UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Produção e extração de ácido clavulânico de *Streptomyces* spp. por fermentação
extrativa utilizando sistemas de duas fases aquosas

Daniela de Araújo Viana Marques

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

São Paulo
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Produção e extração de ácido clavulânico de *Streptomyces* spp. por fermentação
extrativa utilizando sistemas de duas fases aquosas

Daniela de Araújo Viana Marques

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Marques, Daniela de Araújo Viana
M886p Produção e extração de ácido clavulânico de *Streptomyces*
spp. por fermentação extrativa utilizando sistemas de duas fases
aquosas / Daniela de Araújo Viana Marques. --São Paulo, 2010.
159p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Pessoa Júnior, Adalberto

1. Tecnologia Farmacêutica 2. Microbiologia Industrial
3. Bioquímica Industrial I. T. II. Pessoa Júnior, Adalberto,
orientador.

615.4 CDD

Daniela de Araújo Viana Marques

Produção e extração de ácido clavulânico de *Streptomyces* spp. por fermentação
extrativa utilizando sistemas de duas fases aquosas

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*A minha Família: pais,
Zilma e Ricardo; irmão,
Rodrigo; avós, Berenice,
Waldemar e Cordélia,
tios e primos. Obrigada
pelo carinho e incentivo.*

*Ao meu marido, David,
pelo amor, amizade,
força e paciência.*

“Lembremo-nos de que o homem interior se renova sempre. A luta enriquece-o de experiência, a dor aprimora-lhe as emoções e o sacrifício tempera-lhes o caráter. Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na essência, é a preparação de nosso próprio amanhã.”

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

“O Senhor é meu pastor e nada me faltará”.
Obrigada, Pai, por mais uma etapa vencida na minha vida.

Aos familiares do meu esposo, em especial, D. Graça, Seu Pedro, Márcia, Márcio André, Marcos, o pequeno Victor, Flávia, Sueli, Fátima, Aguinaldo e Lorena, pelo carinho e apoio.

Ao Prof. Adalberto, pela excelente orientação, confiança e incentivo durante todo o trabalho.

À Prof^a Ana Porto, pela amizade, confiança e, principalmente, calma que tanto colaboraram para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Attilio, pela orientação durante o período que permaneci na Itália, bem como, após a volta ao Brasil. À sua paciência e confiança.

A Prof^a Patrizia, pela ajuda, compreensão e auxílio durante a permanência na Itália.
(*Alla Professoressa Patrizia per l'incoraggiamento, comprensione e l'assistenza durante il soggiorno in Italia*).

Ao Prof. José Luiz de Lima Filho, pelo entusiasmo, conhecimento e por possibilitar o desenvolvimento de uma parte deste trabalho no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA-UFPE.

À Prof^a Magali, pela doação das linhagens de *Streptomyces* spp. pertencentes à Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos-UFPE.

Aos meus amigos, Roberta e Lúcio, Duschinka e Marcelo, Poliana e Alexandre e Renata e César: todos vocês são muito importantes

Aos meus amigos de faculdade que até hoje nos comunicamos, o meu muito obrigada.

Aos amigos do LIKA, em especial do setor de Biotecnologia, Conceição, Prof^a Veridiana, Prof^a Taciana, Carolina, Alessandro, Prof^a Keila, Tatiana, Germana, Torquato, Flávio, Edgar, Petrus, Roberto, Sérgio, Rafael, Márcia, Júlio, Pabyton, Marília, Gisele, e a todos os outros, pela amizade, aprendizado e companheirismo em todo o momento.

A todos os amigos que fazem parte dos outros setores do LIKA.

Aos meus amigos-irmãos brasileiros, Ricardo, Candice, Leonardo e Noriak, pela verdadeira amizade, companheirismo e alegria em todos os momentos.

À minha amiga-irmã colombiana, Erika, e a toda sua família, pelo auxílio, hospitalidade e divertimento durante toda a permanência na Itália.

Aos amigos de Gênova-Itália, Bahar, Afshin, Alberto, Sara, Alessandro, Marzia, Bea, Paolo, Aicha, Carla, Mikio, Chiara, Laurie, Josef, Simona e Carlo, e a todos os outros de várias nacionalidades: juntos dividimos muitos momentos de companheirismo e alegria.

A todos os meus colegas do Semi-industrial da FCF-USP, Valéria, Bruno, André, Profª Carlota, Angela, Luciana, Letícia, Carolina, Marcos, Renata, Gabriel, Marcelo, Raquel, Lívia, Cintia, Elias, Ivan, Carolina, Fadi, Luiz e Marina.

A todos os meus colegas do doutorado, pela troca de conhecimentos durante a realização das disciplinas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pelos conhecimentos oferecidos nas disciplinas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelas bolsas de pesquisa concedidas.

Aos funcionários do LIKA, Dona Celestina, Moisés, Seu Otaviano, Oscar, Vera, Felipe, Rafael, Ilma, Conceição, Paulina, Cleide, Paulo e Cláudio.

Aos funcionários do Semi-Industrial, Gledson, Ricardo, Fátima, Sônia, Marilene, Cândida e Irene; do Departamento, Mirian, Elza e Juarez; da Secretaria de Pós-Graduação, Elaine, Ney, e, em especial, Jorge, pelo auxílio na correção deste trabalho. A todos, obrigada pela paciência, dedicação e eficiência.

A todos os funcionários da Universidade de Gênova.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvi
RESUMO	xviii
RIASSUNTO	xix
ABSTRACT	xx
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA	4
I.1 Gênero <i>Streptomyces</i>	4
I.2 Antibióticos: importância e produção	6
I.3 Ácido clavulânico: um potente inibidor de β -lactamases	9
I. 4 Sistema de duas fases aquosas (SDFA)	12
I. 5 Sistemas de duas fases aquosas compostos de PEG/Sais	13
I. 6 Fatores que influenciam o sistema de duas fases aquosas	15
I. 6.1 Massa molar e concentração do polímero	15
I. 6.2 pH e adição de sais	16
I. 6.3 Temperatura	17
I. 6.4 Adição de suspensões biológicas	17
I.7 Fermentação extrativa em sistema de duas fases aquosas (SDFA)	18
I.8 Fatores importantes no estudo de fermentação extrativa em SDFA na produção e na extração de ácido clavulânico	20
CAPÍTULO II - SELEÇÃO DE LINHAGENS DE <i>STREPTOMYCES</i> spp.	22
PRODUTORAS DE ÁCIDO CLAVULÂNICO	
II.1 Resumo	22
II.2 Introdução	22
II.3 Material e Métodos	24
II.4 Resultados e discussão	26
II.5 Conclusões	30
CAPÍTULO III - SELEÇÃO DE VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO PELO <i>STREPTOMYCES</i> DAUFPE 3060	31

III.1 Resumo	31
III.2 Introdução	31
III.3 Material e Métodos	33
III.4 Resultados e discussão	36
III.5 Conclusões	43
CAPÍTULO IV - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR <i>STREPTOMYCES</i> DAUFPE 3060 UTILIZANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	44
IV.1 Resumo	44
IV.2 Introdução	45
IV.3 Material e Métodos	46
IV.4 Resultados e discussão	48
IV.5 Conclusões	51
CAPÍTULO V - INVESTIGAÇÃO CINÉTICA E TERMODINÂMICA DA FORMAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO DURANTE A FERMENTAÇÃO DE GLICEROL POR <i>STREPTOMYCES</i> DAUFPE 3060	52
V.1 Resumo	52
V.2 Introdução	53
V.3 Teoria	54
V.4 Material e Métodos	57
V.5 Resultados e discussão	60
V.6 Conclusões	66
CAPÍTULO VI - COMPARAÇÃO DO COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA NOS SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO CONVENCIONAL E EXTRATIVA	68
VI.1 Resumo	68
VI.2 Introdução	69
VI.3 Material e Métodos	70
VI.4 Resultados e discussão	74
VI.5 Conclusões	80
CAPÍTULO VII - FERMENTAÇÃO EXTRATIVA DE ÁCIDO CLAVULÂNICO DE <i>STREPTOMYCES</i> DAUFPE 3060 UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS	81

VII.1 Resumo	81
VII.2 Introdução	82
VII.3 Material e Métodos	83
VII.4 Resultados e discussão	89
VII.5 Conclusões	100
CAPÍTULO VIII - EFEITO DA AERAÇÃO E AGITAÇÃO NA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PRODUZIDO PELO <i>STREPTOMYCES</i> DAUFPE 3060	101
VIII.1 Resumo	101
VIII.2 Introdução	102
VIII.3 Material e Métodos	103
VIII.4 Resultados e discussão	107
VIII.5 Conclusões	115
IX. CONCLUSÕES FINAIS	116
X. REFERÊNCIAS	118
ANEXOS	139

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I- REVISÃO DA LITERATURA

- Figura I.1.** Imagem de microscopia eletrônica de *Streptomyces* spp. Fonte: SCIENCE PHOTO LIBRARY 4
- Figura I.2 A e B.** Mecanismo de ação dos antibióticos β -lactâmicos através da inibição da síntese da parede celular. Fonte: Adaptado do Atlas, PRINCIPLES OF MICROBIOLOGY, 1997 7
- Figura I.3.** Estruturas químicas da penicilina (1) e do ácido clavulânico (2). Fonte: DEMAIN; ELANDER, 1999. 10
- Figura I.4.** Reencaminhamento da acilo-enzima intermediária pelo ácido clavulânico para inativar β -lactamases (WALSH, 2003). 11
- Figura I.5.** Estruturas químicas dos inibidores de β -lactamases mais utilizados. Ácido clavulânico (1), sulbactam (2) e tazobactam (3) (VENKATESAN *et al.*, 2004) 11
- Figura I.6.** Representação simplificada do processo integrado do SDFA e fermentação para produtos extracelulares (RITO-PALOMARES, 2004). 18

CAPÍTULO II - SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *STREPTOMYCES* spp. PRODUTORAS DE ÁCIDO CLAVULÂNICO

- Figura II.1.** Concentração celular (biomassa, g/L) em função do tempo de cultivo 27
- Figura II.2.** Concentrações de ácido clavulânico (mg/L) obtidas pelas seis linhagens de *Streptomyces* em função do tempo de cultivo 29
- Figura II.3.** Curva de pH das seis amostras de *Streptomyces* spp. cultivadas no meio de cultura com farinha de soja a 2% a cada 24h 29

CAPÍTULO III - SELEÇÃO DE VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO PELO *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060

- Figura III.1.** Representação cúbica das médias das concentrações de ácido clavulânico em diferentes níveis de pH e concentrações de farinha de soja e glicerol, de acordo com o planejamento fatorial fracionário descrito na Tabela III.1 37
- Figura III.2.** Representação da relação entre as variáveis-resposta, concentrações de biomassa e AC, após 48h dos cultivos do *Streptomyces* DAUFPE 3060 utilizando o planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} da Tabela 1 39

Figura III.3. Concentrações de biomassa ($\square$), glicerol ($\triangle$) e ácido clavulânico ($\bullet$) em função do tempo de cultivo durante o ensaio 3 em frascos agitados 41

Figura III.4. Concentrações de biomassa ($\square$), glicerol ($\triangle$) e ácido clavulânico ($\bullet$) em função do tempo de cultivo de *Streptomyces* DAUFPE 3060 em biorreator 43

CAPÍTULO IV - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060 UTILIZANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Figura IV.1. Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos da concentração de farinha de soja e a temperatura nas concentrações de biomassa e AC 49

Figura IV.2. Concentrações de biomassa ($\square$), glicerol ($\triangle$) e ácido clavulânico ($\bullet$) com o tempo de cultivo em frascos agitados. Temperatura: 32 °C; concentração de farinha de soja: 40 g/L; concentração de glicerol: 5,0 g/L; 150 rpm; pH 6,0 50

CAPÍTULO V- INVESTIGAÇÃO CINÉTICA E TERMODINÂMICA DA FORMAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO DURANTE A FERMENTAÇÃO DE GLICEROL POR *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060

Figura V.1. Produção de ácido clavulânico pela fermentação de *Streptomyces* DAUFPE 3060 a 32°C. Concentração do AC ($\square$), consumo de glicerol ($\bullet$) e produção de biomassa ($\blacktriangle$) 61

Figura V.2. Formação ($\blacksquare$) e degradação ($\square$) do ácido clavulânico durante a fermentação do glicerol pelo *Streptomyces* DAUFPE 3060 a 32°C 62

Figura V.3. Formação de AC ($\circ$), desdobramento da enzima ($\bullet$) e degradação de AC ($\blacktriangle$) segundo Arrhenius durante a fermentação do glicerol pelo *Streptomyces* DAUFPE 3060 a diferentes temperaturas 64

Figura V.4. Formação ($\circ$) e degradação ($\blacktriangle$) de AC segundo Eyring durante a fermentação do glicerol pelo *Streptomyces* DAUFPE 3060 em diferentes temperaturas (24, 28, 32, 36 e 40°C) 65

CAPÍTULO VI - COMPARAÇÃO DO COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA NOS SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO CONVENCIONAL E EXTRATIVA

Figura VI.1. Relação entre os valores de k_La em função da agitação e da aeração no meio simples de fermentação, de acordo com o planejamento fatorial completo 2^2 da Tabela VI.1 75

Figura VI.2. Relação entre os valores de k_La em função da agitação e da aeração no meio de fermentação extrativa, de acordo com o planejamento fatorial completo 2^2 da Tabela VI.1 75

Figura VI.3. Valores observados e previstos do coeficiente volumétrico de transferência de massa em função das variáveis velocidade de agitação (N^3D^2) e aeração (V_s) de acordo com o planejamento fatorial completo 2^2 da Tabela VI.1. Água destilada (○); meio simples de fermentação (□); meio de fermentação extrativa (▲) 78

CAPÍTULO VII - FERMENTAÇÃO EXTRATIVA DE ÁCIDO CLAVULÂNICO DE *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060 UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

Figura VII.1. Foto da fermentação extrativa utilizando SDFA PEG/sais fosfato para a extração de AC produzido por *Streptomyces* DAUFPE 3060 90

Figura VII.2. Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos das variáveis independentes, massa molar do PEG e velocidade de agitação, no coeficiente de partição 97

Figura VII.3. Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos das variáveis independentes, massa molar do PEG e velocidade de agitação, no rendimento da fase inferior do sistema 97

Figura VII.4. Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos das variáveis independentes massa molar do PEG e velocidade de agitação, no rendimento da fase superior do sistema 98

CAPÍTULO VIII - EFEITO DA AERAÇÃO E DA AGITAÇÃO NA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PRODUZIDO PELO *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060

Figura VIII.1. Efeito da velocidade de agitação e de aeração de todos os ensaios do planejamento estatístico na DOT durante a fermentação de *Streptomyces* DAUFPE 3060 para a produção e a extração de AC 108

Figura VIII.2. Efeito da velocidade de agitação e da aeração de todos os ensaios do planejamento estatístico na biomassa durante a fermentação de *Streptomyces* DAUFPE 3060 para a produção e a extração de AC 109

Figura VIII.3. Foto do biorreator contendo a fermentação extrativa utilizando SDFA, após o cultivo de *Streptomyces* DAUFPE 3060 por 48h 113

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *STREPTOMYCES* spp. PRODUTORAS DE ÁCIDO CLAVULÂNICO

Tabela II.1. Velocidades máximas de crescimento ($\mu_{x\text{máx}}$) em h^{-1} das seis linhagens de *Streptomyces* spp. em 24 e 48h de cultivo 27

Tabela II.2. Produtividade (P_{AC}) obtida pelas seis linhagens de *Streptomyces* durante 168h de fermentação no meio de cultivo utilizando farinha de soja como fonte de nitrogênio em 200 rpm a 28°C 28

CAPÍTULO III - SELEÇÃO DE VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO PELO *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060

Tabela III.1. Variáveis e níveis do planejamento estatístico fracionário 2^{5-2} utilizado para a produção de AC por *Streptomyces* DAUFPE 3060 36

Tabela III.2. Combinação dos níveis das cinco variáveis independentes (velocidade de agitação, temperatura, pH, concentrações de glicerol e farinha de soja) usadas no planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} e suas respectivas respostas (concentrações de ácido clavulânico e biomassa) 36

Tabela III.3. Valores dos contrastes calculados através da análise do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} aplicados às variáveis independentes em relação à variável-resposta, concentração de ácido clavulânico 39

Tabela III.4. Resultados de regressão do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} para a produção de ácido clavulânico 40

CAPÍTULO IV - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060 UTILIZANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Tabela IV.1. Combinações dos níveis das duas variáveis independentes (temperatura e concentração de FS) utilizadas no planejamento central composto 2^2 e os resultados das respostas estudadas (concentrações de ácido clavulânico e biomassa) 48

CAPÍTULO V - INVESTIGAÇÃO CINÉTICA E TERMODINÂMICA DA FORMAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO DURANTE A FERMENTAÇÃO DE GLICEROL POR *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060

Tabela V.1. Principais parâmetros cinéticos da fermentação do glicerol a ácido clavulânico por *Streptomyces* DAUFPE 3060 em diferentes temperaturas 63

Tabela V.2. Parâmetros termodinâmicos da formação e da degradação térmica do AC	66
--	----

CAPÍTULO VI - COMPARAÇÃO DO COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA NOS SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO CONVENCIONAL E EXTRATIVA

Tabela VI.1. Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo 2^2 para estudar a influência da agitação e da aeração no k_La em água destilada, no meio simples de fermentação e no sistema de fermentação extrativa	72
--	----

Tabela VI.2. Combinações dos níveis das duas variáveis independentes (agitação e aeração) utilizadas no planejamento fatorial completo 2^2 e os valores das relativas respostas	77
--	----

Tabela VI.3. Correlação dos coeficientes α e β estimados para água destilada, meio simples de fermentação e meio de fermentação extrativa com SDFA pela linearização logarítmica da eq. (5)	80
---	----

CAPÍTULO VII - FERMENTAÇÃO EXTRATIVA DE ÁCIDO CLAVULÂNICO DE *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060 UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

Tabela VII.1. Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	87
---	----

Tabela VII.2. Níveis das variáveis utilizadas no planejamento central composto 2^2	88
---	----

Tabela VII.3. Influência das variáveis independentes nas respostas k , η e BM de acordo com o planejamento fatorial 2^{4-1}	91
---	----

