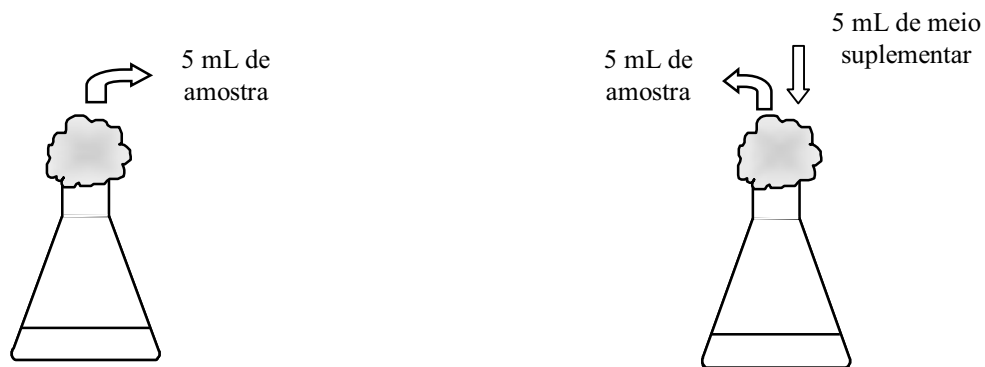


Figura 3.1 - Etapas de preparo de inóculo (frascos agitados a 250 rpm e mantidos a 28°C)



Até 48 horas de processo, operação em batelada:

- volume inicial = 45 mL de MFP
- amostragem em 24 horas;

A partir de 48 horas, início de suplementação, a uma taxa de diluição média $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$:

- amostragem, seguida de suplementação de meio a cada 24 horas;
- volume reacional constante = 40 mL

Figura 3.2 - Procedimento da fermentação principal em frascos agitados no modo contínuo intermitente (frascos Erlenmeyer de volume nominal 500 mL, agitados a 250 rpm e mantidos a 28°C)

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Formulação dos meios de cultura - considerações gerais

A formulação adequada do meio da fermentação principal deve favorecer o processo como um todo (bons crescimento e produção), uma vez que os cultivos em meio sintético para a obtenção de metabólitos secundários são normalmente caracterizados pela relativa dissociação entre as fases de crescimento (trofofase) e de síntese de produto (idiofase).

Normalmente, convém utilizar os mesmos componentes essenciais nos meios de preparo de inóculo e da fermentação principal, de forma a minimizar a fase lag durante aquela última. As composições dos meios utilizados no presente trabalho foram elaboradas levando-se em consideração as seguintes informações da literatura e proposições:

- ⇒ o glicerol é a fonte de C e energia mais adequada para o cultivo de *S. clavuligerus* (Locci, 1989; Kieser et al., 2000), porém, concentrações acima de 165 mM no meio fermentativo podem inibir a produção de AC (Romero et al., 1984);
- ⇒ o valor médio de rendimento celular do microrganismo cultivado em frascos agitados em meios contendo glicerol é $Y_{X/S} = 0,5 \pm 0,1$ (Gouveia et al, 2001; Trovatti et al., 2006);
- ⇒ razão mássica C/N = 4 no meio, para a trofofase (Bushell e Fryday, 1983; Bailey e Ollis, 1986);
- ⇒ fontes orgânicas de N (AA, farinhas e/ou extratos protéicos vegetais) são mais adequadas ao desenvolvimento celular do que as inorgânicas (sais de amônio) (Kieser et al., 2000; Trovatti, 2001), sendo que concentrações de íons amônio acima de 20 mM podem inibir a produção de AC (Romero et al, 1984);
- ⇒ para não haver limitação pelo oxigênio dissolvido nos frascos durante a fermentação principal, utilizou-se uma concentração de glicerol (substrato limitante do crescimento) suficiente para se obter uma biomassa média de (8 ± 1) g/L;

Finalmente, a utilização do tampão biológico MOPS permitiu manter o pH em $6,8 \pm 0,2$ durante todas as fermentações, tornando os dados de AC mais confiáveis, uma vez que este composto é muito susceptível à degradação em valores $7,5 < \text{pH} < 6,0$ (Bersanetti et al., 2005).

4.2) Seleção da fonte de N do meio da fermentação principal

Para selecionar a principal fonte de N do meio de produção comparou-se o desempenho geral do processo em batelada utilizando-se meios contendo somente asparagina ou extrato

protéico de soja Soytone. A Asn é a principal fonte de N de muitos meios sintéticos de cultivo de *S. clavuligerus* descritos na literatura (Romero et al, 1984; Kieser et al, 2000). Os demais componentes foram os mesmos nos dois meios e estão descritos na Tabela 3.3.

A formação de biomassa e o consumo de glicerol (Figura 4.1A) apresentaram comportamentos semelhantes nos meios contendo ambas as fontes de N, que foram igualmente adequados para o crescimento celular. Através da Figura 4.1B, observa-se que em meio contendo somente Asn a produção máxima foi de 50 mg/L de AC, mantida aproximadamente constante após 48 horas. Em meio contendo Soytone obteve-se uma concentração máxima de AC quase cinco vezes maior (230 mg/L). A queda na produção após 72 horas da batelada em Soytone, deve ter sido causada mais pela exaustão de nutrientes do que pela degradação do AC, uma vez que o pH manteve-se em torno de 7.

Pode-se concluir que a diversidade de aminoácidos proporcionada pelo extrato protéico Soytone favoreceu a síntese, durante a trofofase, das enzimas responsáveis pela biossíntese do produto. Desta forma, Soytone foi a fonte de N selecionada para o meio padrão de produção principal de todos os experimentos seguintes.

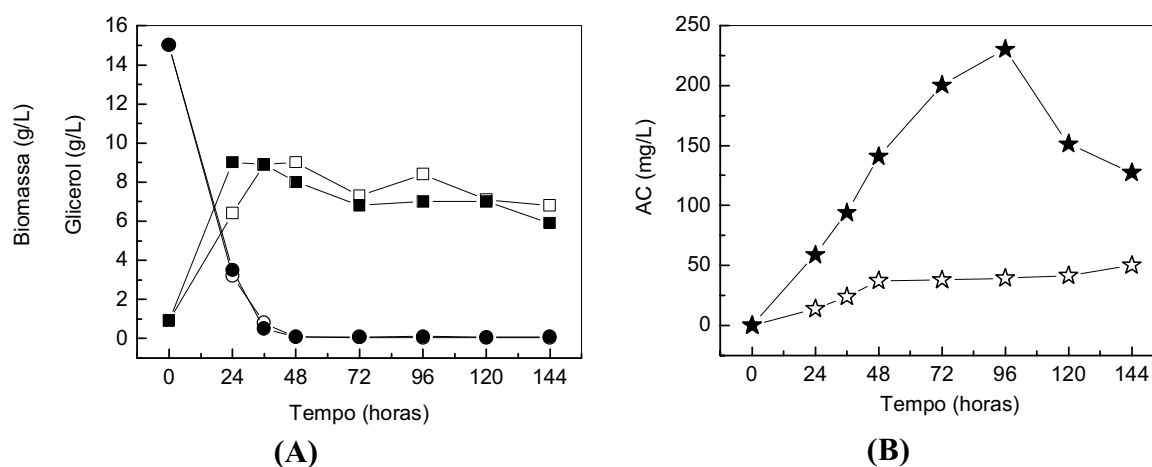


Figura 4.1 - (A) Biomassa (□, ■), glicerol (○, ●) e (B) AC (☆, ★) resultantes de cultivo em batelada em meios contendo somente o aminoácido Asn (símbolos vazios) ou o extrato protéico de soja Soytone (símbolos cheios) como fonte de N (razão C/N = 4)

4.3) Avaliação Qualitativa - seleção de AA

4.3.1) Condições de suplementação de meio

O meio suplementar (Tabela 3.4) continha glicerol e um AA integrante dos principais fluxos de C na biossíntese de AC por *S. clavuligerus* (Figura 2.1).

A concentração de glicerol do meio suplementar foi estimada com base nos resultados de fermentação em batelada em meio contendo Soytone como principal fonte de N (Tabela 3.3), apresentados na Figura 4.2. Para isto, determinou-se a velocidade de consumo do glicerol durante o pequeno intervalo, de 24 a 36 horas de processo, em que a biomassa manteve-se aproximadamente constante e igual a 8,0 g/L (estado *quasi*-estacionário de crescimento). Neste período o glicerol foi consumido essencialmente como fonte de energia, a uma velocidade de 0,024 g glicerol/(h · g cél.). Assim, para a manutenção da biomassa entre 7 e 8 g/L, estabeleceu-se um valor de 36,8 g/L de glicerol no meio suplementar fixando-se uma taxa de diluição $D \cong 0,005 \text{ h}^{-1}$. Esta taxa de diluição média foi adotada em todos os cultivos realizados no modo contínuo intermitente.

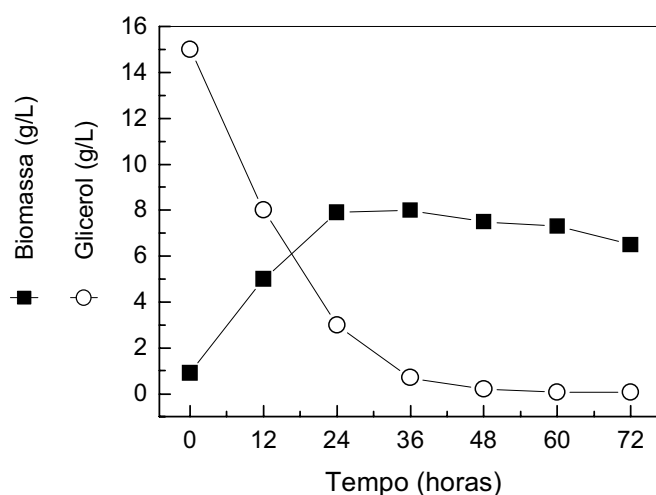


Figura 4.2 - Biomassa e consumo de glicerol resultantes de cultivo em batelada em meio contendo Soytone como principal fonte de N.

Inicialmente, a concentração de AA no meio suplementar foi estabelecida de forma a se obter uma proporção mássica $C/N \cong 20$. Esta alta razão C/N foi proposta com base em trabalho de De Laat et al. (2000), no qual os autores observaram um aumento significativo na produção de AC mantendo-se concentrações baixas de AA no meio reacional durante a fase estacionária de processo em batelada alimentada, através do monitoramento do ácido glutâmico do complexo protéico utilizado.

4.3.2) Avaliação do modo contínuo intermitente em frascos agitados

O principal objetivo desta primeira série de ensaios foi investigar a operacionalidade do procedimento contínuo proposto para frascos agitados (Figura 3.2), suplementando-se

os meios com glicerol (36,8 g/L) e um AA dentre Arg, Orn, Leu e Val, a uma razão mássica C/N = 20. Foram avaliados a taxa de diluição estabelecida ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$), o número de amostragens, o período total de fermentação, a manutenção da assepsia ao longo da fermentação, entre outros fatores.

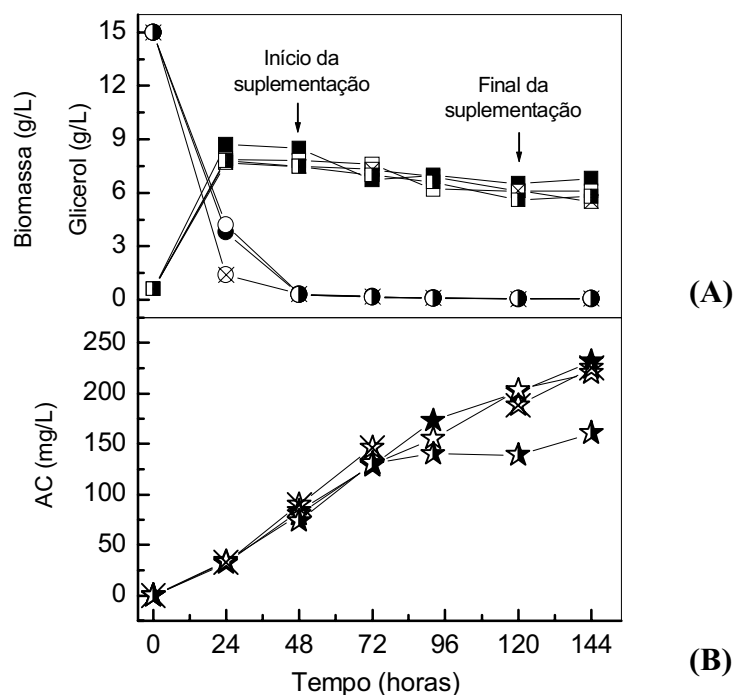


Figura 4.3 - Cultivo em frascos agitados com adição de glicerol (4,3 g/L no frasco a cada adição) e um AA (razão mássica C/N = 20 no meio suplementar, $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante): (A) Biomassa e consumo de glicerol em meios suplementados com Leu (■ e ●), Arg (□ e ○) Orn (⊠ e ⊡) e Val (▣ e ◐) e (B) AC em meios suplementados com Leu (★), Arg (☆), Orn (✱) e Val (☆).