Tabela VII.4. Resultados do planejamento estatístico central composto 2^2	95
--	----

Tabela VII.5. Análise de variância do modelo descrito para cada variável-resposta, coeficiente de partição e rendimento das fases superior e inferior em relação às variáveis independentes massa molar do PEG e velocidade de agitação, de acordo com planejamento estatístico central composto 2^2	96
---	----

CAPÍTULO VIII - EFEITO DA AERAÇÃO E AGITAÇÃO NA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PRODUZIDO PELO *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060

Tabela VIII.1. Resultados do planejamento estatístico completo 2^2	111
---	-----

Tabela VIII.2. Análise de variância do modelo descrito para cada variável-resposta, OUR e OTR em relação as variáveis independentes massa molar do PEG e velocidade de agitação de acordo com planejamento estatístico central composto 2^2	112
--	-----

Tabela VIII.3. Resultados dos ensaios realizados para determinação dos parâmetros de extração do AC no sistema de fermentação extrativa utilizando SDFA

114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NAG	N-acetilglicosamina
NAM	Ácido N-acetilmurâmico
PBP	Proteínas ligadoras de penicilina
AC	Ácido clavulânico
PEG	Polietileno glicol
k	Coefficiente de partição
SDFA	Sistema de duas fases aquosas
OUR	Taxa de absorção específica de oxigênio pelas células
OTR	Taxa de transferência de oxigênio
$k_L a$	Coefficiente volumétrico de transferência de massa
DAUFPE	Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
ATCC	American Type Culture Collection
$\mu_{Xmáx}$	Velocidade máxima de crescimento (h^{-1})
P_{AC}	Produtividade do ácido clavulânico (mg/L.h)
Y	Rendimento de produção do AC
gX	Gramas de células
gS	Gramas de substrato
mgP	Miligramas de produto
FS	Farinha de soja
(C)	Pontos centrais
x_i	Variável independente
R^2	Coefficiente de determinação
F	Fator de Fisher
$Y_{x/s}$	Rendimento da biomassa em substrato consumido (g/g)
$Y_{p/s}$	Rendimento do consumo de substrato em produto (mg/g)
$Y_{p/x}$	Rendimento do AC sobre a biomassa produzida (mg/g)
MSR	Metodologia de superfície de resposta
$\hat{y}$	Variável-resposta
b_0	Intercepta
b_i	Coefficiente linear para cada variável independente
b_{ii}	Coefficiente quadrático para cada variável independente
b_{ij}	Coefficiente linear para a interação de duas variáveis independentes
x_j	Variável independente
ANOVA	Análise de variância
k_{AC}	Constante de formação
k_i	Constante do desdobramento no equilíbrio
k_d	Constante de degradação
E	Forma ativa da enzima
EI	Forma inativa da enzima
K_1	Constante cinética da reação direta do equilíbrio (h^{-1})
K_2	Constante cinética da reação inversa do equilíbrio (h^{-1})
E^*	Energia de ativação da formação do AC (kJ/mol)
A	Constante de Arrhenius (h^{-1})
R	Constante do gás ideal (8,3145 J / mol.K)

T	Temperatura absoluta (K)
E^*	Energia de ativação
ΔH^*	Variação de entalpia padrão da etapa de formação do AC
ΔS^*	Variação da entropia padrão da etapa de formação do AC
ΔG^*	Energia livre da etapa de formação do AC
ΔH_i^*	Variação de entalpia padrão do desdobramento da enzima no equilíbrio
ΔS_i^*	Variação da entropia padrão do desdobramento da enzima no equilíbrio
ΔG_i^*	Energia livre da etapa de desdobramento da enzima no equilíbrio
E_d^*	Energia de ativação relacionada com a degradação
ΔH_d^*	Variação de entalpia padrão da etapa de degradação do AC
ΔS_d^*	Variação da entropia padrão da etapa de degradação do AC
ΔG_d^*	Energia livre da etapa de degradação do AC
k_B	Constante de Boltzmann ($1,380658 \cdot 10^{-23}$ J/K)
h	Constante de Plank ($6,6260755 \cdot 10^{-34}$ J.s).
r^2	Coefficiente de correlação
$N^3 D^2$	<i>Power number</i> (relacionado com a distribuição de forças totais sobre o <i>impeller</i>)
V_S	Velocidade superficial do gás
α	Expoente do <i>Power number</i>
β	Expoente da velocidade superficial do gás
DO	Oxigênio dissolvido
SFE	Sistema de fermentação extrativa utilizando SDFA
SF	Meio simples de fermentação
dC/dt	Balanco de massa do oxigênio dissolvido no meio de cultivo
C	Concentração de O_2 acumulado na fase líquida
C^*	Concentração de oxigênio saturado no meio de cultivo
P	Potência de agitação mecânica na dispersão de gás liquefeito (W)
V_L	Volume de líquido (m^3)
A	Constante
$k_L a_t$	Coefficiente volumétrico de transferência de massa do meio de fermentação simples (s^{-1})
$k_L a_{ef}$	Coefficiente volumétrico de transferência de massa do sistema de fermentação extrativa (s^{-1})
DEP	Desvio do erro padrão
PFF	Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}
PCC	Planejamento central composto
C_S	Concentração em mg/L de AC na fase superior
C_I	Concentração em mg/L de AC na fase inferior
η_s	Rendimento da fase superior do sistema de duas fases aquosas (%)
η_I	Rendimento da fase inferior do sistema de duas fases aquosas (%)
V_0	Volume inicial do inóculo (mL)
C_{R0}	Concentração inicial de AC (mg/L)
V_f	Volume da fase superior ou inferior (mL)
C_f	Concentrações de AC extraído em cada fase (mg/L)
BM	Balanco de massa
DOT	Taxa de oxigênio dissolvido
$Q_{O_2} \cdot C_x$	Concentração de O_2 consumido pelo crescimento celular

RESUMO

VIANA MARQUES, D.A. **Produção e extração de ácido clavulânico de *Streptomyces* spp. por fermentação extrativa utilizando sistemas de duas fases aquosas.** 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O ácido clavulânico (AC) é um potente inibidor de β -lactamases utilizado na área médica. Métodos alternativos, econômicos e simples para sua purificação são de grande interesse. Este trabalho objetivou produzir e extrair AC de *Streptomyces* spp. por fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA) - polietileno glicol (PEG)/sais fosfato. Foi selecionado o melhor produtor de AC entre sete linhagens de *Streptomyces* spp. Avaliou-se a influência de cinco fatores no cultivo do melhor produtor em frascos agitados (pH, temperatura, velocidade de agitação, concentrações das fontes de nitrogênio e de carbono), utilizando planejamento experimental estatístico. Definidas as melhores condições de cultivo, foram estudadas a produção e a extração do AC em fermentação extrativa utilizando SDFA em frascos agitados e em sistema descontínuo utilizando biorreator. Em biorreator também foram realizados o estudo termodinâmico do processo de fermentação nas condições ótimas obtidas nas etapas anteriores e a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_{La}), comparando os sistemas de fermentação no meio de cultivo simples (SF) e fermentação extrativa utilizando sistema SDFA PEG/sais fosfato (SFE) sem e com crescimento microbiano. A linhagem de *Streptomyces* selecionada como a melhor produtora de AC foi a DAUFPE 3060, a qual apresentou a maior produção desse inibidor, 494 mg/L em 48h, em frascos agitados nas condições: pH 6,0, 32°C, 150 rpm, 5 g/L de glicerol e 20 g/L de farinha de soja. Após a etapa de otimização realizada para o estudo da temperatura e da concentração de farinha de soja, variáveis mais significativas no estudo de seleção, a temperatura e a concentração de farinha de soja ótimas, foram 32°C e 40 g/L, respectivamente, com produção de 629 mg/L de AC em 48h. O estudo termodinâmico confirmou que a temperatura de 32°C é a máxima de produção do AC; após esse valor, inicia-se, gradualmente, a degradação do AC. No estudo da determinação do coeficiente de transferência de massa, k_{La} , sem crescimento microbiano, observaram-se valores maiores de k_{La} para o SF, devido à viscosidade do PEG utilizado no SFE. A massa molar do PEG e a velocidade de agitação foram as variáveis que mais influenciaram na extração de AC no SFE em frascos agitados, apresentando comportamento semelhante em biorreator. E, finalmente, o estudo da transferência de oxigênio do SFE utilizando SDFA com crescimento microbiano foi avaliado para otimizar a produção e a extração de AC. Os resultados obtidos demonstraram que existe uma faixa ideal de velocidade de agitação e de aeração para evitar o rompimento celular e aumentar a recuperação de AC.

Palavras-chave: Ácido clavulânico. *Streptomyces*. Fermentação extrativa. Sistema de duas fases aquosas. Produção. Extração.

RIASSUNTO

VIANA MARQUES, D.A. **Produzione ed estrazione dell'acido clavulanico da *Streptomyces* spp. mediante fermentazione estrattiva utilizzando sistemi a due fasi acquose.** 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Questo progetto di dottorato ha la finalità di produrre ed estrarre acido clavulanico (AC) mediante fermentazione estrattiva di *Streptomyces* spp. utilizzando un sistema di due fasi acquose (SDFA) Polietilenglicole (PEG)/sali di fosfato. L'applicazione di questo metodo integrato (fermentazione ed estrazione) è una proposta alternativa per ottenere alte rese di prodotto, oltre a presentare un buon rapporto costi/benefici. L'acido clavulanico è un inibitore di β -lattamasi molto utilizzato nel settore medico. La conoscenza ed il miglioramento della sua formazione e della sua produzione sono punti importanti per un buon recupero del prodotto. Inizialmente è stata realizzata una selezione del miglior produttore di AC fra 7 varietà di *Streptomyces* spp. Dopo questa tappa è stata valutata l'influenza di cinque fattori sulla produzione batch del miglior ceppo produttore in matracci agitati (pH, temperatura, velocità di agitazione, concentrazioni della fonte d'azoto e della fonte di carbonio) utilizzando una pianificazione sperimentale statistica. Una volta definite le migliori condizioni di coltura, sono state studiate la produzione e l'estrazione di AC in fermentazione estrattiva utilizzando SDFA in fiasche agitate e valutati i parametri fermentativi e di estrazione. Sono stati poi valutati gli stessi parametri in sistema discontinuo utilizzando un bioreattore. La concentrazione di AC è stata analizzata tanto in matracci agitati quanto in bioreattore al fine di studiare l'aumento del grado di purezza e della produttività. Nel bioreattore sono stati effettuati anche lo studio termodinamico del processo di fermentazione in condizioni ottimali determinate nelle fasi precedenti e della determinazione del coefficiente volumetrico di trasferimento di massa (k_{La}), confrontando il sistema di fermentazione in mezzo di coltura semplice (SF) e quello di fermentazione estrattiva (SFE), utilizzando un SDFA PEG/sali di fosfato. Il ceppo di *Streptomyces* selezionato come miglior produttore di AC è stato DAUFPE 3060, che ha mostrato la più alta produzione di questo inibitore (494 mg/L in 48h) in matracci agitati alle condizioni di pH 6,0, 32 °C, 150 rpm, 5 g/L di glicerolo e 20 g/L di farina di soia. Lo studio di ottimizzazione, eseguito per studiare gli effetti della temperatura e della concentrazione di farina di soia, ossia delle variabili rivelatesi di maggior importanza per il processo, ha consentito di determinare quali valori ottimali di queste variabili 32 °C e 40 g/L rispettivamente, in corrispondenza dei quali la produzione di AC dopo 48h è risultata pari a 629 mg/L. Lo studio termodinamico ha confermato che 32 °C è la temperatura della produzione massima di AC; infatti, oltre questo valore si è verificata la progressiva degradazione di AC. Nello studio di k_{La} senza crescita microbica, sono stati osservati i valori più elevati di k_{La} in SF, mentre la viscosità della soluzione di PEG utilizzata nel SFE si è rivelata uno dei fattori che influenzano la velocità d'agitazione e l'aerazione del sistema. La massa molare del PEG e la velocità d'agitazione sono le variabili che maggiormente hanno influenzato l'estrazione di AC in SFE in matracci agitati, con un comportamento simile in bioreattore. Infine, è stato effettuato uno studio del trasferimento di ossigeno in presenza di crescita microbica al fine di ottimizzare la produzione e l'estrazione di AC in SFE utilizzando SDFA. I risultati ottenuti hanno dimostrato che esiste una gamma ideale di velocità di agitazione e di aerazione per evitare la rottura delle cellule e aumentare il recupero di AC.

Parole-chiave: Acido clavulanico. *Streptomyces*. Fermentazione estrattiva. Sistemi a due fasi acquose. Produzione. Estrazione.

ABSTRACT

VIANA MARQUES, D.A. **Production and extraction of clavulanic acid from *Streptomyces* spp. by extractive fermentation using aqueous two-phase system.** 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Clavulanic acid (CA) is a potent inhibitor of β -lactamases used in the medical field. Alternative methods, economic and simple purification are of great interest. This PhD project aims to produce and extract clavulanic acid of *Streptomyces* spp. By extractive fermentation using aqueous two-phase system (ATPS) - Polyethylene glycol (PEG)/phosphate salts. The best producer of clavulanic acid among seven strains of *Streptomyces* spp was selected. The influence of five factors in the cultivation of the best producer in flasks (pH, temperature, agitation velocity, concentrations of nitrogen and carbon sources) using statistical experimental design was evaluated. Defined the best cultivation conditions, the production and extraction of clavulanic acid by extractive fermentation using ATPS in flasks and in a batch system using a bioreactor was analyzed. In batch system using a bioreactor were also carried out the thermodynamic study of the fermentation process in optimum conditions determined in previous steps and also determined the volumetric mass transfer coefficient (k_{La}) comparing the fermentation systems in simple culture medium (SF) and in a extractive fermentation using aqueous two-phase system (ATPS) PEG/phosphate salts (SEF) medium with and without microbial growth. A strain of *Streptomyces* spp. selected as the best producer of AC was DAUFPE 3060, which showed the highest production of this inhibitor, 494 mg/L at 48h, in flasks under the conditions of pH 6.0, 32 °C, 150 rpm, 5 g/L of glycerol and 20 g/L of soybean flour. After the optimization step, the most significant variables in the study selection, temperature and concentration of soybean flour, were studied. The optimal values were 32 °C and 40 g/L of temperature and soybean flour concentration, respectively, with production of 629 mg/L of CA after 48h of cultivation. The thermodynamic study confirmed that 32 °C is the maximum temperature production of CA, after this value, starts gradually, the degradation of CA. In the study of volumetric mass transfer coefficient, k_{La} , without microbial growth, showed higher values of k_{La} for the SF, because the high viscosity of the PEG used in the SFE. The PEG molar mass and agitation velocity were the variables that most influenced the extraction of CA in flasks using a SFE, with similar behavior in a bioreactor. Finally, the study of oxygen transfer rate in SFE using ATPS with microbial growth was evaluated to optimize the production and extraction of CA. The results showed that there is an ideal range of agitation and aeration to prevent cell disruption and increase the CA recovery.

Keywords: Clavulanic acid. *Streptomyces*. Extractive fermentation. Aqueous two-phase system. Production. Extraction.

INTRODUÇÃO

Os benefícios econômicos e estratégicos dos processos biotecnológicos para produção de novos antibióticos, agentes terapêuticos, probióticos, produtos químicos, enzimas e polímeros para aplicações industriais; biorremediação de poluentes, biolixiviação e recuperação de minérios estão relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis. Outros benefícios incluem o prognóstico e a prevenção de doenças emergentes em seres humanos, animais e plantas (PITLOVANCIV, 2005).

Assim, a diversidade de estruturas e alvos terapêuticos produzidos através do metabolismo de bactérias e outros microrganismos podem suprir esta demanda ou minimizar este problema (HARVEY, 2000). A busca de novas fontes produtoras de agentes terapêuticos, bem como a otimização da produção e da purificação desses bioprodutos, são ideais para o sucesso na comercialização (BANIK *et al.*, 2003).

O ácido clavulânico é um potente inibidor de um vasto leque de β -lactamases e é capaz de potencializar a atividade antibacteriana de penicilinas e cefalosporinas contra muitas bactérias produtoras de β -lactamase-resistentes (BAGGALEY *et al.*, 1997).

Embora exista grande variedade de fármacos com função antibiótica em uso clínico, e vários outros em desenvolvimento, o estudo da produção e purificação de ácido clavulânico é uma alternativa, já que há ainda grande demanda por novos compostos, devido ao aumento no número de bactérias patogênicas resistentes a muitos antibióticos comercializados sem controle médico (BANIK *et al.*, 2003).

O processo de purificação do ácido clavulânico inclui uma série de etapas. No final do cultivo, o meio é clarificado por filtração ou centrifugação e o micélio do *Streptomyces* é descartado. A extração inclui diversos processos, tais como adsorção, cromatografia de troca iônica ou extração líquido-líquido com solvente orgânico. Os dois primeiros métodos de separação são, ainda hoje, por apresentarem altos rendimentos, os mais utilizados para componentes de baixo peso molecular presentes em soluções diluídas, como é o caso dos antibióticos produzidos por bioprocessos, por apresentarem altos rendimentos (BARBOZA *et al.*, 2003).

No caso do ácido clavulânico, o rendimento dos processos de purificação por troca iônica, adsorção e extração líquido-líquido com solvente orgânico é geralmente baixo, pois ocorre a rápida degradação dessa biomolécula. Por esse motivo, com a expansão no uso do ácido clavulânico pela indústria farmacêutica, novos métodos de purificação, com objetivo de

aumentar o rendimento e diminuir os custos, despertam grande interesse (BUTTERWORTH, 1984; MAYER; DECKWER, 1996).

Dentre os diferentes sistemas de extração líquido-líquido, o sistema de bioconversão ou fermentação extrativa proporciona vantagens maiores que a fermentação convencional, principalmente em relação ao menor custo na recuperação do produto. Na fermentação extrativa ocorrem as etapas de produção e de extração da molécula simultaneamente, sendo que as células e os contaminantes podem se concentrar de preferência em uma das fases do sistema, enquanto a biomolécula-alvo (produto), na outra fase. Tal situação facilitaria a remoção da molécula de interesse do seu local de produção logo que esta fosse formada, eliminando a influência de inibidores, bem como realizando a purificação primária e aumentando a produtividade volumétrica de processos biotecnológicos (SINHA *et al.*, 2000).

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Produzir e extrair ácido clavulânico a partir de linhagens de *Streptomyces* pelo processo de fermentação extrativa em SDFA (PEG/fosfato) em frascos agitados e em biorreator.

Objetivos específicos

1. Selecionar a melhor de seis linhagens de *Streptomyces* produtoras de ácido clavulânico recomendadas e cedidas pelo Departamento de Antibióticos da UFPE.
2. Avaliar o efeito das condições de cultivo (pH, temperatura, agitação, concentrações das fontes de nitrogênio e carbono), em frascos agitados, com a melhor linhagem de *Streptomyces* previamente selecionada, na produção do ácido clavulânico utilizando planejamento estatístico.
3. Fazer o estudo termodinâmico do processo fermentativo.
4. Comparar o coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_La) nos sistemas de fermentação convencional e fermentação extrativa em SDFA em biorreator sem crescimento microbiano.
5. Verificar a produção e a extração do ácido clavulânico no sistema de fermentação extrativa em SDFA e estudar as variáveis de extração (massa molar do PEG, concentrações do PEG e de sais fosfato e velocidade de agitação) em frascos agitados, utilizando planejamento experimental.
6. Estudar a influência das variáveis, velocidade de agitação e aeração, no sistema de fermentação extrativa em SDFA em biorreator com crescimento microbiano.

CAPÍTULO I

Este capítulo apresenta uma revisão geral e atualizada da literatura, a qual serviu de subsídio para análise e posterior discussão dos resultados apresentados nos demais capítulos. Nele é possível encontrar vários tópicos, como: a descrição do gênero *Streptomyces* e sua capacidade de produzir antibióticos; a importância do ácido clavulânico como inibidor de β -lactamases; os sistemas líquido-líquido na purificação de biomoléculas e os fatores que podem interferir no sistema; o uso desses sistemas como fase para condução da fermentação extrativa com a finalidade de produzir e extrair simultaneamente o ácido clavulânico.

I. REVISÃO DA LITERATURA

I.1 Gênero *Streptomyces*

A família *Streptomycetaceae* (ordem *Actinomycetales*) inclui mais de 500 espécies. O gênero *Streptomyces* (Figura I.1) é representado na natureza por grande número de espécies e variedades, as quais diferem na morfologia, na fisiologia e nas atividades bioquímicas. Seguramente, a produção de antibióticos é a característica mais importante e estudada dos actinomicetos, principalmente do gênero *Streptomyces*, o qual produz a maioria dos antibióticos utilizados em humanos, na veterinária e na agricultura (FGUIRA *et al.*, 2005; CHATER, 2006). 75% desse gênero são utilizados na clínica médica, aumentando, assim, a importância econômica do grupo dos actinomicetos (TADDEI *et al.*, 2005).

Figura I.1. Imagem de microscopia eletrônica de *Streptomyces* spp. Fonte: SCIENCE PHOTO LIBRARY

Os *Streptomyces* são de vida livre terrestre e vivem principalmente em solos (saprofíticos). Embora esse *habitat* seja, sem dúvida, o mais comum para os *Streptomyces*, existem muitas evidências de que algumas espécies colonizam a rizosfera de raízes e mesmo tecidos vegetais; em alguns casos a produção natural de antibióticos por espécies de *Streptomyces* pode proteger as plantas contra potenciais agentes patogênicos; o simbionte, por sua vez, adquire nutrientes da planta (CASTILLO *et al.*, 2002; TOKALA *et al.*, 2002). Existem também indícios de crescimento dos actinomicetos em solos marinhos (MINCER *et al.*, 2002).

Os *Streptomyces* apresentam ciclo de vida complexo, que se inicia com a germinação de esporos, originando um micélio vegetativo formado por hifas ramificadas (primárias) que penetram no substrato, metabolizando fontes orgânicas, tais como polissacarídeos, proteínas, lipídios e compostos aromáticos, pela ação de enzimas extracelulares (PAMBOUKIAN, 2003). Do micélio vegetativo é originado o micélio aéreo (hifas aéreas), as quais passam por um processo de diferenciação morfológica que pode incluir septação e formação de esporos. Esses microrganismos são caracterizados por apresentarem metabolismo secundário completo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2005). Por esse motivo, são capazes de produzir grande quantidade de compostos biológicos ativos; entre esses, cerca de 21 metabólitos secundários (IVES; BUSHELL, 1997). Esse gênero é utilizado em grande escala para produção de mais de 50% dos compostos antimicrobianos empregados rotineiramente em medicina e em medicina veterinária (PEACOCK, 2003).

Streptomyces clavuligerus é um actinomiceto bem conhecido por sua capacidade de produzir antibióticos β -lactâmicos (PARADIKAR *et al.*, 2001). Essa espécie é uma bactéria Gram-positiva estritamente aeróbia. A sua morfologia é filamentosa e apresenta aspecto viscoso no crescimento em meio de cultivo líquido; podem crescer em forma de “pellets” ou livremente em forma de micélios dispersos (ROUBOS *et al.*, 2002).

Streptomyces clavuligerus produz alguns antibióticos β -lactâmicos, tais como: isopenicillina N, desacetoxicefalosporina C e cefamicina C. Os dois primeiros são derivados da cefamicina C e têm como precursores L-lisina, L-cisteína e L-valina. O mesmo microrganismo produz outro grupo estruturalmente relacionado aos compostos β -lactâmicos, os clavulans, os quais se diferenciam pela substituição do enxofre pelo oxigênio como heteroátomo na fusão do sistema dos dois anéis cíclicos. O mais conhecido destes compostos é o ácido clavulânico que possui atividade antibiótica fraca, mas atividade muito potente como inibidor de β -lactamases (PARADIKAR *et al.*, 2001).

I.2 Antibióticos: importância e produção

O primeiro antibiótico descoberto foi a penicilina em 1928 por Alexander Fleming, que estudava a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*, ao observar uma lise bacteriana na placa devido a uma contaminação fúngica. Durante os anos de 1950 e 1960, muitos medicamentos antibacterianos (tetraciclina, eritromicina, kanamicina e outros), antifúngicos (candidina e nistatina) e antineoplásicos (adriamicina) foram descobertos por pesquisas acadêmicas e industriais (CHALLIS; HOPWOOD, 2003). Todavia, a velocidade de descoberta caiu drasticamente após os anos 1970, sendo que, atualmente, diversos esforços científicos possibilitaram a melhoria dos rendimentos dos bioprocessos na produção de novas drogas (DEMAIN, 2007).

Desde o início da era do antibiótico, a classe médica descobriu a aplicação terapêutica bem sucedida de numerosas classes de antibióticos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e tetraciclina (ESSAK *et al.*, 2001). Desde então, os antibióticos beta-lactâmicos, principalmente penicilinas e cefalosporinas, representam os principais produtos biotecnológicos do mundo, com venda mundial, por dosagem, ao redor de 65% do mercado total dos antibióticos (ELANDER, 2003).

Os antibióticos podem ser classificados de acordo com o seu alvo na superfície da célula bacteriana ou no interior da célula, sejam eles: (i) inibição da biossíntese da parede celular bacteriana pelos antibióticos β -lactâmicos e pela classe dos glicopeptídeos, como a vancomicina; (ii) bloqueio seletivo da subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, por aminoglicosídeos e tetraciclina, e das subunidades 50S pela família dos antibióticos macrolídeos; (iii) bloqueio da replicação do DNA bacteriano pela família das quinolonas, exemplificado pela ciprofloxacina; (iv) bloqueio da via biossintética da coenzima folato, essencial para proporcionar unidades monoméricas para a síntese de DNA, por drogas sulfa e trimetoprim (WALSH, 2003).

Embora os antibióticos sejam eficazes no tratamento das infecções, a resistência é uma consequência inevitável da pressão seletiva imposta pelo uso errado dos antibióticos. Um dos mecanismos mais importantes da resistência exibidos por uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é sua habilidade de produzir beta-lactamases; enzimas que desativam penicilinas e cefalosporinas hidrolisando o anel beta-lactâmico (SANDERS; SANDERS, 1979; SPRATT, 1994).

Diferentes estruturas podem estar anexadas ao anel β -lactâmico, dividindo estes antibióticos em cinco classes principais: penicilina, cefalosporina/cefamicina, monobactâmicos, clavans e carbapenêmicos (COULTHURST *et al.*, 2005). Seus efeitos se

dão através da interferência na maquinaria metabólica, responsável pelo crescimento e desenvolvimento da parede celular bacteriana (CHARNAS; KNOWLES, 1981). O alvo desses compostos β -lactâmicos é a reação de transpeptidação do peptidoglicano (ligação-cruzada) (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997).

Inicialmente, na superfície da membrana plasmática, glicosilases polimerizam as subunidades de dois açúcares, N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), entre si na rede de peptidoglicano crescente; em seguida, peptidoglicanos são sintetizados em três etapas, sendo que a última, que culmina no término da formação da ligação cruzada, envolve uma transpeptidação por transpeptidase ligada à membrana. A ligação cruzada entre os peptídeos de dois resíduos de NAM dá-se pela ligação do resíduo de diaminopimelato de um NAM com o resíduo de D-alanina de outro. Durante a reação de transpeptidação, a D-alanina terminal é removida de uma das cadeias peptídicas, enquanto que a D-alanina restante torna-se ligada ao diaminopimelato em outra cadeia peptídica (Figuras I.2 A e B) (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997).

A ligação da penicilina (e cefalosporinas) às PBP (proteínas ligadoras de penicilina) gera inibição dessa transpeptidação e, portanto, influencia a síntese da parede celular. Essa inibição das transpeptidases parece decorrer da semelhança dos β -lactâmicos com a acil-D-alanil-D-alanina, uma vez que a reação de transpeptidação envolve a perda de uma D-alanina do pentapeptídeo precursor do proteoglicano (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997).

A

B

Figura I.2 A e B. Mecanismo de ação dos antibióticos β -lactâmicos através da inibição da síntese da parede celular. Fonte: Adaptado do Atlas, *PRINCIPLES OF MICROBIOLOGY*, 1997

A introdução de antibióticos β -lactâmicos nos sistemas de saúde nas últimas fases da Segunda Guerra Mundial representou uma das mais importantes contribuições para as ciências médicas na história recente. Hoje em dia, os antibióticos β -lactâmicos são utilizados mais amplamente devido à alta eficiência, ao baixo custo, à facilidade de venda e aos mínimos efeitos colaterais. Em sentido prático, o baixo custo de produção de antibióticos β -lactâmicos permite ampla disponibilidade na obtenção e na venda do produto (WILKE *et al.*, 2005).

Os antibióticos correspondem a 12% de todas as prescrições ambulatoriais nos Estados Unidos. Isso gera dispêndio de 15% dos 100 bilhões de dólares gastos anualmente com medicamentos (PITLOVANCIV, 2005). Houve aumento na produção de medicamentos em vários setores, com destaque para a fabricação de novos antibióticos (SHALES; PROJAN; EDWARDS, 2004). Em contrapartida, houve também diminuição da aprovação de novos agentes antimicrobianos no período de 1997 a 2002. Isso se deve, talvez, pela dificuldade na aprovação e na liberação desse tipo de produto (BUSH, 2004).

No Brasil, a intenção do Ministério da Saúde é de, se não recuperar, de pelo menos atenuar os efeitos desse tempo perdido. O déficit comercial do setor de saúde é estimado em US\$ 6 bilhões e a meta é reduzi-lo para US\$ 4,4 bilhões (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). O governo também pretende desenvolver tecnologia para a produção local de 20 produtos estratégicos do SUS até 2013. Hoje, o Ministério da Saúde importa US\$ 8 bilhões de outros países e exporta apenas US\$ 2 bilhões. Mas esse cenário deve mudar nos próximos anos com o conjunto de ações governamentais voltadas ao Complexo Industrial da Saúde (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Como tática para mudança desse cenário, prevê-se que o Ministério da Saúde utilize produtos estratégicos para o Sistema Único de Saúde que terão a produção incentivada no Brasil (Portaria 978/2008), entre os quais estarão os medicamentos antirretrovirais, vacinas, soros, hemoderivados, antibióticos e equipamentos como mamógrafos. Segundo dados oficiais, o investimento previsto no Programa PROFARMA do Ministério da Saúde entre os anos 2009 e 2013 será de 3 bilhões de reais na produção de novos medicamentos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

I.3 Ácido clavulânico: um potente inibidor de β -lactamases

β -lactamases são enzimas serino-dependentes produzidas por bactérias resistentes a algumas classes de antibióticos, tais como penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. Baseado nas variações da sequência de aminoácidos, as enzimas β -lactamases foram divididas nas classes A, B, C, e D (BUSH, 1998; BUSH; JACOBY, 1995). A identificação de mais de 340 enzimas β -lactamases diferentes foi essencial para o tratamento das infecções bacterianas (LEE *et al.*, 2003). Uma moderna estratégia para lidar com estes problemas foi a descoberta e o desenvolvimento de potentes e seletivos inibidores dessas enzimas, aumentando a atividade antimicrobiana intrínseca, de tal forma que os antibióticos fossem protegidos da atividade hidrolítica das diversas β -lactamases (GRANT *et al.*, 2000; REED, 1998).

Outro fator que contribuiu para a resistência das bactérias foi o uso generalizado de antibióticos β -lactâmicos por mais de 50 anos. Como consequência, estratégias que visavam superar esse mecanismo de resistência tornaram-se de interesse crescente. β -lactamases catalisam a hidrólise dos anéis β -lactâmicos de penicilinas e cefalosporinas e os seus produtos de hidrólise não têm qualquer atividade antibiótica (BAGGALEY *et al.*, 1997).

Vários aspectos do mecanismo de resistência e do desempenho clínico foram revisados (CARTWRIGHT; WALEY, 1983; PRATT, 1992). Entretanto, existem alguns fatores que determinam se a combinação do inibidor-antibiótico obterá sucesso terapêutico. Existem problemas com o transporte, a combinação das propriedades farmacocinéticas dos dois medicamentos, a duração do efeito do inibidor e do antibiótico e a reação sob as diferentes circunstâncias ocorridas nas infecções que podem ou não influenciar na resposta ao tratamento e, conseqüentemente, produzir uma combinação eficaz (LIVERMORE, 1993).

As tentativas de encontrar um inibidor de β -lactamases foram realizadas entre 1940 e 1950, mas sem sucesso. No início de 1967, um programa de seleção de microrganismos para a

produção natural de inibidores foi iniciado. Foi nesse processo que se descobriu o ácido olivânico e o ácido clavulânico (ROLINSON, 1991).

O ácido clavulânico (AC) é uma substância produzida naturalmente pelo *Streptomyces clavuligerus* (BROWN *et al.*, 1976). Foi demonstrado que o ácido clavulânico era semelhante às penicilinas e às cefalosporinas com dois anéis cíclicos ligados, porém com uma diferença: esses anéis eram fundidos por um átomo de oxigênio em substituição ao enxofre (Figura I.3). Esta estrutura é diferente de um β -lactâmico natural, pois tem um β -hidroxietilideno substituindo o C-2 e não possui um acilamino no grupo C-6 (LEE *et al.*, 2002).

Figura I.3. Estruturas químicas da penicilina (1) e do ácido clavulânico (2) (DEMAIN; ELANDER, 1999)

Esse antibiótico tem uma atividade fraca (concentração inibitória mínima de 25 a 125 $\mu\text{g/mL}$), mas constitui-se um poderoso inibidor de β -lactamases (READING; COLE, 1977), pois liga-se irreversivelmente à serina do grupo hidroxila do centro ativo das β -lactamases, produzindo um intermediário acilado estável e, assim, inativando a enzima (BAGGALEY *et al.*, 1997; FOULSTONE; READING, 1982). A Figura I.4 apresenta a formação do intermediário acilado da enzima pela ligação do ácido clavulânico, inativando-a. O clavulanato de potássio pode ser encontrado em associação com a penicilina semi-sintética amoxicilina (AugmentinTM) ou com ticarcilina (TimentinTM) (WATVE *et al.*, 2000), sendo a combinação com a amoxicilina a mais comercializada, tendo gerado 1,3 bilhão de dólares em vendas no ano de 2000 (ELANDER, 2003). No Brasil, o medicamento CLAVULIN[®], comercializado pela SMITHKLINE BEECHAM Farmacêutica, é um exemplo deste tipo de associação.

Figura I.4. Reencaminhamento da acilo-enzima intermediária pelo ácido clavulânico para inativar β -lactamases (WALSH, 2003).

Atualmente, apenas três inibidores de β -lactamases são usados na clínica em combinação com antibióticos β -lactâmicos (Figura I.5): ácido clavulânico (administrado em combinação com amoxicilina ou ticarcilina); sulbactam (em combinação com ampicilina); e tazobactam (em combinação com piperacilina). São inibidores eficazes contra a classe A das enzimas. No entanto, combinações desses dois últimos inibidores/antibióticos são as menos eficazes contra a classe C e a classe B, incluindo algumas bactérias produtoras de β -lactamases de largo espectro (ESBL) (VENKATESAN *et al.*, 2004).

Figura I.5. Estruturas químicas dos inibidores de β -lactamases mais utilizados. Ácido clavulânico (1), sulbactam (2) e tazobactam (3) (VENKATESAN *et al.*, 2004)

Os processos de obtenção industrial e purificação do ácido clavulânico são pouco documentados na literatura; por esse motivo, o conhecimento e o melhoramento de sua obtenção e sua produção são importantes para diminuir os custos desses processos (ELANDER, 2003).

I. 4 Sistema de duas fases aquosas (SDFA)

Segundo Albertsson (1986), os sistemas de duas fases aquosas foram primeiramente descritos quando se misturou gelatina, ágar e água, em certas concentrações, e visualizou-se um sistema de duas fases, sendo a fase superior rica em gelatina e a fase inferior rica em ágar. Posteriormente, Albertsson (1986) nos anos 50 descobriu que o polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água, assim como PEG e dextrana e água, formavam sistemas de duas fases. Os sistemas PEG/dextrana/água e PEG/sal/água têm sido, desde então, os mais frequentemente investigados e utilizados para purificação de grande número de biomoléculas (COSTA *et al.*, 1998, 2000; DIAMOND; HSU, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Foi Albertsson que reconheceu a possível utilização destes sistemas como método de separação aplicado a biomoléculas, partículas celulares e células intactas sob condições que preservem a sua atividade biológica, estabelecendo grande número de diagramas de fase de vários sistemas de duas fases aquosas, descrevendo também as suas propriedades físico-químicas básicas (DIAMOND; HSU, 1992).