Através da Figura 4.3 pode-se observar que a exaustão do glicerol e a máxima biomassa (7,5 - 8,5 g/L) ocorreram em 48 horas. A partir deste período, a biomassa apresentou uma tendência à queda. Nos meios adicionados de Leu, Arg e Orn obteve-se uma concentração final de AC da mesma ordem de grandeza, em torno de 230 mg/L. Em meio suplementado com Val, a produção foi cerca de 30 % menor.

O cultivo contínuo intermitente em frascos agitados mostrou-se adequado para prolongar a fase estacionária sem prejuízo da viabilidade celular e, assim, avaliar a influência dos AA na produção de AC de maneira eficiente.

4.3.3) Seleção do AA do meio suplementar

Nesta segunda série de ensaios, além da reavaliação de Arg, Orn, Leu e Val, foram avaliados Ile e Tre. Conforme mencionado anteriormente, há evidências de que a serina reprime o metabolismo do glicerol em *S. clavuligerus* (Miñambres et al., 1991) e, por isso, este AA não foi testado no presente trabalho. Um meio suplementar contendo somente glicerol foi adotado como condição controle.

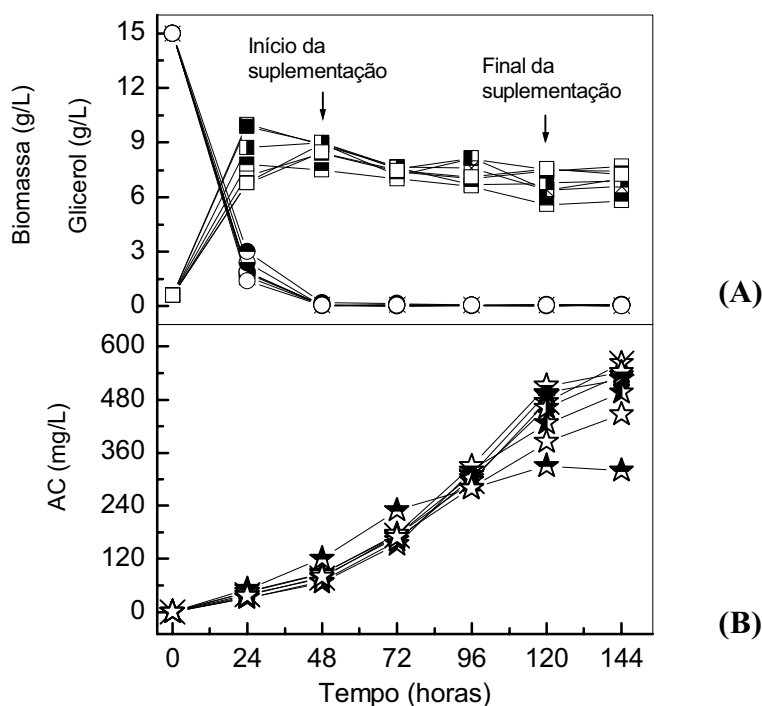


Figura 4.4 - Cultivo em frascos agitados com adição de glicerol (4,3 g/L no frasco, a cada adição) e um AA (razão mássica C/N = 20 no meio suplementar, $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante): **(A)** Biomassa e consumo de glicerol em meios suplementados com Leu (■ e ●), Arg (▣ e ●), Orn (⊠ e ⊠), Ile (▢ e ●), Tre (▤ e ●), Val (▥ e ●) e nenhum AA (□ e ○) e **(B)** AC em meios suplementados com Leu (★), Arg (★), Orn (★), Ile (★), Tre (★), Val (★) e nenhum AA (★).

Até 48 horas, o crescimento celular e o consumo de glicerol (Figura 4.4) foram semelhantes aos obtidos nos experimentos anteriores, uma vez que os meios tinham a mesma composição. A biomassa convergiu para um valor comum em 48 horas, entre 8 e 9 g/L, com ligeira tendência à queda após este período, chegando em valores entre 6,5 e 7,5 g/L ao final do processo.

As velocidades de produção de AC, por sua vez, foram crescentes em todos os meios. O meio suplementado com Val, porém, rendeu praticamente metade da produção final comparativamente aos demais. Diferentemente, Ives e Bushell (1997) observaram, em meio alimentado com Val em quimiostato ($D = 0,05h^{-1}$), uma produção específica cerca de 45% superior à resultante em meio sem alimentação de AA. A diferença entre condições operacionais adotadas no trabalho destes autores e no presente estudo, como a composição do meio suplementar, vazão de alimentação, entre outros fatores, seria uma explicação plausível para a diferença entre os resultados. Uma outra justificativa seria que, no meio de cultivo formulado para o presente trabalho, Val estaria sendo desviada para compor o tripeptídeo precursor de antibióticos beta-lactâmicos (cefalosporinas) em *S. clavuligerus* e, assim, não propiciou boa produção de AC.

Observa-se que a produção de AC nas presentes fermentações foi bem superior ao das replicatas anteriores, o que pode ser explicado pela utilização de micélios de um novo lote de criotubos, com capacidade produtiva mais estável decorrente do menor período de estocagem.

Os dados de biomassa relativa apresentados na Figura 4.5 reforçam o fato de que a adição de AA não afetou a concentração celular durante a idiofase.

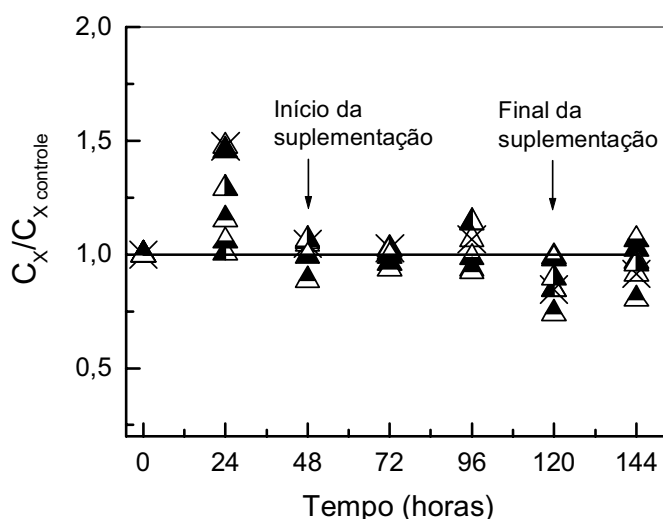


Figura 4.5 - Relação entre dados de biomassa em meios suplementados com glicerol e Leu (▲), Arg (▲), Orn (⊗), Ile (▲), Tre (▲) ou Val (▲) e biomassa resultante da condição controle (meio suplementar contendo somente glicerol) (—).

Apesar da Arg ser o precursor imediato do C5 da molécula de AC, os melhores resultados de produção foram obtidos no meio suplementado com Orn (Figuras 4.4B e 4.6). Através da suplementação do meio com Orn em processo em batelada alimentada, Chen et al (2003) observaram, além de aumento na produção de AC, a inibição do consumo de glicerol para a biossíntese de cefamicina.

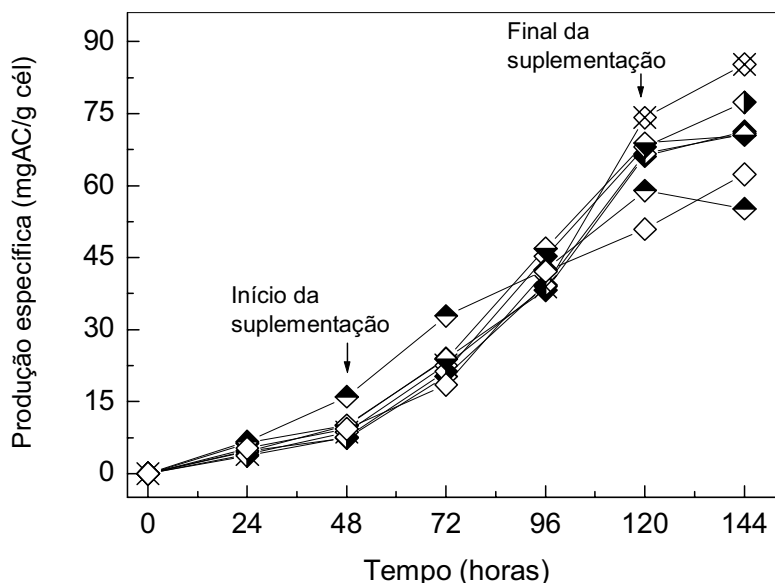


Figura 4.6 - Produção específica de AC em meios suplementados com glicerol e Leu (◆), Arg (◀), Orn (⊗), Ile (▶), Tre (◀), Val (▶) ou nenhum AA (condição controle) (◇)

Comparando-se os processos em meios adicionados de Orn ou Arg em quantidades equimolares (3 mM no frasco, a cada adição), observou-se que o primeiro rendeu maiores concentrações de AC (Figura 4.7). Kirk et al (2000) observaram que a biossíntese da Arg permanece saturada durante a produção de AC sob condições limitantes de fosfato. Tais condições são necessárias para se evitar mecanismos repressão e/ou inibição durante a síntese de produto pelo excesso de fosfato. Em trabalho posterior, de investigação da rota biossintética de AC com o auxílio da análise de fluxos metabólicos, os mesmos pesquisadores não obtiveram correlações significativas com as reações cujos fluxos estavam diretamente associados à Arg (Bushell et al, 2006). Tais observações podem explicar os dados obtidos no presente trabalho.

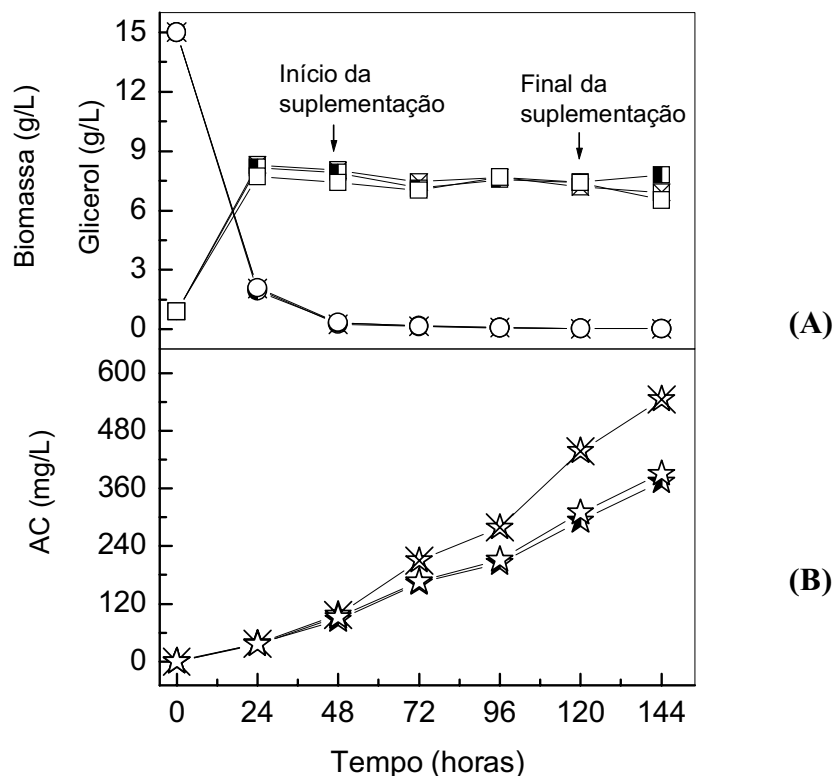


Figura 4.7 - Cultivo em frascos agitados com adição de glicerol e 3 mM de AA (no frasco, a cada adição) ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante): **(A)** Biomassa e glicerol em meios suplementados com Orn ($\boxtimes$ e $\boxtimes$), Arg ($\blacksquare$ e $\bullet$) e nenhum AA ($\square$ e $\circ$) e **(B)** AC em meios suplementados com Orn ($\ast$), Arg ($\star$) e nenhum AA (condição controle) ($\star$);

4.4) Avaliação Quantitativa - otimização da proporção de glicerol e Orn no meio suplementar

4.4.1) Considerações gerais

Esta etapa teve como objetivo principal otimizar a proporção de glicerol e Orn no meio suplementar. Para isto, com base nos resultados já obtidos, propôs-se um Planejamento Fatorial 2^n (Box et al., 1978), sendo $n = 2$ as variáveis independentes concentração de glicerol (C_{Glicerol}) e concentração de Orn (C_{Orn}), investigadas em 2 níveis (-1 e $+1$, em unidades codificadas), com duplicata da condição central (ponto 0,0). A variável resposta escolhida foi a produção final de AC (C_{AC} , em mg/L, em 144 horas). O tratamento estatístico dos dados resultou em superfícies tridimensionais de C_{AC} (em mg/L) em função de C_{Glicerol} e C_{Orn} (em mM, no frasco a cada adição). O procedimento de

suplementação de meio durante a idiofase foi o mesmo utilizado para a seleção de AA, esquematizado na Figura 3.2.

4.4.2) 1º Planejamento Fatorial

As condições experimentais do 1º Planejamento Fatorial 2² estão esquematizadas na Figura 4.8.

Os resultados de biomassa e consumo glicerol deste primeiro planejamento estão ilustrados na Figura 4.9A. O crescimento celular e o consumo de glicerol apresentaram comportamentos semelhantes aos observados nos experimentos anteriores, em meios suplementados. O glicerol esgotou-se em 48 horas e a biomassa estabilizou-se a partir deste período em 7 a 8 g/L, declinando ligeiramente a partir de 96 horas de processo.

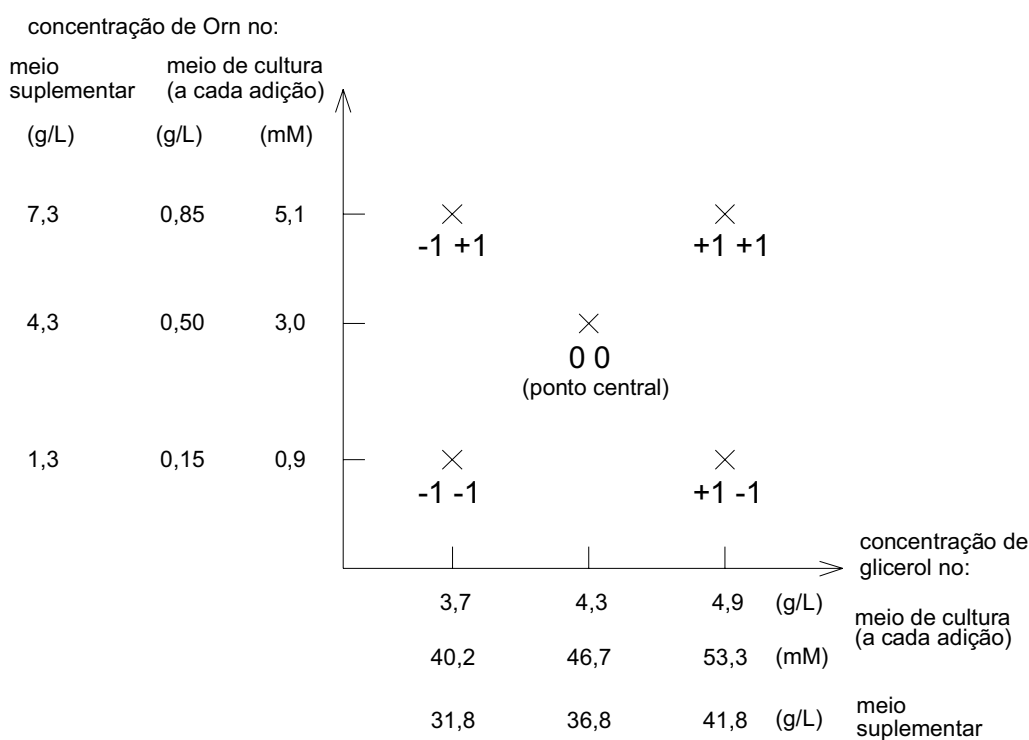


Figura 4.8 - 1º Planejamento Fatorial 2², com duplicata do ponto central - condições de concentração de glicerol e Orn do meio suplementar de processo de produção de AC em frascos agitados ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante).

A concentração de AC foi crescente até 120 horas (Figura 4.9B), sendo os melhores resultados obtidos nos meios contendo mais glicerol (condições +1 -1 e +1 +1). Após 96 horas, a produção específica de AC apresentou um aumento significativo em todas as condições (Figura 4.10), devido ao declínio da biomassa.

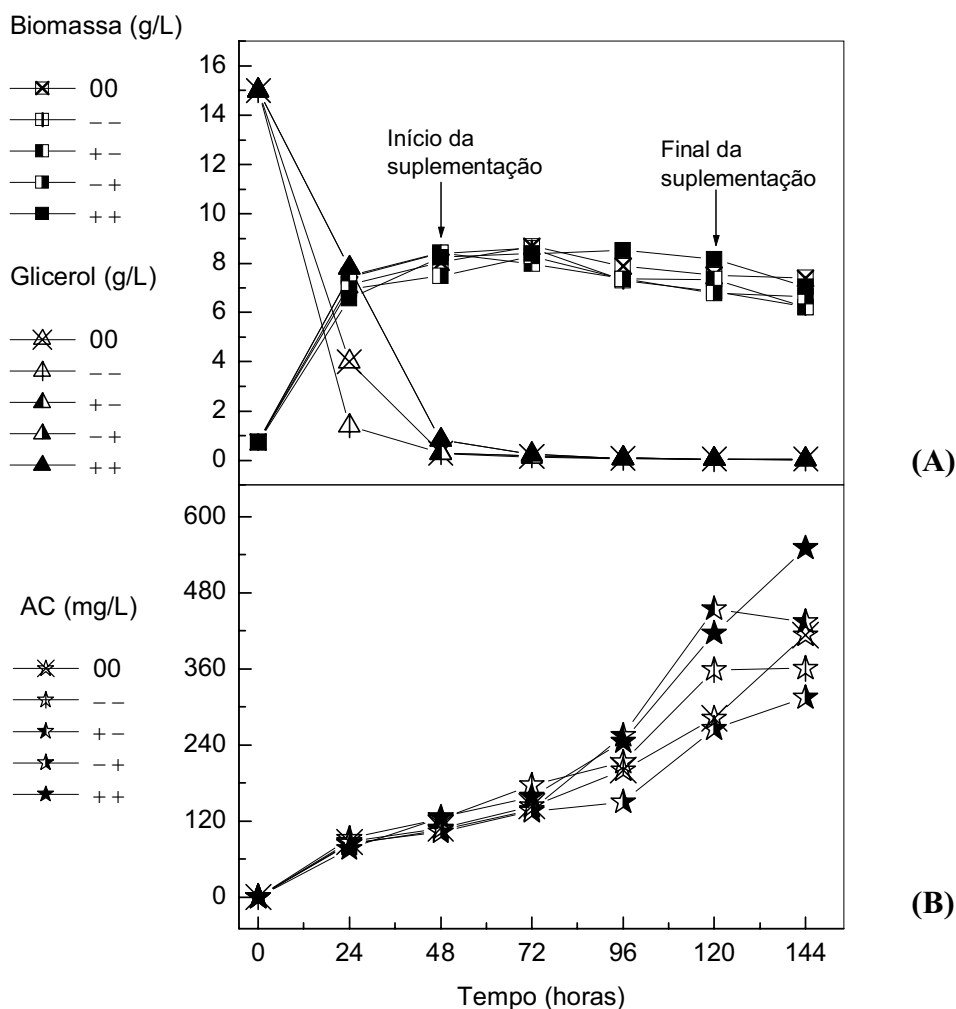


Figura 4.9 - 1º Planejamento Fatorial 2^2 - Dados de (A) Biomassa e consumo de glicerol e (B) AC obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante) com glicerol entre 40,2 e 53,3 mM e Orn entre 0,9 e 5,1 mM (no frasco, a cada adição).

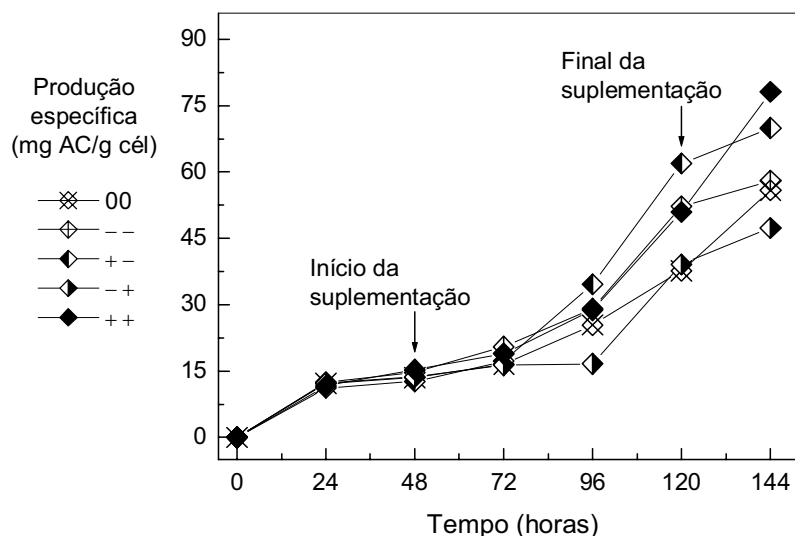


Figura 4.10 - 1º Planejamento Fatorial 2² - Dados de produção específica de AC obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante) com glicerol entre 40,2 e 53,3 mM e Orn entre 0,9 e 5,1 mM (no frasco, a cada adição).

O tratamento estatístico dos gerou a superfície de resposta apresentada na Figura 4.11, com um coeficiente de determinação de 0,99311 a 95% de grau de confiança. Observando-se a ordem de grandeza dos parâmetros da equação desta superfície (Equação 1), pode-se dizer que é possível se obter aumentos significativos de produção de AC somente aumentando-se consideravelmente a concentração de glicerol. De uma maneira geral, o modelo teórico prevê um aumento líquido na produção de AC aumentando-se a concentração dos dois compostos, uma vez que o efeito da combinação de glicerol e Orn é positiva.

$$C_{AC} = 1286,77 - 35,40 \cdot C_{\text{Glicerol}} + 0,36 \cdot C_{\text{Glicerol}}^2 - 183,08 \cdot C_{\text{Orn}} + 3,95 \cdot C_{\text{Glicerol}} C_{\text{Orn}} \quad (\text{Equação 1})$$

O gráfico de valores previstos *versus* observados (Figura 4.12), de produção de AC obtida em 144 horas de processo, reitera o bom ajuste obtido.