Os sistemas de duas fases aquosas são geralmente formados por uma solução aquosa de dois polímeros hidrófilos, ou de um polímero com determinados sais. Acima da concentração crítica destes componentes ocorre espontaneamente a separação de fases, predominando um ou outro componente em cada uma das duas fases resultantes (TUBIO; NERLI; PICÓ, 2004).

Uma das características importantes dos sistemas de duas fases aquosas é ser constituído por cerca de 85 a 90% de água, o que permite a partição de biomoléculas e de partículas celulares em condições não desnaturantes. As propriedades físicas dos sistemas bifásicos aquosos podem ser alteradas por manipulação da concentração dos polímeros e sais de sua composição. Sendo assim, a partição de moléculas e de partículas biológicas pode ser explorada para obtenção de separações, que de outro modo seriam difíceis ou mesmo impossíveis de serem realizadas (GAVASANE; GAIKAR, 2003; VENÂNCIO, 1996).

As principais vantagens na purificação de biomoléculas pelo sistema de duas fases aquosas são: facilidade no aumento da escala; rápida transferência de massa; equilíbrio alcançado com recursos com baixa energia na forma de mistura mecânica; possibilidade de operação rápida e seletiva; possibilidade de operação à temperatura ambiente e mais economia do que em outros processos de separação (ALBERTSSON, 1986).

Os sistemas bifásicos aquosos têm grande potencial para a separação eficiente e de baixo custo de proteínas que são difíceis de ser separadas em grande escala. Estes sistemas têm como vantagens importantes, a habilidade de extrair pequenos materiais particulados

(extração direta do meio fermentado) e a obtenção de grandes volumes em uma modalidade contínua com tempo de contato curto. Os recentes avanços na obtenção de elevados fatores de purificação para a separação da proteína alvo de seus contaminantes usando SDFA foram bem sucedidos na escala de laboratório e em operações industriais. Isto é, em parte, devido ao conhecimento da engenharia básica e do entendimento dos sistemas (MERCHUK *et al.*, 1998).

I. 5 Sistemas de duas fases aquosas compostos de PEG/sais

Embora os sistemas de duas fases aquosas estejam sendo cada vez mais utilizados para separação de uma vasta gama de materiais biológicos, a literatura apresenta poucos estudos da aplicação de SDFA para extração de moléculas de baixo peso molecular, como os antibióticos. A maior razão para isso deve-se ao fato de que, em considerações teóricas, a partição de moléculas pequenas se dá, mais ou menos, igualmente entre as duas fases neste tipo de sistema (YANG; CHU, 1990). Os sistemas de duas fases aquosas formados por PEG/sais fosfato, utilizados para extração de moléculas diversas, são maioria na literatura (GÜNDÜZ; KORKMAZ, 2000; MAYERHOFF; ROBERTO; FRANCO, 2004; SRINIVAS *et al.*, 2002;). Em geral, para se determinar o local de partição da biomolécula no SDFA, se faz o cálculo do coeficiente de partição (k), que é a razão entre a concentração do produto na fase extraída (C_e) e a concentração do produto na fase refinada (C_r) do sistema.

Yang e Chu (1990) estudaram a extração da penicilina G do caldo fermentativo e de uma solução pura por PEG/sais fosfato e obtiveram valores de coeficiente de partição entre 10,4 e 15,2.

Lee e Sandler (1990) estudaram a separação de vancomicina, um antibiótico glicopeptídico, para examinar os efeitos de pH, de adição de sais e suas respectivas concentrações e de adição de ligantes afins e suas concentrações na partição dessa biomolécula em SDFA composto por PEG (polietilenoglicol)-dextrana e PEG/fosfato. Os valores de k encontrados para o sistema PEG/fosfato em função das concentrações dentre vários sais foram superiores a 100.

Videira e Aires-Barros (1994) realizaram a extração do clavulanato de potássio de uma solução pura, em um SDFA PEG/fosfato, variando o pH, a massa molar do PEG e o comprimento das linhas de amarração (concentrações de PEG e sais). Os autores concluíram que o ácido clavulânico possui alta afinidade pela fase PEG, apresentando altos valores de recuperação (90-99%). Os valores obtidos para o coeficiente de partição foram de 1,5 a 114.

Vale salientar que este é o primeiro trabalho de separação de AC com SDFA que aparece na literatura, porém os autores não trabalharam com AC proveniente do cultivo e não informaram detalhes das condições experimentais.

Yixin *et al.* (1996) realizaram a extração da penicilina do caldo fermentativo em um SDFA PEG/sulfato de amônio, para diferentes massas molares do PEG e concentrações de sulfato de amônio. O maior valor de k obtido foi de 86,12.

Esmanhoto e Kilikian (2001) realizaram a extração do antibiótico retamicina em SDFA PEG/citrato de sódio e estudaram a influência de quatro fatores: massa molar do PEG, pH, tempo de contato entre as fases e força de centrifugação. O mesmo estudo foi realizado pelos autores em 2004, utilizando o SDFA PEG/fosfato de sódio. Os valores do coeficiente de partição para retamicina variaram de 0,63 a 4,71 no SDFA PEG/citrato de sódio e no SDFA PEG/fosfato de sódio; o melhor valor do coeficiente de partição obtido na extração de retamicina foi de 8,2 com rendimento do processo de 91,3%.

Hirata *et al.* (2003) realizaram a extração de AC de meio de fermentação em sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato; esse sistema foi escolhido em função de suas vantagens, tais como atoxidade, facilidade de manuseio e, principalmente, por proporcionar menores perdas do ácido clavulânico por degradação, comparadas à extração por solvente, uma vez que o mesmo é um composto bastante instável. Os autores observaram que é possível obter o k muito superior à unidade (de 15,5 a 2,7) e recuperar altos valores de ácido clavulânico para alguns sistemas (94%).

Bora *et al.* (2005) estudaram a extração de antibióticos do grupo das cefalosporinas em SDFA utilizando PEG 600 e diferentes sais, como: sulfato de sódio, sulfato de amônio e fosfato de sódio. A melhor condição de extração encontrada foi com 20% de PEG 600 e concentração de 20% para os sais de sulfato e fosfato de sódio.

Mokhtarani *et al.* (2008) estudaram a extração do antibiótico ciprofloxacina em SDFA através de planejamento fatorial completo. Quatro variáveis foram estudadas: temperatura, concentração do PEG, concentração do sal e concentração de ciprofloxacina. Ciprofloxacina teve maior afinidade pela fase PEG e nas concentrações maiores de PEG foi observado aumento no coeficiente de partição da ciprofloxacina.

Grande número de processos de extração utilizando sistema de duas fases aquosas tem sido reportado na literatura. Exemplos incluem a extração em SDFA de: proteases a partir de meio fermentado usando PEG/citrato (PORTO *et al.*, 2008); nisina comercial e biossintética usando sistema micelar (JOZALA *et al.*, 2008); partição de proteínas usando PEG/poliacrilato

de sódio (JOHANSSON *et al.*, 2008); alfa-toxina de *Clostridium perfringens* tipo A usando PEG/fosfato (SOARES *et al.*, 2008); glicose-6-fosfato desidrogenase usando micelas reversas (HASMANN *et al.*, 2007); proteases produzidas por *Clostridium perfringens* usando PEG/citrato (PORTO *et al.*, 2007); vacina da dengue 2 DNA plasmidial a partir de células lisadas (MOREIRA *et al.*, 2007); amilase produzida por *Bacillus subtilis* (BEZERRA *et al.*, 2006); glicose oxidase comercial usando micelas reversas (FERREIRA *et al.*, 2005); proteases de *Nocardiosis* spp. utilizando PEG/fosfato (MOREIRA *et al.*, 2005).

I. 6 Fatores que influenciam o sistema de duas fases aquosas

São diversos os fatores que influenciam a formação e a partição de biomoléculas dos sistemas bifásicos aquosos. Entre eles estão os fatores inerentes ao próprio sistema (p.ex: componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura) ou à biomolécula-alvo (p.ex: hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoelétrico e massa molar) (COSTA *et al.*, 1998, 2000; DIAMOND; HSU, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2001; TUBIO; NERLI; PICÒ, 2004).

Os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos não são ainda entendidos por completo. Sabe-se que o coeficiente de partição é resultante de forças de van der Waals, hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e interações iônicas das biomoléculas com as fases do sistema (GÜNDÜZ; KORKMAZ, 2000).

I. 6.1 Massa molar e concentração do polímero

A massa molar do polímero influencia na separação do biomaterial por alteração do diagrama de fase (isto é, por influenciar a composição das fases) e por mudança no número de interações polímero-proteína. Em geral, o aumento na massa molar de um dos polímeros (em sistemas polímero/polímero) leva à separação mais acentuada do material em outra fase. Entretanto, a magnitude desse efeito decresce com o aumento da cadeia do polímero (ALBERTSON, 1986; FORCINITI; HALL, 1991).

Com relação à concentração do polímero, sabe-se da literatura que com seu aumento o sistema de fases desloca-se em direção à região bifásica. As fases também ficam mais viscosas com a elevação na concentração do polímero e isto pode influenciar a partição da biomolécula-alvo (ALBERTSSON, 1986; ASENJO, 1990).

Estudos feitos por Schimidt *et al.* (1994) mostraram que o aumento da concentração de PEG em um sistema PEG/fosfato causa decréscimo de 3,2 vezes no coeficiente de partição da

α -amilase. Em um sistema PEG 4000/fosfato o aumento da concentração de PEG de 14% para 20% proporcionou o acréscimo de 5 vezes no valor do coeficiente de partição da enzima.

I. 6.2 pH e adição de sais

A influência da carga da biomolécula na sua partição pode ser estudada medindo-se o coeficiente de partição em vários valores de pH, pois, como se sabe, a carga de biomoléculas depende do pH. Contudo, esta influência da carga da biomolécula depende muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases. Mudanças no pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação. Em condições extremas de pH é possível que ocorra a desnaturação das proteínas. Geralmente, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não só à maior área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica (ALBERTSSON, 1986). Como regra geral, as proteínas carregadas mais negativamente (nos casos em que o pH é superior ao pI) têm maior afinidade pela fase superior que é rica em PEG.

A composição do sal é outra variável de suma importância na partição de todas as espécies de moléculas e partículas celulares. Embora os sais se separem igualmente entre as fases, existem diferenças significativas no coeficiente de partição das proteínas que têm ou não afinidade pelo tipo de sal utilizado no sistema bifásico (COSTA *et al.*, 1998).

Os sais de fosfato têm maior afinidade pela fase inferior do sistema de duas fases, enquanto que o lítio tem maior afinidade pela fase superior e o NaCl tem afinidade similar entre as duas fases. Portanto, os sais que possuem distribuição diferenciada entre as duas fases são importantes para o sistema, pois terão grande influência na diferença de potencial elétrico entre as fases. Por exemplo, a partição dos íons fosfato para a fase inferior cria um potencial elétrico com uma carga negativa nesta fase que força a partição das macromoléculas ou células carregadas negativamente para a fase superior. Com o aumento da concentração de NaCl, o efeito da distribuição desigual dos íons fosfato pode ser reduzido ou eliminado. Com isto, a mudança na composição iônica pode influenciar, e muito, o coeficiente de partição de uma molécula (FORCINITI, 2002).

I. 6.3 Temperatura

A influência da temperatura é bastante complexa devido ao seu efeito na composição das fases em equilíbrio, assim como a alteração da estrutura da biomolécula e a desnaturação (SARUBBO, 2000).

O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema, polímero/polímero ou polímero/sal. Para o sistema PEG/dextrana, foi constatado que com o aumento da temperatura seria necessária concentração maior dos polímeros para a separação das fases. Neste caso, para que a separação das fases seja favorecida, deve-se trabalhar em temperaturas inferiores à ambiente. Já para PEG/sal, ocorre justamente o contrário, pois em temperaturas maiores ou próximas à ambiente a separação das fases do sistema é facilitada. Foi observado, também, para o sistema PEG/sal, que o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema e, conseqüentemente, ocorre redução da concentração do polímero na fase inferior (FORCINITI *et al.*, 1991; ZASLAVSKY, 1995).

Alguns trabalhos relatam aumento do coeficiente de partição com a temperatura (JOHANSSON *et al.*, 1984); outros indicam que não há relação entre o coeficiente de partição e a temperatura (TJERNELD *et al.*, 1985), demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados para se esclarecer o efeito deste parâmetro sobre a partição.

I. 6.4 Adição de suspensões biológicas

Na recuperação de macromoléculas de caldos fermentados ou de extratos biológicos, uma medida prática usando um sistema de duas fases aquosas (SDFA) envolvendo misturas de polietileno glicol (PEG) e sais tem sido utilizada eficazmente para manuseio de partículas e solutos. No entanto, a aplicação do processo de extração em SDFA para recuperação de produtos de suspensões biológicas requer conhecimentos sobre as desvantagens associadas com a caracterização de SDFA que serão trabalhadas. A presença de biomassa em SDFA tem forte influência na modificação da formação de fases do sistema (ALBERTSSON, 1986).

Rito-Palomares e Cueto (2000) estudaram a influência de suspensões biológicas na formação das fases dos sistemas de duas fases aquosas (SDFA). Três diferentes suspensões biológicas (leveduras rompidas, homogeneizado de *E. coli* e caldo fermentado de *Trichoderma harzianum*) foram selecionadas. Mais rápida formação das fases foi observada na presença de caldo fermentado de *T. harzianum*. Tal comportamento pode ser explicado pela natureza do inóculo utilizado. O caldo fermentado é caracterizado por alta viscosidade, causada pela presença de biopolímeros produzidos durante a fermentação, que tem

contribuição importante para o sistema e reduz a quantidade de reagentes necessários para a formação das duas fases.

I.7 Fermentação extrativa em sistema de duas fases aquosas (SDFA)

O impacto da fermentação na economia total de produção depende fortemente do tipo de produto desejado, isto é, industrial, proteínas terapêuticas e, especialmente, produtos químicos. Isto depende da concentração obtida do produto no caldo fermentado final. De acordo com a escala da economia, o preço de venda de um produto é correlacionado inversamente com sua concentração alcançada no fim da fermentação, podendo variar de 9 a 10 ordens de valor (HENSING, 1995).

Fermentação extrativa, um processo que integra produção e recuperação *in situ* (Figura I.5), é o método de escolha para aumentar o baixo rendimento dos processos de fermentação convencionais. As fermentações extrativas utilizando sistemas de duas fases aquosas são uma alternativa promissora para os processos convencionais, desde que elas forneçam um meio não desnaturante para as biomoléculas e estabilizem as células (SINHA *et al.*, 2000). Dessa forma, a produtividade dos processos pode ser maior.

Figura I.6. Representação simplificada do processo integrado do SDFA e fermentação para produtos extracelulares (RITO-PALOMARES, 2004)

No caso da produção de G6PD, várias técnicas para remover a molécula foram estudadas (por exemplo, usando adsorção, pervaporização e imobilização). No entanto, estes processos têm desvantagens, como efeitos negativos sobre o desempenho do microrganismo (RITO-PALOMARES *et al.*, 2000). Neste contexto, opiniões sobre a recuperação *in situ* de produtos provenientes do caldo fermentado sugerem a aplicação de um sistema de duas fases

aquosas (SDFA) como uma alternativa para extração de produtos biológicos da fermentação (ALBERTSSON, 1986). Fermentação extrativa utilizando SDFA para a purificação de produtos tem sido abordada em especial para produtos protéicos. No entanto, trabalhos relacionados ao uso de SDFA para a recuperação de antibióticos, enzimas, compostos aromáticos e outros ainda necessitam ser realizados (RITO-PALOMARES *et al.*, 2000).

Na fermentação extrativa ideal, as células e o substrato devem se concentrar de preferência em uma das fases do sistema, enquanto que a biomolécula-alvo (produto) deve concentrar-se na fase oposta. Tal situação facilitaria a remoção do produto do seu local de produção logo que este fosse formado, assim eliminando a influência de inibidores, bem como realizando a purificação primária (SINHA *et al.*, 2000).

A recuperação de produtos por bioconversão extrativa, ou *in situ*, tem sido proposta como solução tecnológica para reduzir o número de etapas de purificação dos produtos biotecnológicos, que é de fundamental importância na viabilidade do processo.

A extração de cefalosporina C do caldo de *Acremonium chrysogenum* e a separação desse antibiótico β -lactâmico foram realizadas por extração em sistemas de duas fases aquosas (PEG/sais). Outros tipos de sistemas de duas fases aquosas (PEG/dextrana e outros) têm sido utilizados para recuperação de prednisolona produzida por *Arthrobacter simplex* (SCHÜGERL, 2000).

Alguns processos de fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas têm sido reportados na literatura. Exemplos incluem a produção de: β -glucosidase por *Aspergillus phoenicis* (PERSSON *et al.*, 1989); proteases alcalinas por *Bacillus licheniformis* (LEE; CHANG, 1990); enzimas celulolíticas por *Trichoderma reesei* C30 (PERSSON *et al.*, 1991); etanol-butanol-acetona por *Clostridium acetobutylicum* (KIM; WEIGAND, 1992); surfactina de *Bacillus subtilis* (DROUIN; COOPER, 1992); α -amilase por *Bacillus amyloliquefaciens* (KIM; YOO, 1991; STREDANSKY *et al.*, 1993); subtilina por *Bacillus subtilis* (KUBOI *et al.*, 1994); β -galactosidase por *Escherichia coli* (KUBOI *et al.*, 1995); quitinase de *Serratia marcescens* (CHEN; LEE, 1995); ácido lático por *Lactobacillus lactis* (DISSING; MATTIASSON, 1994; KWON *et al.*, 1996); enzima que hidrolisa “gellan” (polissacarídeo utilizado em substituição ao ágar em meios de cultivo) produzida por *Bacillus thuringiensis* H14 (BANIK; SANTHIAGU, 2002); antibióticos do grupo das cefalosporinas (BORA *et al.*, 2005).