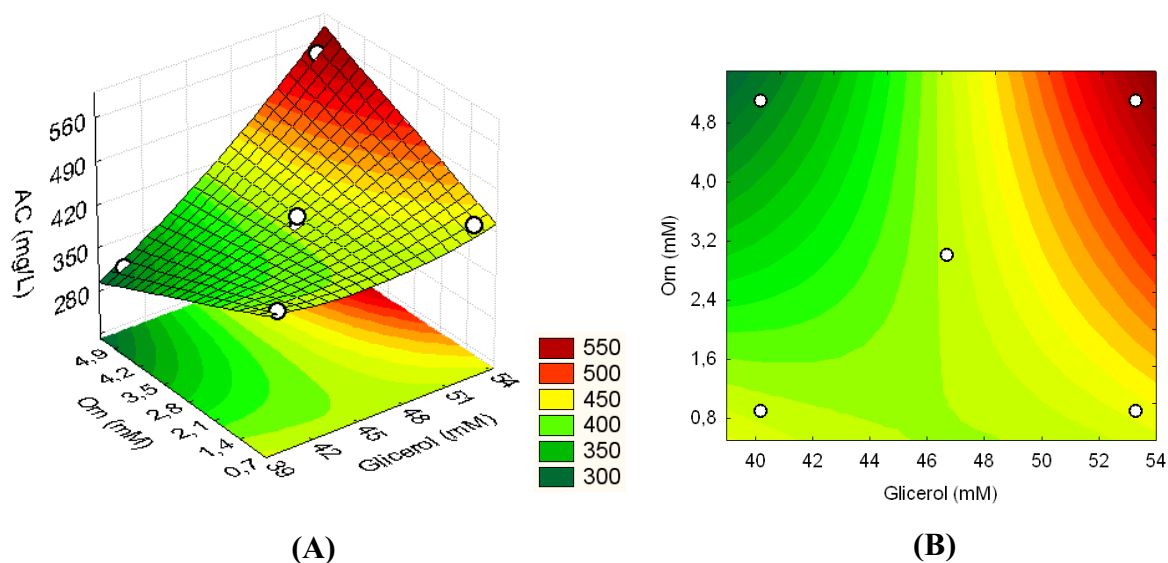


Figura 4.11 – 1º Planejamento Experimental - Superfície de resposta ajustada - (A) tri e (B) bidimensional - e dados experimentais de concentração de AC (mg/L) obtidos em 144 horas de processo *versus* concentrações de glicerol e Orn (no frasco a cada adição, em unidades originais); coeficiente de determinação 0,99311, a 95% de grau de confiança.

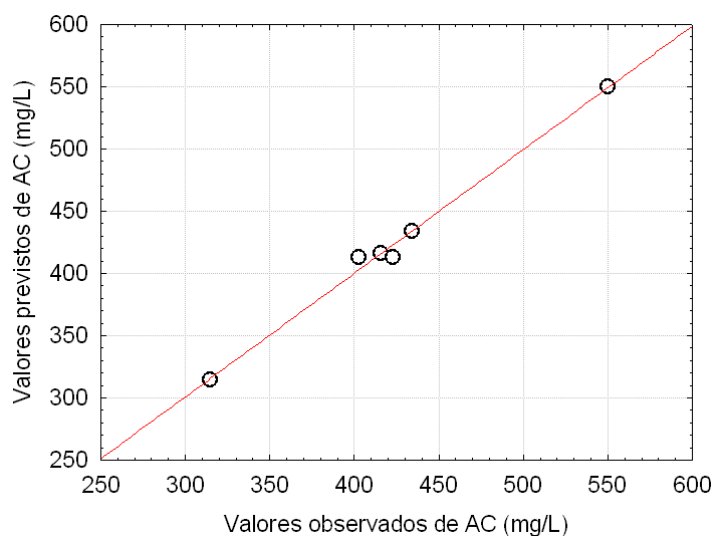


Figura 4.12 - 1º Planejamento Experimental - Valores previstos *versus* observados, de produção de AC (mg/L) em 144 horas de processo.

4.4.3) 2º Planejamento Fatorial

Os resultados do 1º Planejamento Fatorial subsidiaram a elaboração de novo planejamento experimental, considerando-se a possibilidade de obtenção de maiores

concentrações de produto através de aumento nas concentrações de glicerol e Orn no meio suplementar. As condições deste planejamento estão apresentadas na Figura 4.13.

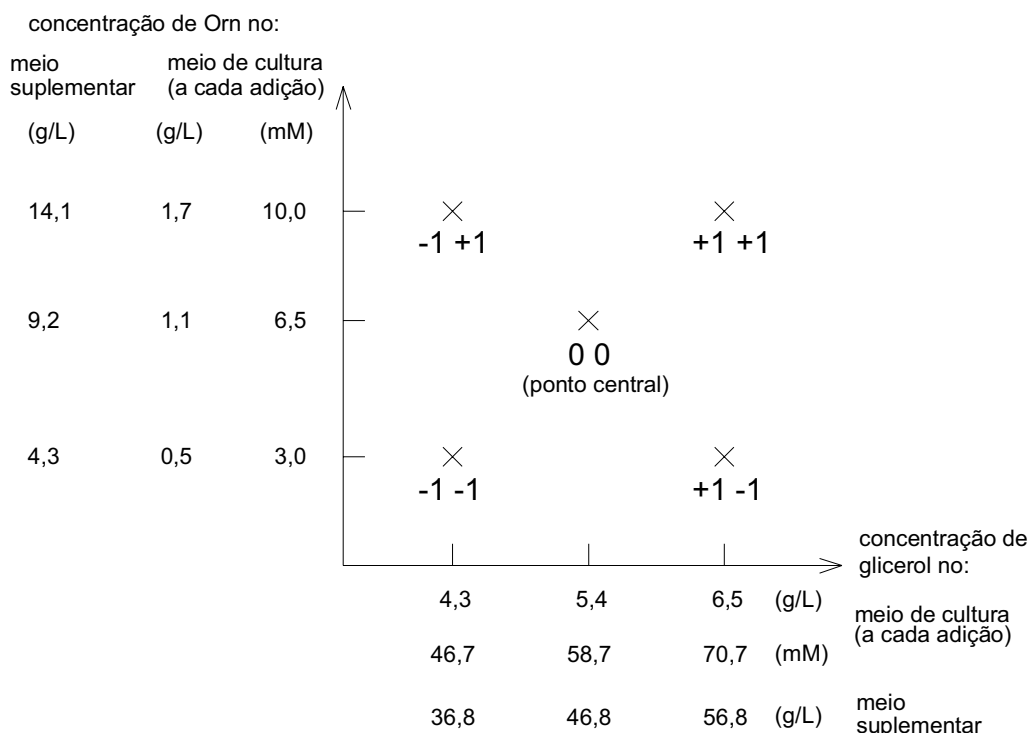


Figura 4.13 - 2º Planejamento Fatorial 2², com duplicata do ponto central - condições de concentração de glicerol e Orn do meio suplementar de processo de produção de AC em frascos agitados ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante).

As faixas de maior concentração de glicerol e Orn no meio suplementar sustentaram a manutenção da biomassa em valores entre 7,5 e 8 g/L em todas as condições (Figura 4.14A). A concentração de glicerol residual permaneceu praticamente zero durante a idiofase, assim como nos experimentos anteriores.

As velocidades de produção (Figura 4.14B e Figura 4.15) foram maiores que as obtidas no 1º Planejamento Experimental. A produção foi crescente até cerca de 96 horas, com tendência geral à estabilização após este período, excetuando-se a condição de maiores concentrações de glicerol e Orn (condição +1 +1), que sustentou o aumento de AC até o final da fermentação.

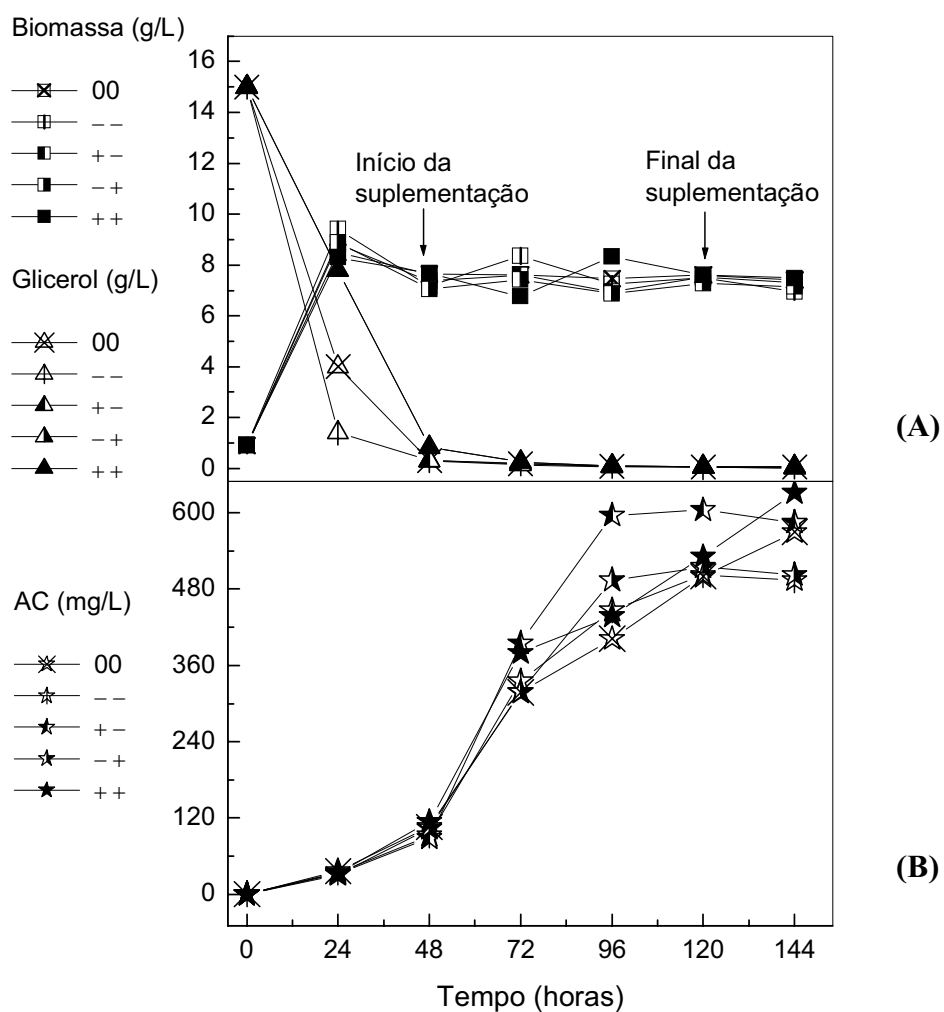


Figura 4.14 - 2^o Planejamento Fatorial 2² – Dados de **(A)** Biomassa e consumo de glicerol e **(B)** AC obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D=0,005\text{ h}^{-1}$, volume reacional constante) com glicerol entre 46,7 e 70,7 mM e Orn entre 3 e 10 mM (no frasco, a cada adição).

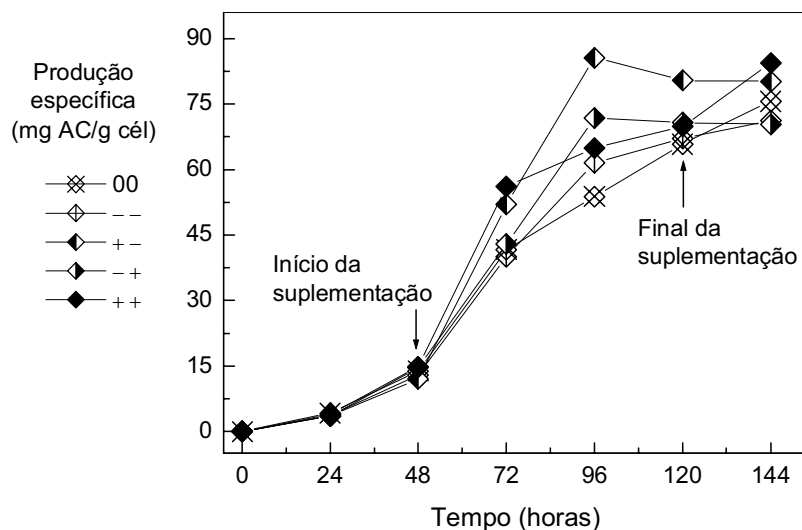


Figura 4.15 - 2º Planejamento Fatorial 2^2 - Dados de produção específica de AC do obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante) com glicerol entre 46,7 e 70,7 mM e Orn entre 3 e 10 mM (no frasco, a cada adição).

A superfície de resposta da Figura 4.16, resultante do tratamento estatístico dos dados de produção de AC em 144 horas, ajustou-se bem aos dados experimentais (0,99941 de coeficiente de determinação, a 95% de grau de confiança).

A Equação 2 mostra que as influências individuais positiva de glicerol e negativa de Orn sobre a produção de AC em 144 horas (em mg/L) são as mais significativas, enquanto o quadrado da concentração de glicerol afeta negativamente. Porém, diferentemente do que se observou anteriormente (Equação 1), um pequeno aumento na concentração de glicerol dentro da presente faixa investigada propicia aumentos significativos de produção, enquanto um grande aumento na concentração do substrato resulta em efeito contrário. Por sua vez, a presença de Orn é importante, uma vez que, assim como constatado no planejamento anterior, a influência positiva da combinação dos compostos supera a influência individual negativa do aminoácido.

$$C_{AC} = -31,21 + 16,54 \cdot C_{\text{Glicerol}} - 0,11 \cdot C_{\text{Glicerol}}^2 - 9,60 \cdot C_{\text{Orn}} + 0,23 \cdot C_{\text{Glicerol}} C_{\text{Orn}}$$

(Equação 2)

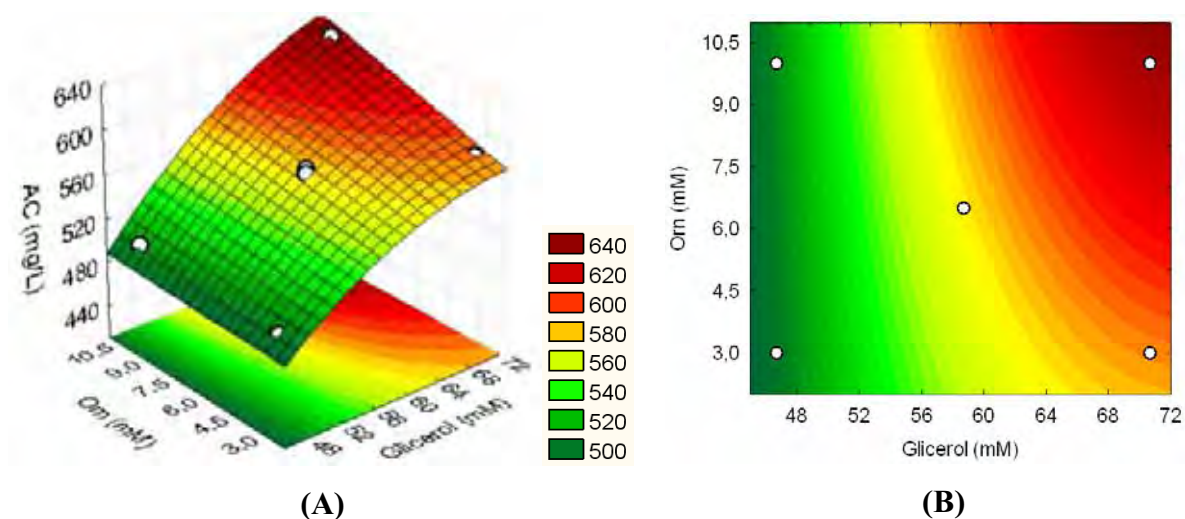


Figura 4.16 - 2º Planejamento Experimental - Superfície de resposta ajustada - (A) tri e (B) bidimensional - e dados experimentais de concentração de AC (mg/L) obtidos em 144 horas de processo *versus* concentrações de glicerol e Orn (no frasco a cada adição, em unidades originais); coeficiente de determinação 0,99941, a 95% de grau de confiança.

O gráfico de valores previstos *versus* observados de produção de AC em 144 horas, apresentado na Figura 4.17, enfatiza o bom ajuste obtido.

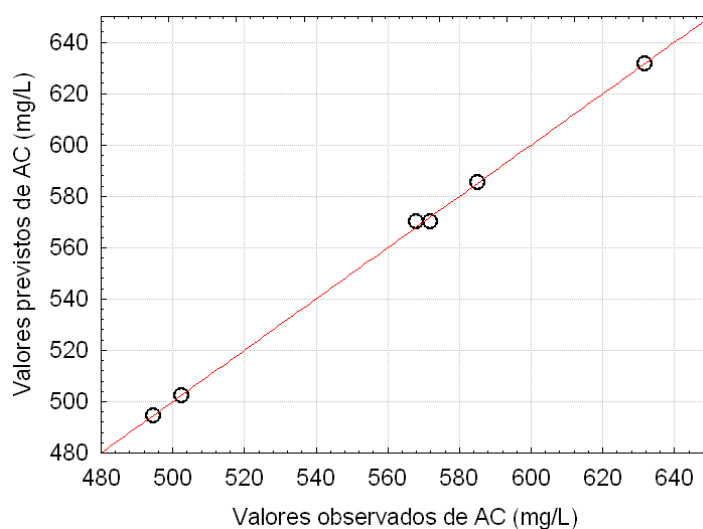


Figura 4.17 - 2º Planejamento Experimental - Valores de produção de AC (mg/L) em 144 horas de processo, previstos *versus* observados

4.4.4) Suplementação com altas concentrações de glicerol

Os modelos ajustados não permitiram prever a máxima produção de AC em 144 horas de processo mas indicaram a possibilidade de se obter maior produção neste período suplementando-se o meio com concentrações sempre maiores de glicerol. Porém, segundo a literatura, a produção de AC é inibida em meios contendo muito glicerol. Foram realizadas, então, fermentações adicionando-se 3 mM de Orn e 98, 130 ou 163 mM de glicerol (concentrações finais no frasco, a cada adição). Paralelamente, foram realizadas fermentações controle suplementando-se os meios somente com glicerol, nas mesmas concentrações.

Os resultados mostraram que o glicerol, mesmo adicionado em excesso, manteve-se em torno de zero ao longo do período de suplementação (Figura 4.18). Aparentemente, a adição de altas concentrações de glicerol afetou a manutenção da concentração celular a partir de 96 horas de processo (Figura 4.19).

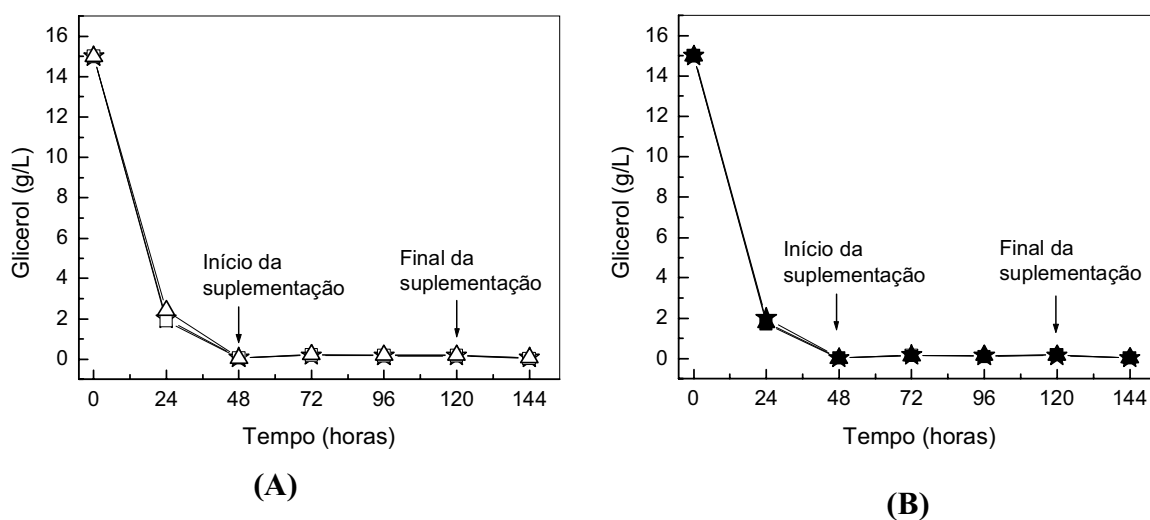


Figura 4.18 - Consumo de glicerol resultante em cultivo em frascos agitados com suplementação de (concentrações resultantes no frasco a cada adição): **(A)** somente glicerol (☆) 98 mM, (□) 130 mM, (△) 163 mM; **(B)** 3 mM de Orn e glicerol (★) 98 mM, (■) 130 mM, (▲) 163 mM. Condições de suplementação: $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante.

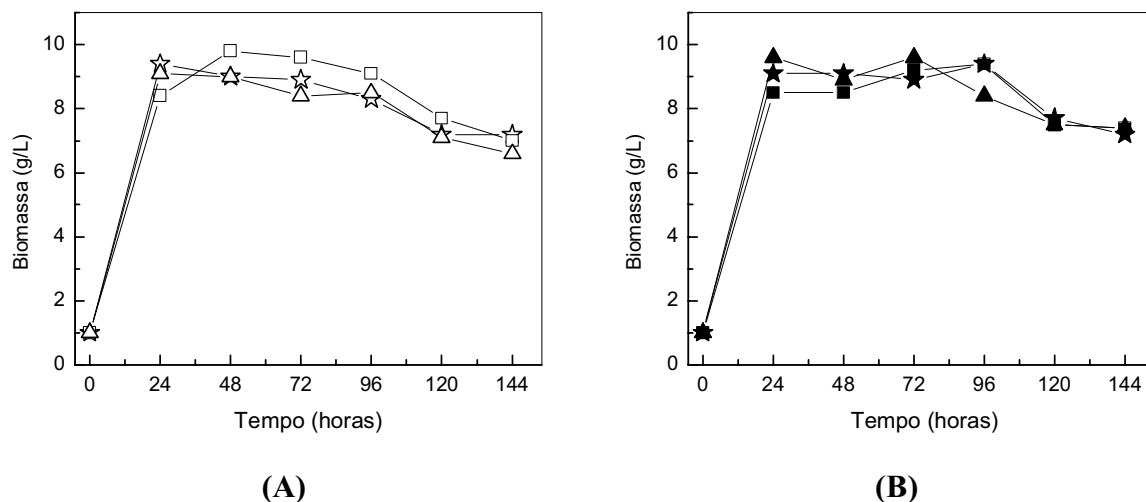


Figura 4.19 - Biomassa resultante em cultivo em frascos agitados com suplementação de (concentrações resultantes no frasco a cada adição): **(A)** somente glicerol (☆) 98 mM, (□) 130 mM, (△) 163 mM; **(B)** 3 mM de Orn e glicerol (★) 98 mM, (■) 130 mM, (▲) 163 mM. Condições de suplementação: $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante.

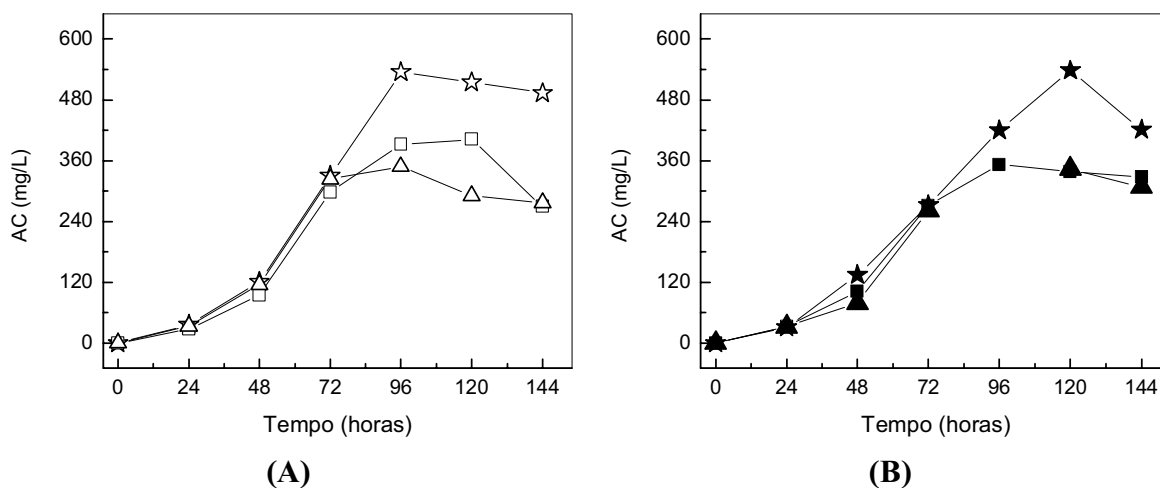


Figura 4.20 - AC resultante em cultivo em frascos agitados com suplementação de (concentrações resultantes no frasco a cada adição): **(A)** somente glicerol (☆) 98 mM, (□) 130 mM, (△) 163 mM; **(B)** 3 mM de Orn e glicerol (★) 98 mM, (■) 130 mM, (▲) 163 mM. Condições de suplementação: $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante.