I.8 Fatores importantes no estudo de fermentação extrativa em SDFA na produção e na extração de ácido clavulânico

Como outros compostos β -lactâmicos, o ácido clavulânico apresenta uma forma que é quimicamente instável, pois sua molécula possui um átomo do grupo carbonila do anel β -lactâmico susceptível ao ataque por íons hidróxido OH^- ou H^+ da molécula de água (KONECNY *et al.*, 1973). Alguns grupos de pesquisa têm realizado estudos da estabilidade deste fármaco em solução aquosa sob diferentes condições (BERSANETTI *et al.*, 2005; HAGINAKA *et al.*, 1981; MAYER e DECKER, 1996).

Para citar apenas alguns exemplos, Haginaka *et al.* (1981), que investigaram a estabilidade em diferentes tampões de AC a 35 °C e 0,5 mol/L de força iônica, observaram que na faixa de pH entre 3,1 e 10,1 a taxa de degradação do AC seguiu uma cinética de primeira ordem, fortemente dependente do pH e que aumentava com a concentração do tampão. Além disso, o AC foi mais estável no pH de 6,39: com isso, esses autores concluíram que tanto a catálise ácida como a alcalina modulada pelos tampões de sais desempenham papel significativo na hidrólise.

Bersanetti *et al.* (2005), ao investigarem a estabilidade de AC a partir de várias fontes na faixa de temperaturas 10-45 °C em pH 6,2 e 7,0, observaram que o AC obtido a partir de fermentação foi menos estável que aquele comercial utilizado para fins médicos e que a sua degradação seguiu uma cinética de primeira ordem. Então, eles usaram a equação de Arrhenius para correlacionar a taxa de degradação constante de AC em função da temperatura e para estimar sua energia de ativação. A degradação do produto durante o processo fermentativo é um problema significativo para a indústria farmacêutica, pois leva a perdas na concentração final e na qualidade do produto.

Com a finalidade de contornar esses problemas de produção e degradação do produto final, um novo processo que integra produção e recuperação *in situ* é um método de escolha para aumentar o baixo rendimento dos processos de fermentação convencionais (SINHA *et al.*, 2000). Neste contexto, o estudo do processo de fermentação extrativa em SDFA necessita do controle de pH, de temperatura e, principalmente, de oxigênio para obtenção eficaz do produto final através dos processos de produção e extração simultâneos.

Em biorreatores, a transferência de oxigênio e a sua absorção pelo microrganismo são afetadas pela aeração, agitação e pelas características do meio de cultivo (viscosidade, tensão superficial, etc.). A influência da concentração de oxigênio dissolvido (DO) e do contato do oxigênio com as células durante a fermentação convencional envolvendo *S. clavuligerus* tem sido observada na literatura (ROSA *et al.*, 2005). No entanto, nenhum estudo foi realizado

sobre a difusão de oxigênio nos sistemas de fermentação extrativa, embora esse seja um fator importante (BANIK *et al.*, 2003).

Esses parâmetros, como DO e efeito de contato da biomassa, são importantes e influenciam os bioprocessos que utilizam polietilenoglicol (PEG) como fase polimérica e soluções salinas. Diminuição na taxa de transferência de oxigênio pode ocorrer no meio de cultivo tanto quando se aumenta a concentração do soluto, como com a ação do PEG, pois ocorre a redução na difusão e na solubilidade do oxigênio. A eficiência na aeração depende da solubilização de oxigênio, da taxa de difusão no meio de cultivo e da capacidade do biorreator para suprir a demanda de oxigênio necessária para o crescimento microbiano. No entanto, o oxigênio dissolvido no meio de cultivo é limitado pela taxa de absorção específica de oxigênio (OUR) pelas células, assim como pela taxa de transferência de oxigênio (OTR). O último parâmetro depende do fluxo de ar e pode desempenhar papel importante, muitas vezes sendo o fator limitante do coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_La) e, conseqüentemente, da produtividade do processo (MONTES; CATALAN, 1998).

O k_La , principal parâmetro estudado em cultivos conduzidos em biorreatores agitados, depende de uma série de fatores, tais como: características geométricas e operacionais do biorreator, composição do meio de cultura, viscosidade, tensão superficial, concentração de solutos, morfologia do microrganismo e, principalmente, da área superficial, a , das bolhas de ar (ligada à velocidade de agitação, à homogeneização do meio de cultura, etc.) Os valores do k_La em processos utilizando reatores de tanque agitado podem ser estimados pelo modelo estático (sem crescimento microbiano) com auxílio de equações empíricas (CALDERBAK; MOO-YOUNG, 1961; PEREZ; SANDALL, 1974) e pelo modelo dinâmico (com crescimento microbiano) com base nos valores de OUR e OTR (LAMONT; SCOTT, 1970; ZHANG; THOMAS, 1996).

O k_La também desempenha papel importante no aumento de escala e na análise dos custos do processo (GALACTION *et al.*, 2004). Pesquisas realizadas em sistemas poliméricos, por exemplo, indicam que o valor de k_La é influenciado pela alta viscosidade do PEG (ÇALIK *et al.*, 2000; EICKENBUSCH *et al.*, 1995; KOBAYASHI *et al.*, 1994; KWON *et al.*, 1996). Por esse motivo, o estudo desse fator é indispensável para o conhecimento e a melhoria do processo de fermentação extrativa utilizando SDFA PEG/sais.

Capítulo II

SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *STREPTOMYCES* spp. PRODUTORAS DE ÁCIDO CLAVULÂNICO

Este capítulo refere-se à seleção de linhagem de *Streptomyces* spp., pertencentes à Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, PE, Brasil), possíveis produtoras de ácido clavulânico. Esses resultados estão sendo analisados para a publicação em periódico internacional.

II. 1 RESUMO

O ácido clavulânico (AC) é um inibidor de β -lactamases muito utilizado na área médica. Os benefícios econômicos e estratégicos da produção de novos agentes antimicrobianos estão relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis pelos processos biotecnológicos para novos antibióticos e agentes terapêuticos. O gênero *Streptomyces* é o maior dos produtores de antibióticos entre os actinomicetos. O presente trabalho avaliou a produção do ácido clavulânico por 6 linhagens de *Streptomyces* spp. utilizando farinha de soja como fonte de nitrogênio. A produção destas linhagens foi comparada com a obtida por *S. clavuligerus* (controle). Os microrganismos foram cultivados em agitação orbital (200 rpm) a 28 °C por 168 horas. Alíquotas foram retiradas a cada 24h para a determinação de pH, biomassa e concentração de ácido clavulânico. A linhagem que apresentou maior produção de ácido clavulânico foi a DAUFPE 3060 com 575 mg/L de AC e 5,9 mg/L.h de produtividade a 96h de cultivo, comparada com a linhagem controle que produziu 451 mg/L de AC e 4,5 mg/L.h de produtividade no mesmo tempo de cultivo.

Palavras-chave: produção de ácido clavulânico, *Streptomyces*, farinha de soja, inibidor de β -lactamases.

II.2 INTRODUÇÃO

As bactérias da ordem *Actinomycetales* são denominadas geneticamente por actinomicetos. Encontradas geralmente em solos, apresentam características específicas, tais como: células procariotes; sensibilidade às lisozimas e aos agentes antibacterianos;

apresentam crescimento com colônias arredondadas, formando grânulos em meio de cultura líquido, filamentos finos semelhantes às hifas fúngicas com diâmetro entre 0,5 a 2,0 µm, tipicamente ramificados e denominados micélios; e reprodução por fragmentos das hifas ou por produção de esporos assexuados em áreas especializadas do micélio. O gênero *Streptomyces* pertence à família *Streptomycetaceae*, que compreende os gêneros *Streptomyces*, *Kitasatospora* e *Streptoverticillium* (GARRITY; BOONE; CASTENHOLZ, 2001).

Os *Streptomyces* são caracterizados por apresentarem metabolismo secundário completo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2005). Esse grupo produz grande número de antibióticos de uso clínico (neomicina, clorafenicol, clavans). Desses, 50% são empregados rotineiramente em medicina e em medicina veterinária (PEACOCK, 2003). Esses microrganismos não são patógenos frequentes, entretanto, podem causar algumas infecções em humanos e em plantas (HOPWOOD, 2007).

As descobertas bem sucedidas para combater as infecções causadas pelas bactérias resistentes produtoras de β -lactamases incluem a administração de um inibidor de β -lactamases associado com um antibiótico (LEE *et al.*, 2003). Atualmente, somente três inibidores de β -lactamases são utilizados na clínica em combinação com antibióticos, sendo inibidores eficazes de enzimas da classe A: o ácido clavulânico (combinado com amoxicilina ou ticarcilina), o sulbactam (combinado com ampicilina) e o tazobactam (combinado com piperacilina) (ENGLISH *et al.*, 1978; MICETICH *et al.*, 1987; READING; FARMER, 1981).

O ácido clavulânico é um β -lactâmico que possui grande afinidade por proteínas que se ligam a derivados da penicilina. Estas propriedades têm permitido sua utilização em medicamentos que o combinam com penicilinas semi-sintéticas, sendo a combinação com a amoxicilina a mais comercializada, gerando 1,3 bilhões de dólares em vendas por ano. O processo de obtenção industrial desse inibidor é pouco documentado na literatura, sendo uma premissa importante o conhecimento e o melhoramento de sua obtenção e produção (ELANDER, 2003).

Harvey (2000) ressaltou que produtos naturais têm sido utilizados como drogas na história da medicina. Entretanto, atualmente, a seleção de produtos naturais, particularmente produtos de origem microbiana, tem diminuído. Todavia, é notório que 99% da diversidade de espécies bacterianas ainda não foram exploradas. Para prevenir o crescimento exponencial de microrganismos que se tornaram resistentes a antibióticos viáveis clinicamente é necessária a periódica reposição dos antibióticos existentes (ILIC *et al.*, 2005). Sendo assim, a seleção de

novos microrganismos torna-se interessante por propiciar novas fontes produtoras de grande número de compostos bioativos (WATVE *et al.*, 2000).

O sucesso de um processo fermentativo depende muito da correta definição de 4 pontos básicos: o microrganismo, o meio de cultura, a forma de condução do processo fermentativo e as etapas de recuperação do produto. Na verdade, esses quatro fatores interagem enormemente, sendo necessário buscar defini-los de forma conjunta, levando em consideração aspectos econômicos e biológicos, o que torna bastante complexa a sua definição. Para tornar clara esta ideia, pode-se mencionar que o ideal seria empregar meios de cultivo baratos, mas se deve lembrar que o microrganismo necessita encontrar, neste meio, condições adequadas para realizar a produção pretendida (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS-CENTRO SUPERIOR DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2007). No presente trabalho, foram estudadas seis linhagens de *Streptomyces* spp. utilizando farinha de soja como fonte de nitrogênio, a fim de se obter uma nova fonte alternativa de microrganismo para a produção de ácido clavulânico.

II.3 MATERIAL E MÉTODOS

II.3.1 Microrganismos

Seis linhagens de *Streptomyces* foram utilizadas neste trabalho: DAUFPE 3036, DAUFPE 3060, DAUFPE 3098, DAUFPE 3094, DAUFPE 3133 (linhagens produtoras de ácido clavulânico (OLIVEIRA, 2004) e *Streptomyces clavuligerus* - ATCC 27064. Todas as culturas de *Streptomyces* são pertencentes à Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (DAUFPE) e foram cedidas gentilmente pela Prof^a. Dr^a. Janete Magali Araújo.

II.3.2 Manutenção, reativação e preparo do inóculo

O meio de cultura utilizado para manutenção das culturas das linhagens de *Streptomyces* foi o meio ISP-2 (PRIDHAM *et al.*, 1957), modificado pela retirada de glicose. A constituição deste meio de cultura para volume final de 100 mL foi de: extrato de levedura (0,4% p/v), extrato de malte (1,0% p/v) e ágar 2% p/v. Para o estoque das linhagens sob congelamento em glicerol a 10% (v/v) foi utilizado caldo de ISP-2. As amostras das linhagens de *Streptomyces* também foram mantidas em tubos inclinados contendo ágar ISP-2 incubados a 30°C por 5 a 7 dias. Todas as amostras foram repicadas a cada 30 dias.

Para a reativação das linhagens foi utilizado o meio de cultivo proposto por Ortiz *et al.* (2007) constituído de glicerol (1,5% p/v), peptona bacteriológica (1,0% p/v), extrato de malte (1,0% p/v), extrato de levedura (0,1% p/v), K₂HPO₄ (0,25% p/v), MgSO₄ · 7H₂O (0,075 % p/v), 1 mL de solução mineral (100 mg de FeSO₄ · 7H₂O; 100 mg de MnCl₂ · 4H₂O; 100 mg de ZnSO₄ · H₂O; água destilada q.s.p. 100 mL), sem a adição de tampão MOPS. As linhagens armazenadas em glicerol a 10% (v/v) foram reativadas em Erlenmeyers de 150 mL contendo 15 mL de meio de cultivo em agitador orbital a 200 rpm, 28°C por 24h.

Para o inóculo, as linhagens de *Streptomyces* reativadas foram transferidas para frascos de 250 mL contendo 25 mL de meio de cultivo constituído de glicerol (1,0% p/v), farinha de soja (2,0% p/v), extrato de malte (1,0% p/v), extrato de levedura (0,1% p/v), K₂HPO₄ (0,12% p/v), 1 mL de solução mineral (100 mg de FeSO₄ · 7H₂O; 100 mg de MnCl₂ · 4H₂O; 100 mg de ZnSO₄ · H₂O; água destilada q.s.p. 100 mL), sem a adição de óleo de soja (MARANESI *et al.*, 2005). As culturas foram incubadas em agitador orbital por mais 24h, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

II.3.3 Condições de cultivo

Foram realizadas fermentações com as seis linhagens, utilizando Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, no qual foi adicionado o inóculo correspondendo a 10% do volume total. O meio de cultura para a fermentação foi o mesmo utilizado para o preparo do inóculo. Os frascos foram incubados em agitador orbital com 200 rpm a 28°C, por 168h, e, a cada 24h, alíquotas foram retiradas de cada amostra para acompanhar o crescimento da biomassa, o pH e a produção de ácido clavulânico.

II.3.4 Métodos analíticos

O caldo fermentado foi centrifugado a 5.500 *xg* por 20 min a 4 °C e a massa celular foi lavada duas vezes com água destilada e seca a 80 °C. A dosagem espectrofotométrica de AC através da sua reação com o imidazol, selecionada neste estudo, foi descrita em detalhe por Bird *et al.* (1982) e utilizada pela maioria dos pesquisadores que trabalham nesta área (BERSANETTI *et al.*, 2005; MARANESI *et al.*, 2005; ORTIZ *et al.*, 2007). Segundo este método, a concentração de AC no caldo fermentado é determinada pela medição do aumento da densidade óptica a 311 nm devido à liberação do produto [1 - (8-hidroxi-6-oxo-4-azooct-2-

enol) imidazol-] da reação entre AC e imidazol. A concentração de glicerol foi determinada de acordo com Hae Bok e Demain (1977). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

II.3.5 Análise da cinética do processo fermentativo

A velocidade máxima de crescimento foi determinada segundo a equação:

$$\mu_{x\text{máx}} = (1/X).(dX/dt) \quad (1)$$

em que X é a concentração de células e a derivada dX/dt foi calculada de acordo com o método proposto por Le Duy e Zajic (1973).

II.3.6 Produtividade em ácido clavulânico (P_{AC})

A produtividade de ácido clavulânico obtida no decorrer do cultivo das linhagens de *Streptomyces* spp. foi calculada a partir da equação abaixo:

$$P_{AC} = \frac{C_p}{t_h} \quad (2)$$

Onde: P_{AC} : produtividade em ácido clavulânico (mg/L. h)

C_p : concentração de ácido clavulânico (mg/L)

II. 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura II.1 apresenta os valores da concentração celular para cada amostra de *Streptomyces* em todos os tempos (0-168h) de cultivo. A fase logarítmica de crescimento ocorreu entre 24 e 72h para todas as amostras.

As linhagens 3133, 3094, 3060, 3098 e 27064 não apresentaram fase de adaptação e apresentaram crescimento exponencial desde o início dos cultivos. A linhagem 3036 foi a única que apresentou uma fase de adaptação curta, seguida da fase log. O crescimento máximo foi alcançado em 48h de cultivo para todas as linhagens, com exceção das 3133 e 3094, ambas a 72h. Bushell *et al.* (2006) estudaram a biossíntese de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 em biorreator de 2,5L e obtiveram 5g/L de biomassa em 150h. Gouveia *et al.* (1999) analisaram a produção de ácido clavulânico com meio de cultivo enriquecido com aminoácidos, no qual a maior concentração de biomassa obtida também foi de 5g/L, só que em 72h de cultivo. No presente estudo, todas as linhagens apresentaram concentrações de biomassa entre 4 e 12 g/L em 48h de cultivo, com exceção das

linhagens 3133 e 3094, as quais apresentaram concentrações de biomassa máximas de 2,3 g/L e 6g/L em 72h de cultivo, respectivamente.

Figura II.1. Concentração celular (biomassa, g/L) em função do tempo de cultivo

As velocidades máximas de crescimento ($\mu_{x\text{máx}}$) estão apresentadas na Tabela II.1. Os maiores valores de $\mu_{x\text{máx}}$ foram obtidos em 48h de cultivo para todas as linhagens de *Streptomyces* spp. estudadas.

Elibol e Mavituna (1999) estudaram a produção de actinorodina por *S. coelicolor* em biorreator. O valor de $\mu_{x\text{máx}}$ obtido foi de $0,038 \text{ h}^{-1}$ em 72h de cultivo. No presente trabalho, com exceção da linhagem DAUFPE 3036, que apresentou $\mu_{x\text{máx}}$ de $0,029 \text{ h}^{-1}$, todas as linhagens apresentaram valores de $\mu_{x\text{máx}}$ maiores que o obtido por Elibol e Mavituna (1999) em 24h de fermentação, demonstrando, assim, melhor crescimento em menor tempo de cultivo.