Os maiores valores de AC foram obtidos em meios suplementados com menos glicerol (98 mM no frasco, a cada adição), com ou sem Orn (Figura 4.20). A adição de maiores quantidades de glicerol (130 e 163 mM) afetou a síntese de AC. Romero et al. (1984) constataram que concentrações de glicerol ≥ 165 mM no meio fermentativo inibiram a síntese de AC.

Observou-se também que a Orn, na concentração de 3 mM, não influenciou a produção comparativamente às condições-controle (sem Orn). Desta forma, pode-se sugerir que o excesso de glicerol mascarou o efeito positivo da combinação dos compostos constatado anteriormente (1º e 2º Planejamentos Fatoriais).

4.4.5) 3º Planejamento Fatorial

Algumas estratégias foram sugeridas para dar continuidade à busca empírica da proporção ótima de glicerol e Orn no meio suplementar. Uma delas seria a realização de fermentações, sob as melhores condições de meio suplementar já avaliadas, por períodos mais longos (> 144 horas) até a obtenção de máxima produção. Outra alternativa poderia ser a realização de novos experimentos utilizando-se faixas crescentes de concentração de glicerol e de Orn até condições de inibição do produto no período pré-estabelecido de 144 horas. A primeira alternativa conduziria a alterações nas condições operacionais propostas inicialmente e a segunda implicaria na elaboração de um número indefinido de novos planejamentos. Optou-se, então, por elaborar um último planejamento fatorial utilizando-se a melhor faixa de concentrações de glicerol já definida e uma faixa de concentrações menores de Orn.

As condições deste terceiro planejamento fatorial 2^2 , com condições adicionais (configuração estrela) e ponto central (em quadruplicata) estão esquematizadas na Figura 4.21.

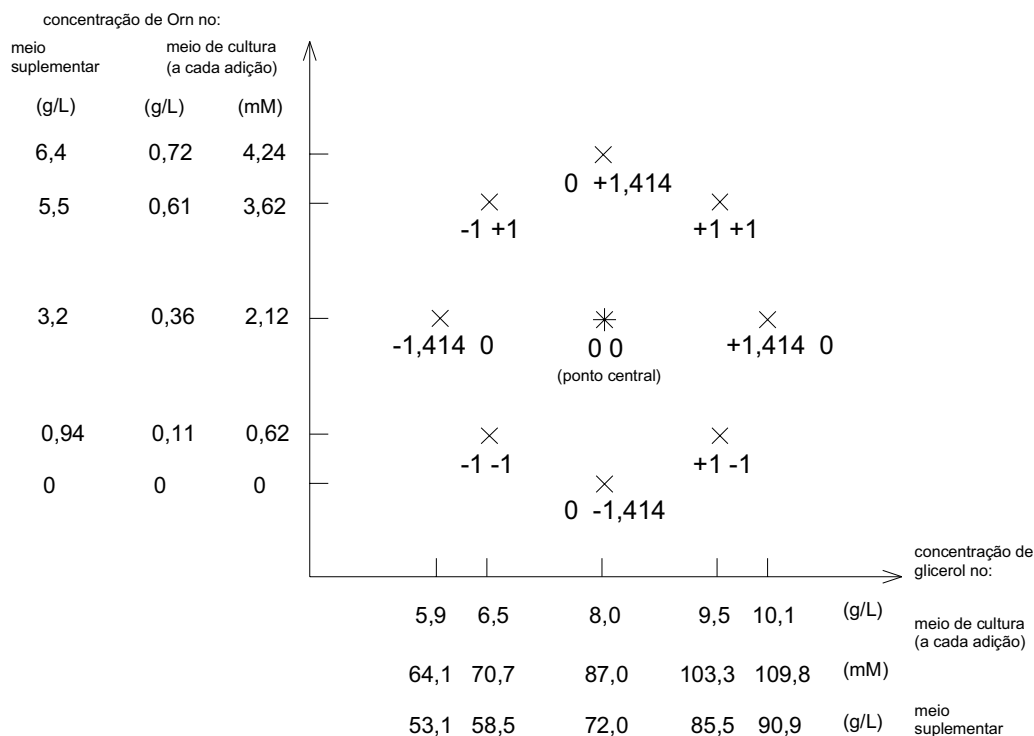


Figura 4.21 - 3º Planejamento Fatorial 2^2 com pontos adicionais (configuração estrela) e quatro replicatas do ponto central - condições de concentração de glicérol e Orn do meio suplementar de processo de produção de AC em frascos agitados ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante).

As fermentações foram realizadas em duas partes: a primeira contemplou as condições do planejamento padrão (faixas de concentração -1 a $+1$, em unidades codificadas), com duplicata do ponto central $(0,0)$ e na segunda, foram investigadas as condições adicionais (faixas de concentração de $-\sqrt{2}$ a $+\sqrt{2}$, em unidades codificadas), com mais uma duplicata do ponto central. Os resultados de biomassa, consumo de glicérol e produção de AC estão apresentados na Figura 4.22 (planejamento padrão) e na Figura 4.23 (condições adicionais para a configuração estrela).

O comportamento do processo, tanto com relação a crescimento celular como consumo de glicérol, foi semelhante ao dos experimentos anteriores. Durante o período de suplementação de meio, em todas as condições, a biomassa manteve-se constante em torno de 8 g/L e a concentração residual de glicérol permaneceu praticamente nula (Figuras 4.22 A e 4.23 A).

Por sua vez, a produção geral de AC foi menor comparativamente aos experimentos anteriores, e talvez tenha sido limitada pela faixa de concentrações menores de Orn. A condição central (0 0) realizada em quadruplicata, correspondente a 87 mM de glicerol e 2,12 mM de Orn, no frasco, a cada adição, foi significativamente melhor que as demais (Figuras 4.22 B e 4.23 B).

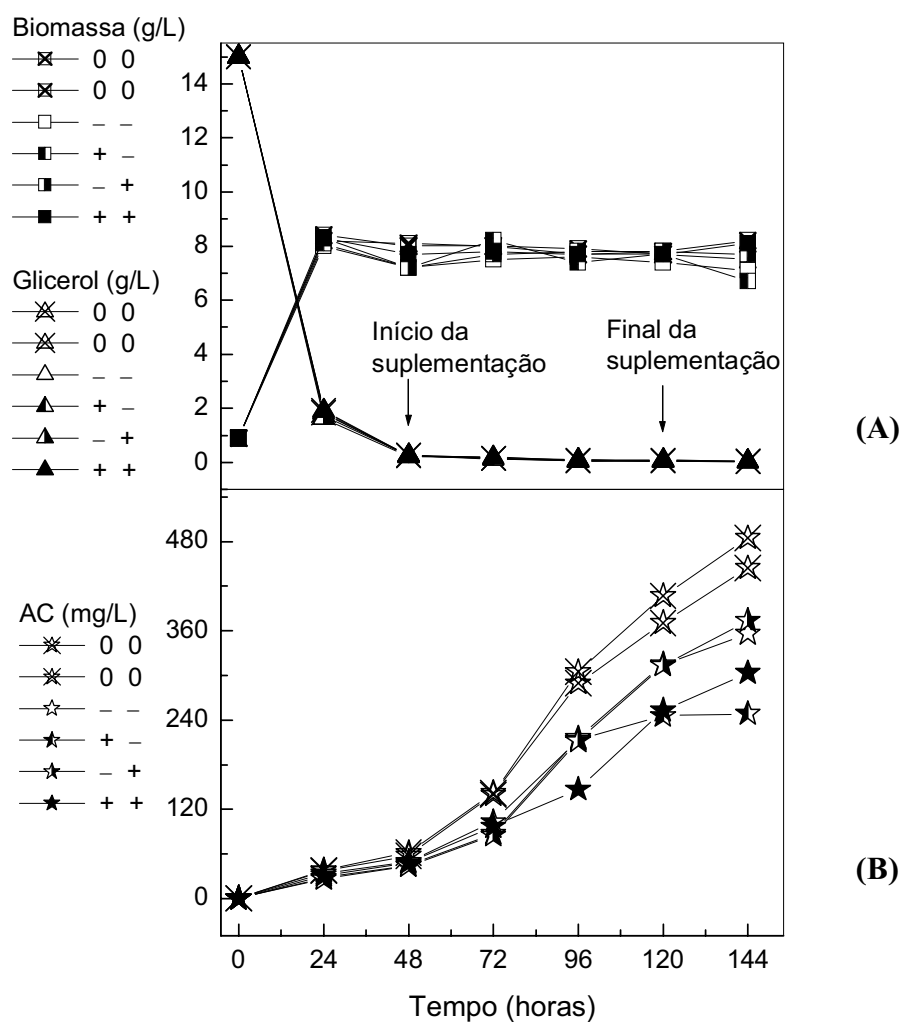


Figura 4.22 - 3º Planejamento Fatorial 2^2 – Condições-padrão - Dados de (A) Biomassa e consumo de glicerol e (B) AC obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante) com glicerol entre 70,7 e 103,3 mM e Orn entre 0,62 e 3,62 mM (no frasco, a cada adição).

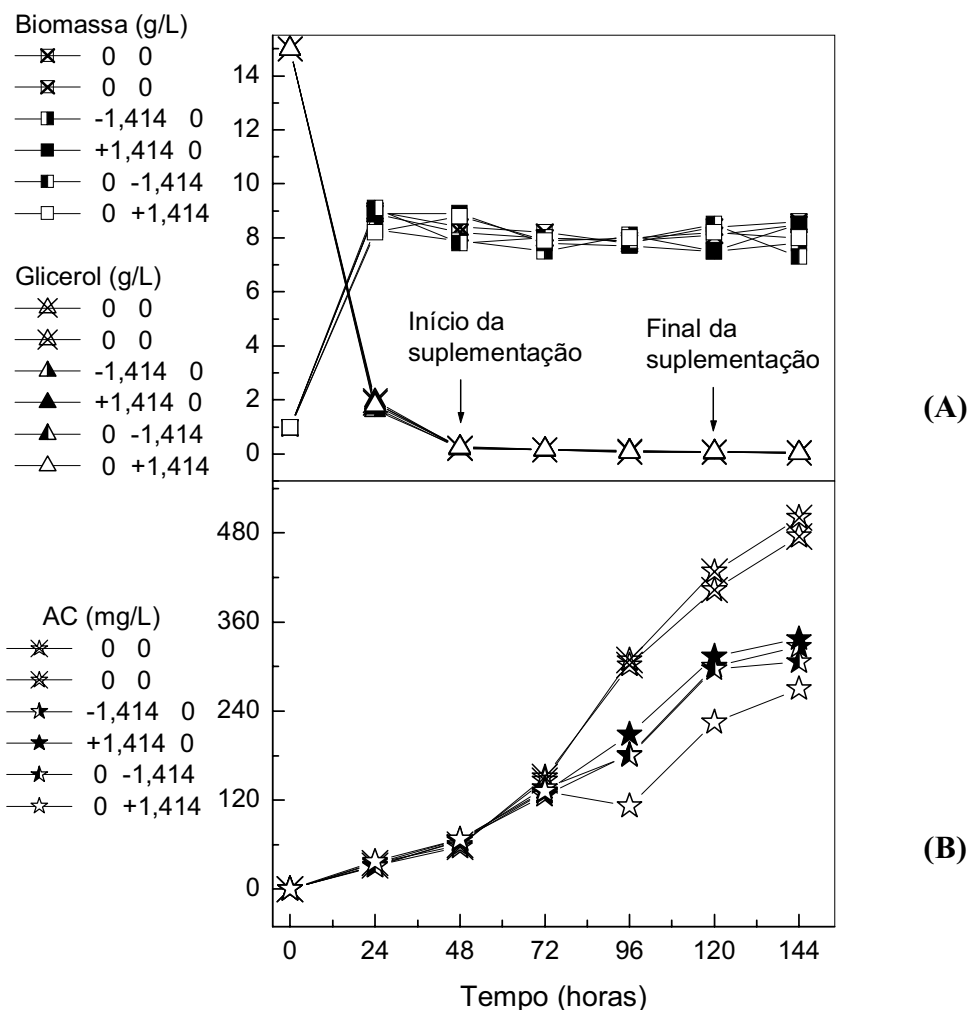


Figura 4.23 - 3º Planejamento Fatorial 2^2 – Condições adicionais - Dados de **(A)** Biomassa e consumo de glicerol e **(B)** AC obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante) com glicerol entre 64,1 e 109,8 mM e Orn entre 0 e 4,24 mM (no frasco, a cada adição).