Tabela II.1. Velocidades máximas de crescimento ($\mu_{x\text{máx}}$) em h^{-1} das seis linhagens de *Streptomyces* spp. em 24 e 48h de cultivo

Linhagens/Tempo	24h	48h
DAUFPE 3133	0,090	0,099
DAUFPE 3098	0,102	0,123
DAUFPE 3060	0,082	0,146
DAUFPE 3094	0,053	0,087
DAUFPE 3036	0,029	0,124
ATCC 27064	0,158	0,172

Na Tabela II.2., a produtividade do AC das seis linhagens de *Streptomyces* spp. é apresentada em função do tempo. Muitos autores estudaram a produtividade do AC em diferentes fontes de nitrogênio por *S. clavuligerus*, tais como Romero *et al.* (1984), que utilizaram os aminoácidos prolina e ácido glutâmico (P_{ac} de 0,36 mg/L.h); Belmar-Beiny e Thomas (1991), que utilizaram extrato de malte e peptona bacteriológica (P_{ac} de 2 mg/L.h); Mayer e Deckwer (1996), utilizando extrato de soja e peptona de carne (P_{ac} de 3,16 mg/L.h); Ives e Bushell (1997), os quais usaram cloreto de amônio (NH_4Cl) (P_{ac} de 0,47 mg/L.h) e Gouveia *et al.* (1999), utilizando extrato de soja e peptona bacteriológica (P_{ac} de 4,92 mg/L.h). A maior produtividade do AC neste trabalho foi observada pela linhagem DAUFPE 3060 com 6 mg/L.h utilizando somente a farinha de soja como fonte de nitrogênio.

Tabela II.2. Produtividade (P_{AC}) obtida pelas seis linhagens de *Streptomyces* durante 168h de fermentação no meio de cultivo utilizando farinha de soja como fonte de nitrogênio em 200 rpm a 28°C

Linhagens/Tempo	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
DAUFPE 3133	2,4	1,5	1,3	1,1	1,3	1,8	1,5
DAUFPE 3098	4,0	2,6	3,1	4,1	3,4	2,6	1,6
DAUFPE 3060	4,3	5,1	4,2	5,9	4,5	3,1	2,4
DAUFPE 3094	2,4	3,4	3,4	4,1	2,7	1,9	0,9
DAUFPE 3036	0,4	1,8	1,8	2,9	2,7	1,0	0,9
ATCC 27064	5,3	5,5	5,0	4,6	3,9	2,2	2,0

A produção de ácido clavulânico pelas seis linhagens também pode ser observada na Figura II.2. A linhagem melhor produtora foi a 3060, com 575 mg/L em 96h, 548 mg/L em 120h e 446 mg/L em 144h. Comparando com o padrão, *Streptomyces clavuligerus* (ATCC 27064), a amostra 3060 proporcionou melhores resultados.

A produção de ácido clavulânico por *S. clavuligerus* ATCC 27064 utilizando proteína isolada de soja (SPI), como fonte de nitrogênio, óleo de soja e glicerol, como fontes de carbono, foi estudada por Ortiz *et al.* (2007) e a máxima concentração obtida foi de 338 mg/L em 108h de cultivo. Teodoro *et al.* (2006) obtiveram 380 mg/L de ácido clavulânico por *S. clavuligerus* ATCC 27064 em biorreator de 4L em 48h, utilizando Samprosoy 90NB a 20g/L, ou seja, a 2%. Nesse trabalho, a farinha de soja a 2% foi utilizada como fonte de nitrogênio e o glicerol, como fonte de carbono. A farinha de soja é um substrato bem mais barato que Samprosoy e SPI, tornando a produção mais viável para a indústria. Observa-se, também, que a concentração de ácido clavulânico obtida pela linhagem 3060 foi maior em relação a esses autores, com a diferença do tempo de cultivo que foi de 96h.

Figura II.2. Concentrações de ácido clavulânico (mg/L) obtidas pelas seis linhagens de *Streptomyces* em função do tempo de cultivo

A Figura II.3 mostra o pH durante o crescimento das seis linhagens de *Streptomyces*. O pH inicial do meio de cultivo era 6,8 para todas as linhagens e apresentou variações para faixa ácida nas primeiras 24h e no decorrer do cultivo, elevou-se até o valor de 8,5 em 96h de crescimento, diminuindo novamente para faixa de 6,5 a 7,5 no final do cultivo. Esses resultados corroboram com aqueles obtidos por Goveia *et al.* (1999), os quais acompanharam a curva de pH no crescimento de *S. clavuligerus* NRRL 3585 em diferentes fontes de nitrogênio. Esses autores observaram que, após 96h de cultivo, o pH apresentava-se em torno de 7,5 a 9,0.

Figura II.3. Curva de pH das seis amostras de *Streptomyces* spp. cultivadas no meio de cultura com farinha de soja a 2% a cada 24h

II.5 CONCLUSÕES

A linhagem *Streptomyces* DAUFPE 3060 foi a melhor produtora de ácido clavulânico, com produtividade de 5,9 mg/L.h em 96h de cultivo. A escolha de uma nova fonte produtora de ácido clavulânico é uma alternativa viável, já que na literatura é estudado apenas um microrganismo, o *Streptomyces clavuligerus*. Além disso, a utilização de substratos de baixo custo, como, por exemplo, a farinha de soja, é ideal para o estudo de otimização da produção.

Capítulo III

SELEÇÃO DE VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO PELO *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060

Este artigo está disponível “online” no periódico Applied Biochemistry and Biotechnology com fator de impacto igual a 1,04 (DOI: 10.1007/s12010-009-8671-3,2009). Anexo I.

III.1 RESUMO

O ácido clavulânico (AC) é um antibiótico β -lactâmico que possui potente atividade inibidora contra as enzimas β -lactamases. A influência de cinco variáveis, tais como: pH (6,0, 6,4 e 6,8), temperatura (28, 30 e 32 °C), velocidade de agitação (150, 200 e 250 rpm), concentração de glicerol (5,0, 7,5, e 10 g/L) e concentração de farinha de soja (5,0, 12,5 e 20 g/L), na produção de AC por um novo isolado de *Streptomyces* (DAUFPE 3060) foi investigada em Erlenmeyers de 250 mL utilizando um planejamento fatorial fracionário. Temperatura e concentração de farinha de soja foram as duas variáveis mais significativas na produção de AC em 95% de nível de confiança. A maior concentração de AC (494 mg/L) foi obtida após 48h a 150 rpm, 32 °C, pH 6,0, e concentrações de 5,0 g/L de glicerol e 20 g/L de farinha de soja. Sob estas condições, o rendimento (η) de biomassa e de produto durante o consumo do substrato foi: 0,26 gX/gS e 64,3 mgP/gS, respectivamente. Fermentações realizadas em escala de biorreator de 3,0 L permitiram aumento da produção de AC em cerca de 60%.

Palavras-chave: *Streptomyces*, farinha de soja, glicerol, ácido clavulânico, seleção de variáveis, fermentação.

III.2 INTRODUÇÃO

Com o advento da era antibiótica na década de 1930, a ciência médica tem testemunhado a aplicação terapêutica bem sucedida de várias classes de antibióticos,

incluindo penicilinas, cefalosporinas e tetraciclina (SÁNCHEZ; OLISON, 2005). Hoje, os β -lactâmicos, particularmente, penicilinas e cefalosporinas, representam os principais produtos da biotecnologia em nível mundial, com percentual de vendas em torno de 65% do mercado total de antibióticos (ELANDER, 2003).

Ácido clavulânico (AC) é um antibiótico β -lactâmico produzido por *Streptomyces clavuligerus* com poderosa atividade inibitória contra β -lactamases produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (HAGINAKA, 1981). O tratamento contra bactérias resistentes à terapêutica eficaz dos β -lactâmicos e outros antibióticos é hoje mais difícil do que no passado. A descoberta e a aplicação do AC foram importantes para diminuir a resistência a antibióticos e, por isso, esse antibiótico β -lactâmico tem sido aplicado com sucesso na área clínica (BAGGALEY *et al.*, 1997). AC é um potente antibiótico, inibidor de "serina" β -lactamases (ou classes A, C e D), é utilizado como sal de potássio, em conjugação com amoxicilina, e prescrito clinicamente como co-amoxiclav (AugmentinTM), ou com ticarcilina como TimentinTM (WATVE *et al.*, 2000).

Streptomyces é o maior gênero produtor de antibióticos no mundo. Espécies pertencentes a este gênero continuam a ser uma fonte promissora de antibióticos (WATVE *et al.*, 2001). Há alguns anos a seleção de produtos naturais, especialmente produtos oriundos de microrganismos, diminuiu. Mais de 99% das diversas espécies bacterianas ainda são inexploradas (ELANDER, 2003; SÁNCHEZ; OLISON, 2005 ; WATVE *et al.*, 2000). Assim, a descoberta de novas espécies de *Streptomyces* é um desafio para a melhoria na produção de AC.

A produtividade de metabólitos microbianos está, em geral, intimamente relacionada com o processo fermentativo. Os tipos de nutrientes, suas concentrações e as condições de cultivo apresentam diferentes efeitos sobre o acúmulo de metabólitos (CHEN *et al.*, 2002; GOUVEIA *et al.*, 2001; KIRK *et al.*, 2000). A seleção da composição mais adequada do meio de cultura é de fundamental importância para o aumento da produtividade de qualquer bioprocessos. Além disso, o meio de cultura deve fornecer nutrientes facilmente disponíveis no mercado e, preferencialmente, de baixo custo (ORTIZ *et al.*, 2007).

O planejamento estatístico de experimentos é uma ferramenta amplamente utilizada para controle e otimização de processos, como também para estudar a influência de certo número de variáveis sobre a resposta de interesse. No planejamento fatorial fracionário, os fatores significativos e seus efeitos podem ser estudados usando poucos experimentos, reduzindo assim os custos de operação (BRUNS *et al.*, 2006). Estudos encontrados na literatura mostram a melhoria na produção de AC por *S. clavuligerus* (WATVE *et al.*, 2001),

através da seleção das melhores condições de cultivo, ou seja, pH (SAUDAGAR; SINGHAL, 2007), temperatura (BERSANETTI *et al.*, 2005), agitação (ROSA *et al.*, 2005), concentrações de glicerol como fonte de carbono (CHEN *et al.*, 2002) e de soja como fonte de nitrogênio (SIRCAR *et al.*, 1998). No entanto, existem poucos trabalhos que estudam a produção de AC por mutantes desta espécie ou outras espécies de *Streptomyces* (KIM *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2002) bem como a influência de variáveis de processo sobre a produção de AC utilizando planejamento estatístico (WANG *et al.*, 2005).

Com base nisso, um planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} de dois níveis com pontos centrais foi utilizado neste trabalho para estudar a influência de pH, temperatura, velocidade de agitação, concentrações de glicerol e farinha de soja na produção de AC por *Streptomyces* DAUFPE 3060, selecionando as concentrações de AC e de biomassa como as respostas. Na verdade, essas variáveis mostraram maior influência na produção de AC por outras linhagens (BERSANETTI *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2005; SAUDAGAR; SINGHAL, 2007; SIRCAR *et al.*, 1998). Apesar de ainda não estar totalmente caracterizada, essa linhagem apresentou satisfatória produção de AC em relação ao *S. clavuligerus*, principal produtor, constituindo-se a principal novidade deste estudo.

III.3 MATERIAL E MÉTODOS

III.3.1 Reagentes

O clavulanato de potássio oriundo de *S. clavuligerus* e o imidazol utilizados para determinar a concentração de AC na curva de calibração e na determinação da AC foram fornecidos pela Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). Sais, glicerol, peptona bacteriológica, extrato de malte e extrato de levedura, utilizados para preparar os meios de cultura, foram reagentes de grau analítico.

III.3.2 Microrganismo

O microrganismo *Streptomyces* DAUFPE 3060 foi gentilmente cedido da Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, PE, Brasil). Esse microrganismo foi isolado diretamente de amostras de solo. Para cada amostra recolhida, 3 g de solo foram diluídos em 100 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl) e essa solução permaneceu em repouso durante 15 min. Após o repouso, três diferentes

diluições (1:10, 1:100 e 1:1.000) foram preparadas utilizando solução salina estéril, no volume total de 10 mL. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em glicose-asparagina-ágar (Difco Laboratories, Detroit, MI, E.U.A.) em pH 6,5 como meio seletivo. As placas foram incubadas a 28 °C e controladas após 48, 72 e 96h. Colônias representativas foram selecionadas e repicadas em novas placas deste mesmo meio de cultivo. As linhagens de *Streptomyces* isoladas foram mantidas em placas com extrato de malte e levedura a 4 °C até posterior utilização. A caracterização preliminar foi realizada por macroscopia e microscopia das culturas, a fim de se avaliar a morfologia das cadeias de esporos, a cor da colônia e a liberação de pigmentos no meio de cultivo (LAWRENCE, 1956). O microrganismo, que está ainda na fase de caracterização molecular, foi armazenado em criotubos (10% v/v de glicerol) a -70 °C e utilizado ao longo do presente trabalho.

III.3.3 Meios de cultura

O meio de reativação teve a seguinte composição (em g/L de água destilada): glicerol, 15; peptona bacteriológica, 10; extrato de malte, 10; extrato de levedura, 1,0; K₂HPO₄, 2,5; MgSO₄ . 7H₂O, 0,75; MnCl₂ . 4H₂O, 0,001; FeSO₄ . 7H₂O, 0,001 e ZnSO₄ . 7H₂O, 0,001. O pH do meio foi ajustado para 6,8 com NaOH 5,0 M antes de autoclavagem a 121 °C por 15 min. O meio de inóculo utilizado nos cultivos foi baseado no proposto por Maranesi *et al.* (2005), com a seguinte composição (em g/L de água destilada): glicerol, 10; farinha de soja (FS), 20; K₂HPO₄, 1,2; MnCl₂ . 4H₂O, 0,001; FeSO₄ . 7H₂O, 0,001 e ZnSO₄ . 7H₂O, 0,001, pH 6,8. A composição do meio de produção foi semelhante à utilizada para o inóculo, exceto para as concentrações de FS e de glicerol, que variavam de acordo com o planejamento experimental selecionado.

III.3.4 Condições de cultivo

A reativação foi preparada pela adição da suspensão de esporos (6,6 g/L de massa seca) contidos no criotubo (3,0 mL) em 25 mL de meio de reativação em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade e incubados em 200 rpm a 28 °C, por 24h. Depois disso, 5,0 mL dessa cultura de reativação foram inoculados em 45 mL de meio de inóculo e incubados por 24h nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, alíquotas de 5,0 mL dessa cultura foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL contendo 45 mL de meio de produção. A produção durou 168h e foi realizada em condições diferentes, de acordo com o planejamento experimental descrito posteriormente (Tabela III.1). Amostras foram retiradas a cada 24h e

utilizadas para determinar o pH e as concentrações de células, de glicerol e de AC. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o planejamento experimental proposto e o microrganismo produziu maior quantidade de AC nas condições descritas no ensaio 3 que, em seguida, foi realizado em triplicata. Para comparação com uma escala maior, uma fermentação adicional foi realizada em triplicata, em biorreator de 3,0 L, modelo Z61103CT04 (Applikon, Schiedam, Holanda) acoplado ao dispositivo eletrônico, modelo ADI1030 (Applikon), o qual permitiu maior controle das melhores condições determinadas em frascos agitados (32 °C, pH $6,0 \pm 0,1$, 5 g/L de glicerol e 20 g/L de farinha de soja). A velocidade de agitação e a aeração foram fixadas em 800 rpm e 0,5 vvm, respectivamente (ORTIZ *et al.*, 2007). A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada por um eletrodo galvânico esterilizado, InPro6000 Series (Mettler-Toledo, Novate Milanese, Itália).

III.3.5 Métodos analíticos

O caldo fermentado foi centrifugado a 5.500 xg por 20 min a 4 °C e a massa celular foi lavada duas vezes com água destilada e seca a 80 °C. A dosagem espectrofotométrica de AC, através da sua reação com o imidazol, selecionada neste estudo, foi descrita em detalhe por Bird *et al.* (1982) e utilizada pela maioria dos pesquisadores que trabalham nesta área (BERSANETTI *et al.*, 2005; MARANESI *et al.*, 2005; ORTIZ *et al.*, 2007). Segundo este método, a concentração de AC no caldo fermentado é determinada pela medição do aumento da densidade óptica a 311 nm devido à liberação do produto [1 - (8-hidroxi-6-oxo-4-azooct-2-enol) imidazol-] da reação entre AC e imidazol. A concentração de glicerol foi determinada de acordo com Hae Bok e Demain (1977). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

III.3.6 Planejamento experimental

Cultivos foram realizados de acordo com um planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} , que é a quarta fração de um planejamento fatorial completo (BRUNS *et al.*, 2006). Esse planejamento foi utilizado para avaliar a influência de algumas variáveis sobre a produção de AC. Como é uma fração, os efeitos são confundidos em grupos de quatro, motivo pelo qual os resultados calculados são chamados de "contrastes", para distingui-los dos efeitos principais. O planejamento experimental foi composto por oito ensaios e quatro repetições no ponto central, necessárias para calcular o erro puro. A biomassa e a concentração de AC foram selecionadas como as duas variáveis-resposta, após 48h, isto é, o momento em que a maior

concentração de AC foi obtida. A avaliação estatística dos resultados foi realizada pelo programa estatístico *Statistic 6,0*.

Tabela III.1. Variáveis e níveis do planejamento estatístico fracionário 2^{5-2} utilizado para a produção de AC por *Streptomyces* DAUFPE 3060

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
(1) Temperatura (°C)	28	30	32
(2) Velocidade de agitação (rpm)	150	200	250
(3) pH	6,0	6,4	6,8
(4) Concentração de glicerol (g/L)	5	7,5	10
(5) Concentração de farinha de soja (g/L)	5	12,5	20

III.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.4.1 Farinha de soja e glicerol como fontes de nitrogênio e carbono

Os principais resultados obtidos por cultivo de *Streptomyces* DAUFPE 3060, de acordo com o planejamento fatorial fracionário, estão listados na Tabela III.2.

Tabela III.2. Combinação dos níveis das cinco variáveis independentes (velocidade de agitação, temperatura, pH, concentrações de glicerol e farinha de soja) usadas no planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} e suas respectivas respostas (concentrações de ácido clavulânico e biomassa)

Ensaio	Velocidade de agitação (rpm)	Temp. (°C)	pH (—)	Glicerol (g/L)	FS (g/L)	AC (mg/L) ^a	Biomassa (g/L)
2	250	28	6,0	5,0	5,0	23	1,6
4	250	32	6,0	10	5,0	95	2,2
7	150	32	6,8	5,0	5,0	121	1,9
5	150	28	6,8	10	5,0	39	1,1
12 (C) ^a	200	30	6,4	7,5	12,5	62	2,3
6	250	28	6,8	5,0	20,0	73	5,3
9 (C)	200	30	6,4	7,5	12,5	62	2,4
1	150	28	6,0	10	20,0	129	4,1
8	250	32	6,8	10	20,0	104	7,6
3	150	32	6,0	5,0	20,0	494	2,8
10 (C)	200	30	6,4	7,5	12,5	63	2,3
11 (C)	200	30	6,4	7,5	12,5	61	2,3

^aO erro puro estimado pela repetição dos ensaios dos pontos centrais (C) foi de $\pm 0,54$. Todos os valores foram estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança.

O efeito de diferentes combinações das concentrações da fonte de nitrogênio (FS) e da fonte de carbono (glicerol) com diferentes valores de pH na produção de AC após 48h podem ser observados na Figura III.1.

É importante salientar que os dois maiores valores de concentração de AC (494 e 129 mg/L) estão localizados na face superior do diagrama, o que corresponde ao pH de 6,0, combinações opostas de níveis (-1 e +1) para a concentração de glicerol (5 e 10 g/L, respectivamente) e 20 g/L de concentração de FS, ou seja, no nível superior. Um estudo da influência do tipo de derivados de soja como fontes de nitrogênio sobre a produção AC por *S. clavuligerus* foi realizado por Ortiz *et al.* (2007), que utilizaram dois meios de cultivo diferentes, um contendo, como fonte de nitrogênio, FS (20 g/L) e, como fontes de carbono, óleo de soja (23 g/L) e glicerol (10 g/L); e outro contendo as mesmas fontes de carbono do anterior, entretanto, com proteína isolada de soja (SPI) (20 g/L) no lugar da FS. Esses autores observaram que o crescimento celular e a produção de AC foram maiores no primeiro meio de cultivo, que continha mais nutrientes solúveis.

Figura III.1. Representação cúbica das médias das concentrações de ácido clavulânico em diferentes níveis de pH e concentrações de farinha de soja e glicerol, de acordo com o planejamento fatorial fracionário descrito na Tabela III.1

Segundo Chen *et al.* (2002), os derivados de soja, como farinha de soja e farelo de hidrolisados de proteína de soja, são componentes dos meios de cultura importantes para a produção de AC porque contêm arginina, o precursor do AC. Teodoro *et al.* (2006), que investigaram recentemente a produção de AC por *S. clavuligerus* utilizando três diferentes fontes de nitrogênio, 1% de extrato de malte, 1% de extrato de levedura e 2% de derivados de soja comerciais (Samprosoy 90NB), observaram que o crescimento celular foi favorecido pela grande disponibilidade da fonte de nitrogênio, em detrimento dos resultados da produção de AC. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o uso de FS (20 g/L) como fonte de nitrogênio associada com 5 g/L de glicerol, como única fonte de carbono, ou seja, uma quantidade de fonte de carbono muito menor do que aquela utilizada por Ortiz *et al.* (2007), foi suficiente para garantir produção satisfatória do AC. O principal potencial desses resultados decorre do fato de que FS é uma matéria-prima cerca de cinco vezes mais barata (US\$ 0,43 kg⁻¹) que SPI (US\$ 2,15 kg⁻¹) (taxas de 2006) (ORTIZ *et al.*, 2007). Mesmo levando-se em conta que o teor de nitrogênio da FS é de cerca da metade da SPI, o uso da FS é tecnicamente e economicamente vantajoso para a produção de AC, nestas condições de cultivo.

III.4.2 Influência das variáveis independentes sobre a produção do ácido clavulânico

Os valores dos contrastes calculados para todas as cinco variáveis selecionadas pelo planejamento fatorial fracionário estão apresentados na Tabela III.3. Todos os valores foram estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança. Os principais efeitos da temperatura (1) e da concentração de FS (5), bem como a interação (1-5) entre elas, foram significativos e positivos, indicando que o incremento de qualquer um deles resultou em aumento correspondente na concentração de AC. No entanto, os efeitos das outras variáveis, e a interação 1-3, foram significativos e negativos, sendo o mais importante a velocidade de agitação (2). Como mostrado na Figura III.2, nas condições do ensaio 3, realizado a 150 rpm, 32°C, pH6,0, 5 g/L de glicerol e 20 g/L de FS, obteve-se a maior produção de AC (494 mg/L), enquanto o maior crescimento (7,6 g/L) foi observado no ensaio 8 realizado nos níveis superiores de velocidade de agitação (250 rpm) e de concentração de glicerol (10 g/L).

Tabela III.3. Valores dos contrastes calculados através da análise do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} aplicados às variáveis independentes em relação à variável-resposta, concentração de ácido clavulânico

Variáveis e interações	Contrastes ^a
(1) Temperatura (°C)	249
(5) Concentração de farinha de soja (g/L)	220
(2) Velocidade de agitação (rpm)	-211
(3) pH (—)	-164
(4) Concentração de glicerol (g/L)	-150
Interação 1-3	-134
Interação 1-5	95

^aO erro puro estimado pela repetição dos ensaios dos pontos centrais (C) foi de $\pm 0,54$. Todos os valores foram estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança.

Figura III.2. Representação da relação entre as variáveis-resposta, concentrações de biomassa e AC, após 48h dos cultivos do *Streptomyces* DAUFPE 3060 utilizando o planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} da Tabela III.1

Com base nestes resultados, os autores avaliaram os efeitos simultâneos exercidos pela temperatura e velocidade de agitação, por causa da conhecida importância de ambas no aumento da escala industrial. Para este efeito, foram considerados em conjunto todos os ensaios realizados no âmbito das mesmas condições de temperatura (32°C) e velocidade de agitação (150 rpm), com concentração máxima média de AC de 308 mg/L. A maioria dos estudos relatados na literatura não leva em consideração essa interação, somente investiga separadamente os efeitos de cada uma, numa faixa de 28 a 30°C e 200-250 rpm (CHEN *et al.*, 2002; GOUVEIA *et al.*, 2001; KIRK *et al.*, 2000; MARANESI *et al.*, 2005; ORTIZ *et al.*, 2007; TEODORO *et al.*, 2006; BUSHELL *et al.*, 2006). Os valores de temperatura e velocidade de agitação que garantiram a maior produção de AC neste estudo apresentaram-se fora destes limites; portanto, confirmando a importância da investigação combinada destas duas variáveis por um planejamento estatístico, em vez de avaliar variando cada uma por vez. A análise de regressão do planejamento fatorial fracionário descrita na Tabela III.4 mostra que as variáveis, temperatura e concentração de farinha de soja, foram mais significativas nos níveis de confiança de 95 e 97% para a produção de AC, respectivamente. Nessa Tabela também podem ser visualizados os valores dos coeficientes de regressão, que foram calculados pela seguinte equação de primeira ordem:

$$AC = 106,71 + 65,05x_1 - 55,21 x_2 - 42,78 x_3 - 39,10 x_4 + 57,57 x_5 \quad (1)$$

em que AC é a concentração de AC e x_i (x_1 = temperatura, x_2 = concentração de farinha de soja, x_3 = velocidade de agitação, x_4 = pH, x_5 = concentração de glicerol) são os termos das variáveis independentes. O modelo explicou 90% de variabilidade dos dados ($R^2 = 0,90$) e sua significância estatística foi também confirmada pelo alto valor de F calculado (11,55). O modelo foi considerado adequado para ajustar os dados ao nível de confiança de 95%. Esses resultados confirmam que a temperatura e a concentração de farinha de soja são as variáveis independentes mais importantes na produção de AC por *Streptomyces* DAUFPE 3060.

Tabela III.4. Resultados de regressão do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} para a produção de ácido clavulânico

Termo	Intercepta	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5
Coefficiente	106,71	65,05	-55,21	-42,78	-39,10	57,57
Valor de t	5,54	2,75	-2,34	-1,81	-1,66	2,44
Valor de p	0,001	0,032	0,060	0,112	0,148	0,050

$$R^2 = 0,90; F = 11,55 > F_{5,6} = 5,01$$

III.4.3 Cultivos nas melhores condições

A Figura III.3 mostra o comportamento do cultivo do microrganismo nas condições do melhor ensaio (3), realizado a 150 rpm, 32 ° C, pH 6,0, 20 g/L de FS e 5 g/L de glicerol em função do tempo. Pode ser visualizado que o consumo de glicerol para a produção de AC depende do tempo de cultivo. Na verdade, a concentração de AC (máximo 494 mg/L) foi obtida após 48h de cultivo, provavelmente devido às condições de baixa disponibilidade de fonte de carbono (5 g/L glicerol) no início da fermentação. Por causa da falta da fonte de carbono, após este período, o microrganismo cresceu utilizando proteínas de soja, liberando, assim, principalmente aminoácidos e outros compostos (LYNCH; YANG, 2004; ROUBOS *et al.*, 2002). Consequente liberação de subprodutos, como aqueles derivados de NH₃ em meio aquoso, aumentou progressivamente o pH (resultados não mostrados) e provavelmente esse fenômeno foi responsável pela degradação de AC. Considerando esse comportamento, deve-se evitar tempo de cultivo muito longo em processos industriais de produção de AC para se obter desempenho satisfatório.

Figura III.3. Concentrações de biomassa (□), glicerol (△) e ácido clavulânico (●) em função do tempo de cultivo durante o ensaio 3 em frascos agitados

Estes resultados de crescimento correlacionado com a produção estão de acordo com os de Mayer e Deckwer (1996), que observaram que o crescimento e a produção ocorreram

simultaneamente na tropofase quando a fonte de nitrogênio solúvel foi utilizada. A produção de AC associada ao crescimento celular também foi observada por Lynch e Yang (2004) e Kenji *et al.* (2006); ambos utilizaram derivados de soja como fontes de nitrogênio. Por outro lado, Teodoro *et al.* (2006) observaram que a síntese de AC ocorreu durante a tropofase, mas a maior concentração de AC foi obtida durante a fase estacionária. Além disso, eles demonstraram que a concentração da fonte de nitrogênio influenciou a produção do AC porque, em níveis elevados de nitrogênio, a produção é inibida pela amônia liberada devido ao catabolismo de aminoácidos (ROMERO *et al.*, 1984). A produção máxima de AC (494 mg/L após 48h), obtida por cultivo em frascos agitados de *Streptomyces* DAUFPE 3060 (Figura III.3), foi maior que aquela obtida no mesmo meio de cultivo contendo SPI, em vez de FS (338 mg/L após 108h) (ORTIZ *et al.*, 2007) ou amido solúvel, em vez de glicerol (458 mg/L de AC após 96h) (ROMERO *et al.*, 1984). No entanto, foi menor que a observada por Ortiz *et al.* (2007) e Maranesi *et al.* (2005), utilizando *S. clavuligerus* em misturas de FS, óleo de soja e glicerol (698-753 mg/L), após tempo muito maior (130-132h). A principal diferença entre estes resultados, provavelmente, foi devida às diferentes fontes de carbono utilizadas. A utilização neste trabalho de apenas glicerol como fonte de carbono fez com que o crescimento e a produção AC fossem muito rápidos, enquanto que, nos trabalhos dos outros autores, a lenta β -oxidação dos ácidos graxos foi provavelmente a rota metabólica principal após a utilização completa do glicerol.

Maior produção de AC (672 mg/L) por *S. clavuligerus* nas condições ótimas utilizando farinha de soja, glicerol e ornitina após 72h foi relatada por Wang *et al.* (2005). No entanto, esse meio de cultura é muito mais caro do que o uso individual da farinha de soja e, provavelmente, seria inadequado para o aumento de escala para fins industriais. A alta utilização de glicerol pelo *Streptomyces* DAUFPE 3060 ocorreu entre 24 e 48h, mas nunca foi concluída, e a biomassa atingiu seu valor máximo (4,7 g/L) após 96h. Os rendimentos da biomassa em substrato consumido ($Y_{x/s}$) foi de 0,26 g/g e do consumo de substrato em produto ($Y_{p/s}$) foi de 64,3 mg/g, o que significa que, sob as condições estudadas neste trabalho, o rendimento do AC sobre a biomassa produzida ($Y_{p/x} = 247$ mg/g) foi cerca de duas ordens de magnitude maiores do que o determinado por Lynch e Yang (2004). De posse desses resultados promissores, realizou-se uma fermentação triplicata em biorreator em condições, tanto quanto possível, semelhantes àsquelas observadas em frascos agitados. Como esperado, os resultados das fermentações em biorreator (Figura III.4) foram muito melhores que aqueles obtidos em frascos agitados, provavelmente devido à melhor transferência de oxigênio. A máxima concentração de AC (790 mg/L) após 48h foi aproximadamente 60% maior e a

máxima concentração celular foi cerca de 2,5 vezes a obtida em frascos agitados. O glicerol foi completamente consumido apenas após 120 h de cultivo.

Figura III.4. Concentrações de biomassa (□), glicerol (△) e ácido clavulânico (●) em função do tempo de cultivo de *Streptomyces* DAUFPE 3060 em biorreator

III.5 CONCLUSÕES

A influência de algumas variáveis do processo, como temperatura, pH, velocidade de agitação e concentrações de farinha de soja e glicerol, sobre a produção de AC pela nova linhagem de *Streptomyces* DAUFPE 3060 foi estudada utilizando um planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} . Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a concentração de farinha de soja e a temperatura foram as variáveis que mais influenciaram na produção de AC. Esta linhagem foi cultivada em um meio de cultura de baixo custo (20 g/L de farinha de soja e 5 g/L de glicerol) e demonstrou ser um microrganismo promissor para a produção, particularmente rápida, de AC (494 mg/L após 48 h) em relação ao *S. clavuligerus*, principal produtor. Com o objetivo de aumentar a escala, as condições ótimas de produção observadas em frascos agitados foram estudadas em biorreator. A concentração máxima de AC (790 mg/L) obtida após 48 h de cultivo foi aproximadamente 60% maior e a máxima concentração de célula cerca de 2,5 vezes aquela observada em frascos agitados. Trabalhos futuros são necessários para otimização do processo e aumento de escala para fins industriais.

Capítulo IV

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060 UTILIZANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

O artigo foi submetido para a publicação no periódico Engineering in Life Sciences com fator de impacto de 1,2 e com o número: elsc.200900104, Anexo II.

IV.1 RESUMO

Ácido clavulânico é um antibiótico β -lactâmico que possui potente atividade inibidora contra enzimas β -lactamases. A fim de otimizar sua produção por uma nova linhagem de *Streptomyces*, DAUFPE 3060, a influência de duas variáveis independentes, temperatura e concentração farinha de soja (FS), na produção de ácido clavulânico e biomassa, foi investigada em Erlenmeyers de 250 mL, de acordo com um planejamento composto central 2^2 . Com esse objetivo, a temperatura e a concentração de farinha de soja variaram entre 26 e 34 °C e 10-50 g/L, respectivamente, e os resultados foram avaliados utilizando-se Metodologia de Superfície de Resposta. A máxima produção observada do ácido clavulânico (629 mg/L) foi obtida a 32 °C e com 40 g/L de FS, enquanto a máxima concentração da biomassa (3,9 g/L) foi a 30 °C e 50 g/L de FS, respectivamente. Esses valores são próximos (640 mg/L e 3,75 g/L, respectivamente) aos previstos pelo modelo estatístico utilizado, demonstrando assim a validade da ferramenta estatística. A produção do ácido clavulânico atingiu valor máximo (629 mg/L) após cerca de 48 h e, em seguida, rapidamente caiu, provavelmente devido à sua degradação.

Palavras-chave: Ácido clavulânico, Metodologia de Superfície de Resposta, *Streptomyces* spp., Otimização, Farinha de soja

IV. 2 INTRODUÇÃO

O ácido clavulânico (AC) é um agente antibacteriano com estrutura química semelhante às penicilinas e é muito importante, tanto clínica como economicamente (LYNCH; YANG, 2004). Ele age como um inibidor competitivo das β -lactamases secretadas por certas bactérias que conferem resistência a antibióticos β -lactâmicos (SAUDAGAR *et al.*, 2008).

O *Streptomyces* é o maior gênero microbiano produtor de antibióticos descoberto no mundo. Segundo Sánchez e Olson (2005), 99% das diversas espécies de bactérias não foram ainda exploradas. Assim, a descoberta de novas espécies de *Streptomyces* é um desafio para a melhoria na produção de AC. Entre estas, várias linhagens de *S. clavuligerus*, *S. jumonjinensis*, *S. katsurahamanus* e uma não classificada *Streptomyces* spp. são relatadas na literatura como produtoras de AC (JENSEN; PARADKAR, 1999). A maioria dos estudos anteriores indica a melhoria da produção AC por *S. clavuligerus* (WATVE *et al.*, 2001). No entanto, existem poucos trabalhos que relatam produção de AC por mutantes da espécie *Streptomyces* ou por outras espécies (KIM *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2002), bem como a otimização de processos de produção utilizando planejamento estatístico (WANG *et al.*, 2005).

A produtividade de metabólitos microbianos é, em geral, estreitamente relacionada com o processo de fermentação. Para reduzir os custos de um bioprocessos, é necessário o uso de matéria-prima barata e natural (LYNCH; YANG, 2004), como a farinha de soja utilizada neste trabalho. Outra ferramenta amplamente utilizada para controle e otimização de processos é o planejamento estatístico de experimentos. Com auxílio de um planejamento fatorial, as variáveis significativas e seus efeitos podem ser estudados, fazendo-se apenas alguns experimentos, economizando tempo e reduzindo os custos do processo (BRUNS *et al.*, 2006). Em estudo anterior, as variáveis mais significativas no processo de produção do AC por *Streptomyces* DAUFPE 3060 foram selecionadas através de um planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} , no caso, a temperatura e a concentração de FS (VIANA *et al.*, 2009). Embora o novo isolado ainda não esteja caracterizado, a produção de AC é satisfatória em relação ao *S. clavuligerus*, principal produtor. Com base nisso, um planejamento central composto 2^2 combinado com a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi utilizado neste trabalho para otimizar a produção de AC por essa linhagem.

IV.3 MATERIAL E MÉTODOS

IV.3.1 Reagentes

O clavulanato de potássio e o imidazol foram fornecidos pela Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). Sais, glicerol, peptona bacteriológica, extrato de malte e extrato de levedura foram reagentes de grau analítico.