A análise dos dados resultou na superfície apresentada na Figura 4.24 (0,90189 de coeficiente de determinação, a 95% de grau de confiança). A equação da superfície (Equação 3) prevê uma produção máxima de AC (em 144 horas de processo) nas condições próximas à do ponto central, ou seja, a uma proporção molar de $C_{\text{Glicerol}}/C_{\text{Orn}} \cong 40$ no meio suplementar. A comparação entre os valores previstos e os experimentais, de produção de AC em 144 horas, está apresentada na Figura 4.25.

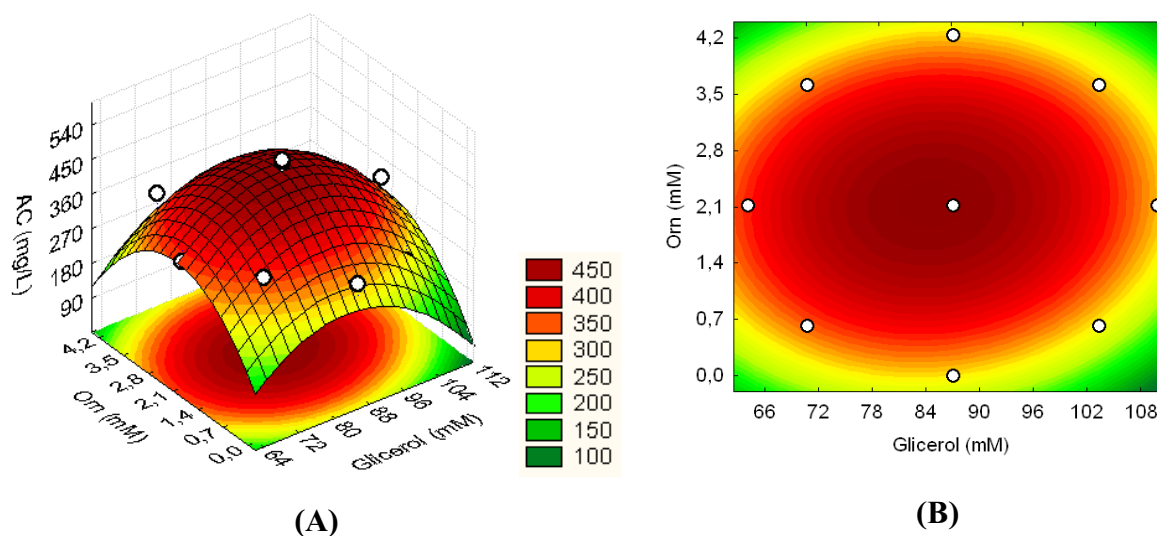


Figura 4.24 - 3º Planejamento Experimental - Superfície de resposta ajustada - (A) tri e (B) bidimensional - e dados experimentais de concentração de AC (mg/L) obtidos em 144 horas de processo *versus* concentrações de glicerol e Orn (no frasco a cada adição, em unidades originais); coeficiente de determinação 0,90189 a 95% de grau de confiança.

$$C_{AC} = -1482,92 + 42,85 \cdot C_{\text{Glicerol}} - 0,26 \cdot C_{\text{Glicerol}}^2 + 136,55 \cdot C_{\text{Orn}} - 39,67 \cdot C_{\text{Orn}}^2 + 0,38 \cdot C_{\text{Glicerol}} C_{\text{Orn}}$$

(Equação 3)

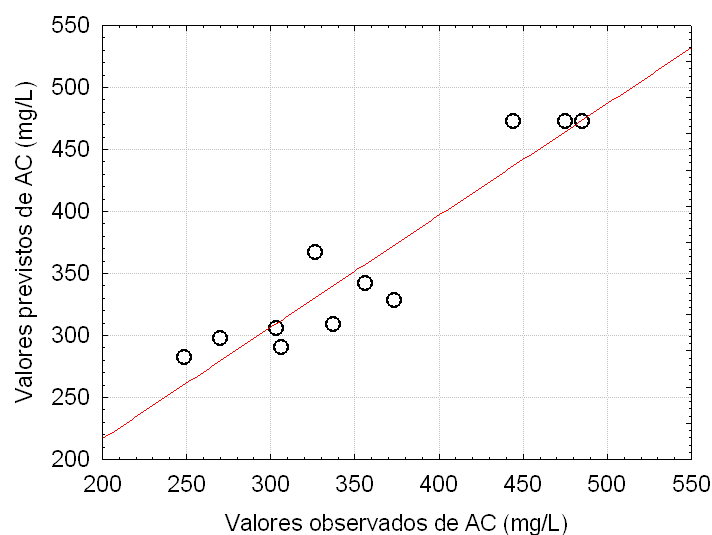


Figura 4.25 - 3º Planejamento Experimental - Valores de produção de AC (mg/L) em 144 horas de processo, previstos *versus* observados

4.4.6) Avaliação final da proporção de glicerol e Orn no meio suplementar

A proporção molar otimizada (~40:1 de glicerol e Orn) foi testada com um meio suplementar contendo glicerol e Orn em concentrações 20% menores que as originalmente utilizadas (condição central do 3º Planejamento). Os resultados estão apresentados na Figura 4.26, juntamente com a produção média obtida em cinco replicatas da condição do ponto central do 3º planejamento fatorial, correspondente a 87 mM de glicerol e 2,12 mM de Orn, no frasco a cada adição.

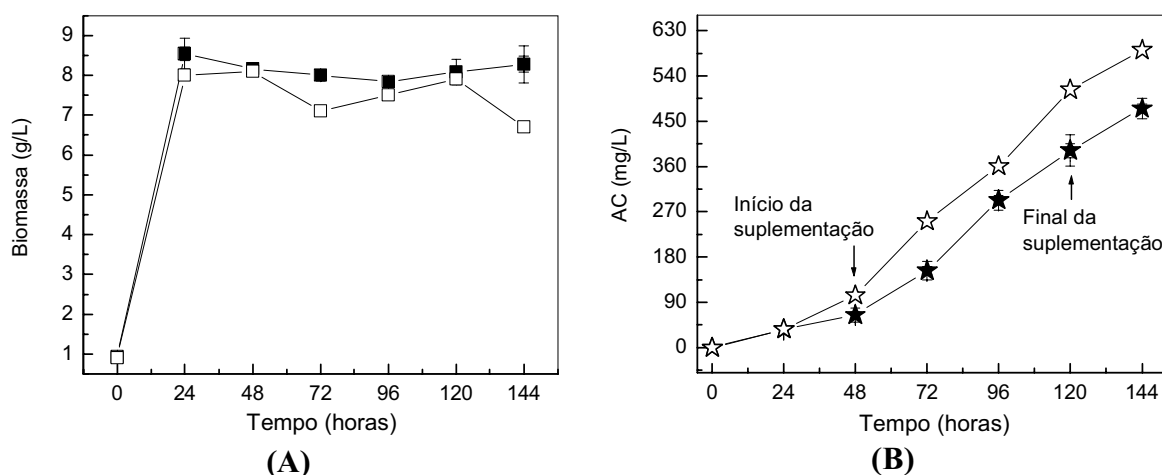


Figura 4.26 - Dados de (A) Biomassa (□, ■) e (B) AC (☆, ★) obtidos em cultivo em frascos agitados suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante, proporção molar glicerol:Orn $\cong 40$) com glicerol e Orn: 70,7 mM e 1,72 mM (símbolos vazios) e 87 mM e 2,12 mM (símbolos cheios) (concentrações no frasco, a cada adição).

Foram obtidos aumentos de cerca de 25% na produção de AC e de 54% na produção específica relativa ao glicerol consumido durante a idiofase. Desta forma, a metodologia de planejamento fatorial foi adequada para otimizar um meio suplementar sintético contendo somente glicerol e Orn que rende altas concentrações de AC.

4.5) Processo em biorreator convencional

A proporção molar otimizada (40:1 glicerol e Orn no meio suplementar) foi testada em biorreator tipo tanque agitado e aerado. Utilizou-se o mesmo procedimento contínuo intermitente do processo em frascos agitados ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante) com um intervalo menor entre cada suplementação (12 horas).

O comportamento do processo tanto com relação ao crescimento celular como ao consumo de glicerol (Figura 4.27) foi semelhante ao realizado em frascos agitados. A concentração de glicerol caiu rapidamente em 24 horas, mantendo-se praticamente igual a zero durante a idiofase. A biomassa atingiu seu valor máximo também em 24 horas, mantendo-se constante em torno de 7 g/L até o final da fermentação, um valor da mesma ordem de grandeza do obtido em frascos agitados.

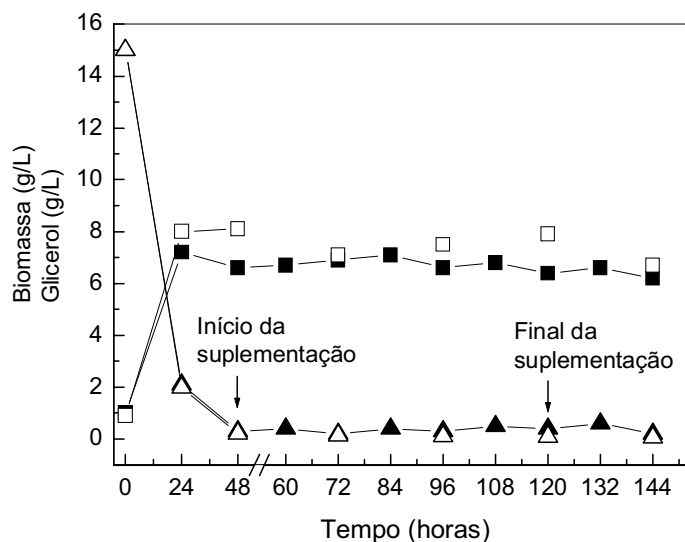


Figura 4.27 - Dados de biomassa (□, ■) e consumo de glicerol (△, ▲) obtidos em cultivos em frascos agitados (símbolos vazios) e em biorreator tipo tanque agitado e aerado (símbolos cheios), suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante, proporção molar glicerol:Orn $\cong 40$) com 70,7 mM de glicerol e 1,72 mM de Orn (concentrações no meio reacional, a cada 24 horas).

Por sua vez, a produção de AC em 144 horas de processo (Figuras 4.28 e 4.29) foi cerca de 60% maior em biorreator. Este resultado se deve às melhores condições de aeração e agitação, que promovem aumentos significativos na velocidade de transferência de oxigênio gás-líquido no meio reacional e, com isto, disponibilizam oxigênio ao microrganismo de maneira mais eficaz.

O rendimento final de AC relativo ao consumo de glicerol durante a idiofase foi de 3,3 mg AC/g glicerol, ou seja, 57% maior que o obtido em frascos agitados, sob mesmas concentrações de glicerol e Orn, e mais de 140% maior que o resultante em frascos agitados nas condições de concentração ótimas do 3º planejamento fatorial (ponto central).

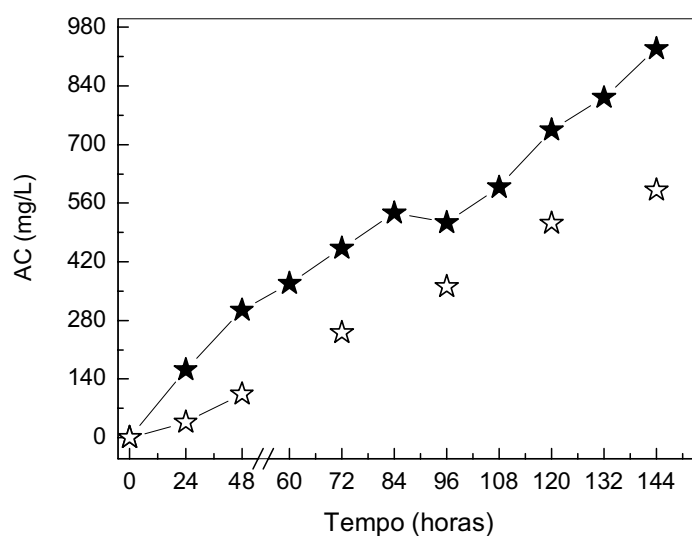


Figura 4.28 - Dados de AC em cultivos em frascos agitados (☆) e em biorreator tipo tanque agitado e aerado (★), suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante, proporção molar glicerol:Orn $\cong 40$) com 70,7 mM de glicerol e 1,72 mM de Orn (concentrações no meio reacional, a cada 24 horas).

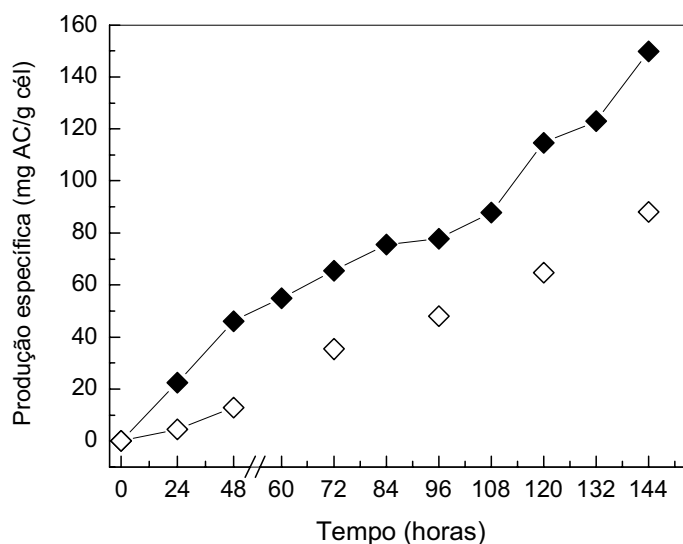


Figura 4.29 - Dados de produção específica de AC em cultivos em frascos agitados (◇) e em biorreator tipo tanque agitado e aerado (◆), suplementando-se o meio ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, volume reacional constante, proporção molar glicerol:Orn $\cong 40$) com 70,7 mM de glicerol e 1,72 mM de Orn (concentrações no meio reacional, a cada adição).

5) CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos pôde-se concluir que:

(1) As duas fontes de N testadas, Asn e o extrato de proteínas de soja Soytone, foram igualmente adequadas para o crescimento celular, porém, a maior variedade de AA proporcionada pelo extrato protéico rendeu produção máxima de AC cinco vezes maior;

(2) O procedimento experimental proposto de processo contínuo intermitente em frascos agitados mostrou-se:

- viável sob o ponto de vista operacional e promissor com relação aos dados obtidos em $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$, suficientemente baixa para evitar um "arraste" de células;
- uma ótima alternativa ao processo convencional em batelada para, através da suplementação adequada de nutrientes: (a) prolongar a idiofase e contornar os efeitos de repressão e/ou inibição causados por altas concentrações do substrato limitante; (b) investigar de maneira mais efetiva a influência dos AA no processo (manutenção celular e produção); (c) controlar a velocidade de crescimento celular e, assim, o consumo de oxigênio, intimamente associados no cultivo de *S. clavuligerus* em meio líquido;

(3) Dentre os AA testados no meio suplementar para promover maior produção de AC:

- a Val foi o menos adequado à obtenção de maiores rendimentos de AC, o que talvez indique um desvio daquele AA para compor o tripeptídeo precursor de antibióticos beta-lactâmicos, cuja rota biossintética é totalmente distinta da de AC em *S. clavuligerus*;
- a Orn foi o mais adequado, um dado condizente com os obtidos por pesquisadores que focaram o papel deste AA como precursor do AC (Baggaley et al, 1997);

(4) A metodologia do Planejamento Fatorial 2^2 foi adequada para se obter uma proporção otimizada de glicerol e Orn de meio sintético de suplementação de processo contínuo intermitente de produção de AC em frascos agitados, sob baixa taxa de diluição;

(5) A proporção molar de glicerol e Orn otimizada em frascos agitados é eficiente também em maior escala (biorreator tipo tanque agitado e aerado de 5L, operado no modo contínuo intermitente, a $D = 0,005 \text{ h}^{-1}$).

6) REFERÊNCIAS

- BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. *Nat. Prod. Rep.*, v.14, n. 4, p.309-333, 1977.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical engineering fundamentals*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1986.
- BEECHMAN GROUP (England). M. Cole; T. T. Howarth; C. Reading, *Antibiotic from Streptomyces clavuligerus*. US 4,529,720, 24 Sept. 1981, p.218-359, 1985, 16 July 1985.
- BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOSA, M.; ARAUJO, M. L. G. C. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. *Biochem. Eng. J.*, v.23, n. 1, p.31-31, 2005.
- BERSANETTI, P. A.; BARBOSA, M.; HOKKA, C. O.; ARAUJO, M. L. G. C. Estudos cinéticos de hidrólise do ácido clavulânico. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 13, 2000, Teresópolis. *Anais...* Rio de Janeiro: UFRJ, 2000. p.39.1 – 39.6.
- 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.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. *Statistics for experimenters*. New York: John Wiley and Sons, 1978. 655p.
- BRAKHAGE, A. A.; AI – ABDALLAH Q.; TUNCER, A.; SPROTE, P. Evolution of β – lactam biosynthesis genes and recruitment of trans-acting factors. *Phytochemistry*, v.66, n.11, p.1200-1210, 2005.
- 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. Antibiot.*, v.29, p.668-669, 1976
- BROWN, A. G.; COBERTT, D. F.; GOODACRE, J.; HARBRIDGE, J. B.; HOWART, T. T.; PONSFORD, R. J.; STIRLING, I. Clavulanic acid and its derivatives: structure elucidation of clavulanic acid and the preparation of dihydroclavulanic acid, isoclavulanic acid, esters and related oxidation products. *J. Chem. Soc.*, p.635-650, 1984.
- BUSHELL, M. E.; FRYDAY, A. The application of materials balancing to the characterization of sequential secondary metabolite formation in **Streptomyces cattleya NRRL 8057**. *J. Gen. Microbiol.*, v.129, p. 1733-1741, 1983.
- BUSHELL, M. E.; KIRK, S.; ZHAO, H-J.; ROSA, C. A. A. Manipulation of the physiology of clavulanic acid biosynthesis with the aid of metabolic flux analysis. *Enz. Microb. Technol.*, v.39, n.1, p.149-157, 2006.
- BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: VANDAME, E. J. (Ed.). *Biotechnology of industrial antibiotics*. New York: M. Dekker, 1984. p.3-31.

BYCROFT, B. W.; PENROSE, A.; GILLET, J.; ELSON, S. W. The incorporation of DL - 4-²H₂5¹³C) ornithine into clavulanic acid and N -actylglylclavuminic acid. *J. Chem. Soc., Chem. commun.*, n.14, p. 980-981, 1988.

CHEN, K-C.; LIN, Y-H.; TSAI, 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.152-156, 2003.

DARY, A.; SCHAUBER, C.; LEBRIHI, A.; LEBLOND, P.; DECARIS, B.; GERMAIN, P. Modulation of lipid metabolism and Spiramycin Biosynthesis in **Streptomyces ambofaciens** unstable mutants. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, p.2730-2737, 1999.

DE LAAT, W.; KRABBEN, P. *Fermentation process to produce clavulanic acid at low concentration of free amino acids*. WO 00/01840, 03 July 1998, 13 Jan. 2000.

ECKERS, C.; CHALKLEY, R.; HASKINS, N.; EDWARDS, J.; GRIFFIN, J.; GRIFFIN, J.; ELSON, S. Investigation into the use of derivatization with imidazole for the detection of clavam compounds by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Comm.*, v.33, p.215-218, 1996.

ELANDER, R. P. Industrial production of β -lactam antibiotics. *Appl. Microb. Biotechnol.*, v.61, n.5/6, p.385-392, 2003.

FOULSTONE, M.; READING, C. Assay of amoxilin and clavulanic acid, the components of augmentin in biological fluids with high-performance liquid chromatography. *Antimicrob. Agents Ch.*, v.22, p.753-762, 1982.

GLAXOSMITHKLINE. *Annual report 2004*. Disponível em: <<http://www.gsk.com/investors/reps04/annual-report-2004.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2007.

GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA NETO, A.; BADINO, A. C.; HOKKA, C. O. Optimization of medium composition for clavulanic acid production by **Streptomyces clavuligerus**. *Biotechnol. Lett.*, v.23, p.157-161, 2001.

GUTMAN, A. L.; RIBON, V.; BOLTANSKI, A. Incorporation of β -hydroxypropionate into the β -lactam residue of clavulanic acid. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, p.1627-1629, 1985.

IVES, P. R.; BUSHELL, M. E. Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in **Streptomyces clavuligerus**. *Microbiol.*, v.143, p.3573-3579, 1997.

KIESER, T.; CHATER, K. F.; BIBB, M. J.; BUTTNER, M. J.; HOPWOOD, D. A. *Practical Streptomyces genetics*. Norwich: John Innes Foundation, 2000. 613p.

KIM, I-C.; KIM, C-H.; HONG, S-I.; KIM, S-W. Fed-batch cultivation for the production of clavulanic acid by an immobilized **Streptomyces clavuligerus** mutant. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.17, n.9, p.869-872, 2001.

KIRK, S.; AVIGNOME-ROSSA, C. A.; BUSHELL, M. E. Growth limiting substrate affects antibiotic production and associated metabolic fluxes in **Streptomyces clavuligerus**. *Biotechnol. Lett.*, v.22, p.1803-1809, 2000.

LAMBERT, M.; NEISH, A. C. Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solution. *Can. J. Research*, v.28, n.3, p.83-89, 1950.

LEE, P. C.; HO, 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.

LIRAS, P.; MARTIN, J. F. Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by **Streptomyces clavuligerus**: microbial processes and products In: BARREDO, J. L. (Ed.). *Methods in biotechnology*. Totowa: Humana Press, 2005. v.18, p.149-163.

LOCCI, R. **Streptomyces** and Related Genera In: WILLIAMS, S. T. et al. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore. Williams & Wilkins, 1989. v.4, section 29, p.2451-2499.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock: biology of microorganisms*. 8th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 986 p.

MINÁMBRES, B.; REGLERO, A.; LUENGO, J. M. Characterization of an inducible transport system for glycerol in **Streptomyces clavuligerus** – repression by L-serine. *J. Antibiot.*, v.45, n.2, p.269-277, 1991.

NAGARAJAN, R.; BOECK, L. D.; GORMAN, M.; HAMILL, R. L.; HIGGENS, C. E.; HOEHN, M. M.; STARK, W. M.; WHITNEY, J. G. β -Lactam antibiotics from **Streptomyces**. *J. Am. Chem. Soc.*, v.93, n.9, p.2308-2310, 1971.

PRUESS, D. L.; KELLETT, M. A. New clavam antibiotic from **Streptomyces clavuligerus**. *J. Antib.*, v.20, p.208-212, 1983.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 692 p.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTIN, J. F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in **Streptomyces clavulanic**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.20, p.318-325, 1984.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Utilization of ornithine and arginine as specific precursors of clavulanic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.52, p.892-897, 1986.

TOWNSEND, C. A. New reaction in clavulanic acid biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v.6, n.5, p.583-589, 2002.

TROVATTI, E. *Desenvolvimento de meio de cultivo semi – sintético para processo de produção de ácido clavulânico por Streptomyces clavuligerus ATCC 27064*. 2001. 62f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

TROVATTI, E.; BADINO JUNIOR, A. C.; HOKKA, C. O.; ARAUJO, M. L. G. C. Influence of free amino acids on clavulanic acid production by **Streptomyces clavuligerus** in synthetic medium. *Braz. Arch. Technol.*, v.49, p.173-179, 2006.

VALENTINE, B. P.; BAILEY, C. R.; DOHERTY, A.; MORRIS, J.; ELSON, S. W.; BAGGALEY, K. H.; NICHOLSON, N. H. Evidence that arginine is a later metabolic intermediate than ornithine in the biosynthesis of clavulanic acid by **Streptomyces clavuligerus**. *J. Chem Soc.*, p.1210-1211, 1993.

ZHANG, J.; GREASHAM, R. Chemically defined media for commercial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.51, p.407-421, 1999.