IV. 3.2 Microrganismo

O microrganismo *Streptomyces* DAUFPE 3060, isolado de solo, foi gentilmente cedido da Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, PE, Brasil). O microrganismo foi mantido em placas contendo ágar extrato de malte e levedura a 4°C e armazenado em criotubos (10% v/v de glicerol) a -70 °C.

IV. 3.3 Meios de cultura

O meio de reativação teve a seguinte composição (em g/L de água destilada): glicerol, 15; peptona bacteriológica, 10; extrato de malte, 10; extrato de levedura, 1,0; K₂HPO₄, 2,5; MgSO₄ . 7H₂O, 0,75; MnCl₂ . 4H₂O; 0,001; FeSO₄ . 7H₂O, 0,001 e ZnSO₄ . 7H₂O, 0,001, pH 6,8. O meio de inóculo foi preparado segundo Maranesi *et al.* (2005) e teve a seguinte composição (em g/L de água destilada): glicerol, 10; farinha de soja (FS), 20; K₂HPO₄, 1,2; MnCl₂ . 4H₂O, 0,001; FeSO₄ . 7H₂O, 0,001 e ZnSO₄ . 7H₂O, 0,001, pH 6,8. Para os experimentos no meio de produção, utilizou-se o meio de inóculo, com alteração na concentração de glicerol, que reduziu para 5,0 g/L, e na concentração de farinha de soja (FS), que variou de acordo com o planejamento experimental selecionado.

IV. 3.4 Condições de cultivo

A reativação foi preparada pela adição da suspensão de esporos de 6,6 g/L de peso seco em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade e incubados a 28 °C em 200 rpm, por 24 h. Depois disso, Erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 45 mL de meio de inóculo foram inoculados com 5, 0 mL dessa cultura de reativação e incubados nas mesmas condições descritas anteriormente. Por fim, alíquotas de 5,0 mL dessa cultura foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL contendo 45 mL de meio de produção. O cultivo durou 168 h e foi realizado a 150 rpm, em diferentes temperaturas, de acordo com o planejamento experimental.

IV. 3.5 Métodos analíticos

O caldo fermentado foi centrifugado a 5.500 xg por 20 min a 4 °C e a massa celular foi lavada duas vezes com água destilada e seca a 80 °C. A concentração de AC no meio fermentado foi determinada espectrofotometricamente através da sua reação com o imidazol (BIRD *et al.*, 1982) e a concentração de glicerol foi determinada de acordo com Hae Bok e Demain (1977). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

IV. 3.6 Planejamento experimental e análise dos dados

Para analisar a influência das variáveis independentes selecionadas, especificamente: concentração de FS (x_1) e temperatura (x_2), sobre as respostas (concentrações de AC e biomassa), foi utilizado um planejamento estatístico central composto 2^2 com três níveis codificados com 14 ensaios, que continha uma matriz fatorial ou fatorial fracionária inserida com pontos centrais e pontos de estrela para permitir a estimativa da curvatura (CHEN *et al.*, 2002). Uma unidade foi designada como a distância do centro do espaço do planejamento estatístico para os pontos equidistantes, enquanto a unidade de α foi designada como a distância do centro do espaço a um ponto de estrela. Os pontos de estrela representam novos valores extremos (mais alto e mais baixo) para cada variável neste planejamento. Como o planejamento é um fatorial completo, então $\alpha = [2k]^{1/4}$ e, neste estudo, $k = 2$ variáveis (concentração de FS e temperatura), para $\alpha = 1,414$. Os valores estudados de temperatura e concentração de FS foram 26, 28, 30, 32 e 34 °C e 10, 20, 30, 40 e 50 g/L, respectivamente. Seis ensaios no ponto central foram realizados para estimar o erro puro. As concentrações de AC e de biomassa, tomadas como variáveis dependentes ou variáveis-resposta, foram avaliadas após 48h, porque os experimentos anteriores demonstraram que, após este tempo, inicia-se a degradação de AC. O modelo quadrático para prever o ponto ótimo utilizando Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi expresso pela equação:

$$\hat{y} = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

em que x é o valor codificado da variável independente " i " ou " j ", $\hat{y}$ são os valores previstos da resposta, b_0 , b_i e b_{ii} são os coeficientes da intercepta, linear e quadrático, respectivamente, e b_{ij} os de interação.

A versão *Statistic* 6.0 (Statsoft, Tulsa, OK) foi utilizada para a análise de regressão e construção dos gráficos. A validação do modelo foi obtida através do coeficiente de

determinação (R^2) e da análise de variância (ANOVA), bem como pela comparação entre os valores observados e previstos.

IV. 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No trabalho anterior (VIANA *et al.*, 2009) foi demonstrado que a concentração de FS e a temperatura foram as variáveis que mais influenciaram na produção de AC por *Streptomyces* spp. DAUFPE 3060 e com isso foi possível identificar os intervalos das variáveis estudados na etapa de otimização, cujos resultados principais são apresentados na Tabela IV.1.

Tabela IV.1. Combinações dos níveis das duas variáveis independentes (temperatura e concentração de FS) utilizadas no planejamento central composto 2^2 e os resultados das respostas estudadas (concentrações de ácido clavulânico e biomassa)

Ensaio	Variáveis independentes		*Respostas	
	Temperatura (°C)	FS (g/L)	Ácido clavulânico (mg/L)	Biomassa (g/L)
14 (C)	30	30	567	3,4
7	26	30	501	2,4
12 (C)	30	30	566	3,3
10 (C)	30	30	567	3,1
5	30	10	221	1,8
6	30	50	582	3,9
2	32	20	377	2,0
13 (C)	30	30	567	3,5
11 (C)	30	30	568	3,4
4	32	40	629	3,3
9 (C)	30	30	565	3,1
8	34	30	595	2,9
3	28	40	562	3,0
1	28	20	306	1,3

*Todos os valores foram estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança.

A produção máxima de AC (629 mg/L) foi obtida a 32 °C e na concentração de FS = 40 g/L (ensaio 4), enquanto que a concentração máxima de biomassa (3,9 g/L) foi a 30 °C e na concentração de FS = 50 g/L (ensaio 6). A Figura IV.1 mostra os efeitos simultâneos,

evidenciados pela MSR, da concentração de FS (x_1) e da temperatura (x_2) sobre as concentrações de AC ($\hat{y}_1$) e de biomassa ($\hat{y}_2$), descritos pelas equações:

$$\hat{y}_1 = 566,67 + 127,32 x_1 - 84,15 x_1^2 + 33,87 x_2 - 10,89 x_2^2 - 1,00 x_1 x_2 \quad (2)$$

$$\hat{y}_2 = 3,30 + 0,75 x_1 - 0,31 x_1^2 + 0,21 x_2 - 0,41 x_2^2 - 0,10 x_1 x_2 \quad (3)$$

Através da análise estatística, os principais efeitos lineares foram positivos para as duas variáveis independentes (significativo a 95% de nível de confiança), sobre as duas variáveis-resposta, concentrações de AC e biomassa, porém, o efeito da variável concentração de FS foi mais significativo. No entanto, este comportamento não foi somente linear, pois os efeitos quadráticos das variáveis também foram significativos, o que significa que as respostas aumentaram de valor com o incremento das variáveis independentes. Como resultado, duas regiões de temperatura (30-34°C) e concentração de FS (35-45 g/L), em que ambas as respostas atingiram valores máximos, existem. O termo $x_1 x_2$ da interação não foi significativo, no entanto, foi mantido no modelo para minimizar o erro.

Figura IV.1. Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos da concentração de farinha de soja e a temperatura nas concentrações de biomassa e AC

Em função das análises de regressão pelas eqs. (2) e (3), se obtiveram valores previstos máximos de concentração de AC (640 mg/L) a 33,0 °C e na concentração de FS = 37,5 g/L e de concentração de biomassa (3,75 g/L) a 30,2 °C e concentração de FS = 41,8 g/L. Estes valores previstos são apenas 1,7% superior e 3,8% menores que aqueles observados pelo modelo, para as respostas concentrações de AC e biomassa, respectivamente, demonstrando assim a validade do modelo utilizado.

A análise de variância foi realizada para confirmar se o modelo foi significativo. Os valores de F calculados foram maiores que os tabelados para as duas respostas ($F_{\text{calc}} = 27,08 > F_{(5,8)} = 3,69$ para $\hat{y}_2$ e $3499 > F_{(5,8)} = 3,69$ para $\hat{y}_1$). Em relação à falta de ajuste do modelo, para $\hat{y}_2$ não foi apresentada ($3,04 < F_{(5,8)}$), enquanto que para $\hat{y}_1$, a falta de ajuste foi significativa, sendo de $25,7 > F_{(5,8)}$, porém, com erro puro baixo, de 1,1. Os valores de R^2 foram de 0,97 e 0,99 para as concentrações de biomassa e de AC, com $p < 0,0001$ para ambas.

Figura IV.2 mostra o comportamento da produção do AC, do crescimento da biomassa e do consumo de glicerol durante a fermentação em relação ao tempo nas condições do ensaio de melhor resultado (ensaio 4). As maiores concentrações de biomassa (5,06 g/L) e de AC (629 mg/L) foram obtidas antes do consumo total de glicerol, embora após diferentes tempos (72 e 48 h, respectivamente). Além disso, é interessante notar na Figura IV.2 que a concentração de AC rapidamente caiu após 48 h, como resultado provável do aumento da degradação quando comparado à sua produção.

Figura IV.2. Concentrações de biomassa (□), glicerol (△) e ácido clavulânico (●) com o tempo de cultivo em frascos agitados. Temperatura: 32 °C; concentração de farinha de soja: 40 g/L; concentração de glicerol: 5,0 g/L; 150 rpm; pH 6,0

O fenômeno de produção de AC simultaneamente ao crescimento do microrganismo e a produção máxima de AC e a sua subsequente degradação rápida foram eventos já observados anteriormente (CHEN *et al.*, 2003), o que confirma que esta linhagem é capaz de produzir AC durante a sua fase exponencial (LYNCH; YANG, 2004; KENJI *et al.*, 2006). Lynch e Yang (2004) observaram que a taxa de degradação de AC foi comparável a da sua produção e que os produtos de degradação podem ser utilizados pelos microrganismos para a produção adicional do AC. Foi proposto que tal degradação pode ser o resultado da ação de metabólitos e enzimas produzidos pela linhagem (KENJI *et al.*, 2006), como dos compostos no meio de cultura, tais como aminoácidos e outros compostos inorgânicos (ROUBOS *et al.*, 2002) da autólise resultantes do aumento do pH, da decomposição microbiana e da re-metabolização (HU *et al.*, 1984).

Quanto ao efeito da temperatura, sabe-se que o aumento neste parâmetro estimula a produção de AC (VIANA *et al.*, 2009), mesmo que seja muito difícil de se avaliar, devido à ocorrência simultânea da degradação do AC dependente da temperatura. Na verdade, demonstrou-se recentemente, em experimentos com AC comercial, que o aumento na temperatura de 15 a 45 ° C leva a aumento correspondente na constante de degradação do AC de 0,005 a 0,012 h⁻¹ (SANTOS *et al.*, 2009).

IV.5 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo sugerem que o controle rigoroso do tempo de produção do AC seria um requisito fundamental na ampliação da escala no processo industrial para a produção contínua de AC pelo novo isolado *Streptomyces* DAUFPE 3060. O objetivo do próximo estudo será a tentativa de realizar este processo em biorreator.

Capítulo V

INVESTIGAÇÃO CINÉTICA E TERMODINÂMICA DA FORMAÇÃO E DA DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO DURANTE A FERMENTAÇÃO DE GLICEROL POR *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060

Este trabalho foi publicado no periódico Enzyme and Microbial Technology com fator de impacto igual a 1,96. Anexo III.

V. 1 RESUMO

Ácido clavulânico (AC) é um potente inibidor de β -lactamases, produzidas por alguns microrganismos patogênicos resistentes, o que permite o tratamento eficaz das doenças infecciosas. Os parâmetros termodinâmicos e cinéticos da produção e degradação de AC por uma nova linhagem de *Streptomyces*, DAUFPE 3060, foram avaliados. O efeito da temperatura sobre o sistema foi investigado no intervalo de 24 a 40 °C, adotando-se um modelo global e levando-se em conta (a) o tipo Arrhenius para a formação de AC por fermentação, (b) o desdobramento hipotético reversível da enzima limitante do metabolismo e (c) a degradação irreversível de primeira ordem do AC. As maiores taxas de formação de AC ($k_{AC} = 0,107\text{h}^{-1}$) e de degradação ($k_d = 0,062\text{ h}^{-1}$) foram observadas em 32 e 40 °C, respectivamente. Os principais parâmetros termodinâmicos, dos três eventos acima descritos, foram estimados. Em particular, os parâmetros de ativação da degradação do AC (Energia de ativação = 39,0 kJ/mol, $\Delta H^*_d = 36,5\text{kJ/mol}$; $\Delta S^*_d = -219,7\text{ J / (mol K)}$; $\Delta G^*_d = 103,5\text{kJ/mol}$) são comparados com aqueles relatados na literatura para sistema similar, sem levar em conta os outros dois eventos.

Palavras-chave: Ácido clavulânico, *Streptomyces* spp., parâmetros termodinâmicos, parâmetros cinéticos, degradação, fermentação.

V.2 INTRODUÇÃO

A atividade de enzimas β -lactamases, produzidas por bactérias, é responsável pela inativação de antibióticos β -lactâmicos, isto é, uma forma de resistência de algumas bactérias a antibióticos. O ácido clavulânico (AC) inibe a atividade dessas β -lactamases, inserindo seus anéis bicíclicos β -lactâmicos fundidos no sítio ativo das β -lactamases e as tornando inativas (READING; COLE, 1977). A reação do AC com a enzima é irreversível, ou seja, os produtos da reação se mantêm ligados à enzima (LYNCH; YANG, 2004). Sua aplicação em conjunto com a penicilina tem sido bem sucedida na solução do problema da resistência bacteriana aos β -lactâmicos e isso faz com que o AC seja muito importante, tanto clinicamente como economicamente. No entanto, sabe-se que o AC, na sua forma bruta, é quimicamente instável, como os outros compostos β -lactâmicos, e pode ser degradado durante o cultivo de bactérias para a sua produção (BAGGALEY *et al.*, 1997; BERSANETTI *et al.*, 2005). A perda de produto durante o processo de cultivo através da degradação é um problema significativo para o aumento da escala na indústria farmacêutica. O aproveitamento dos produtos da decomposição do antibiótico pode ser uma solução para evitar as perdas e, assim, reduzir custos (LYNCH; YANG, 2004).

Até a presente data, apenas poucos estudos têm sido realizados sobre a degradação de AC, com particular interesse para o efeito da temperatura, que é um dos principais fatores de modulação desse fenômeno (HAGINAKA *et al.*, 1981; MAYER; DECKWER, 1996). Alguns autores investigaram a estabilidade do AC em soluções tampão aquosas em vários níveis de pH e de temperaturas (BERSANETTI *et al.*, 2005; HAGINAKA *et al.*, 1981; MAYER; DECKWER, 1996), porém apenas um levou em consideração o estudo dos parâmetros termodinâmicos na termoestabilidade do AC (BERSANETTI *et al.*, 2005).

No entanto, como não há informação disponível na literatura sobre a simultânea formação e a cinética de degradação durante a fermentação de AC, o objetivo deste trabalho foi, principalmente, o estudo desse mecanismo, bem como dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos relacionados. Para esse fim, os autores se propuseram apresentar um novo modelo cinético que leva em conta (a) a formação de AC do tipo Arrhenius, (b) o desdobramento reversível da enzima limitante do metabolismo e (c) a degradação irreversível de primeira ordem do AC.

V.3 TEORIA

V.3.1 Modelo termodinâmico

O modelo proposto neste estudo descreve a influência da temperatura na cinética de formação e de degradação do ácido clavulânico (AC). Esse modelo baseia-se na hipótese de que a formação de AC acontece pela fermentação do glicerol (G) por *Streptomyces* DAUFPE 3060, modulada pela atividade de uma enzima global limitante do metabolismo, que pode ser sujeita a um desdobramento reversível:

em que E e EI são as formas ativa e desdobrada (forma inativa da enzima), respectivamente, e K_1 e K_2 (h^{-1}) são as constantes cinéticas das reações direta e inversa deste equilíbrio, respectivamente. Tal hipótese geral foi proposta anteriormente com sucesso para biosistemas completamente diferentes (CONVERTI *et al.*, 2002; SÁNCHEZ-LUNA *et al.*, 2007; SOLISIO *et al.*, 2003). Por conta da constante de uma reação catalisada por uma enzima ser modulada por ambas as concentrações da enzima ativa e do substrato, a constante de formação de AC depende diretamente deste equilíbrio. Como ressaltado em estudos anteriores realizados em diferentes sistemas biológicos (CONVERTI *et al.*, 2002; SÁNCHEZ-LUNA *et al.*, 2007; CONVERTI *et al.*, 2001; PEREGO *et al.*, 2003; PORTO *et al.*, 2006; SAMPAIO *et al.*, 2006), a chamada "abordagem termodinâmica" propõe que a constante aumente com a temperatura para todo sistema biológico, e isso pode ser contrastado pelo "desdobramento reversível", descrito pela eq. (1), que é responsável por uma diminuição líquida de atividade. As constantes cinéticas acima podem ser estimadas pela plotagem de semi-log de $\ln(AC/AC_0)$ em função do tempo, sob condições em que as reações direta e reversa não interfiram ou interfiram menos possível, sendo AC e AC_0 as concentrações de AC após um determinado tempo e, no início, respectivamente. Uma vez que o AC tem sido formado por fermentação, ele está sujeito à degradação irreversível a produto de degradação (PD) como consequência da sua instabilidade, de acordo com reação de primeira ordem dependente da temperatura:

em que K_d (h^{-1}) é a constante de degradação do AC.

V.3.2 Modelagem cinética da formação de AC

O referido modelo para a formação AC pode ser cineticamente descrito por uma combinação de equações de Arrhenius e Eyring, assim como para estimar os parâmetros termodinâmicos do sistema.

Na temperatura inferior à ótima ($T < T_{ótima}$) a dependência da temperatura pode ser descrita pela típica reação de Arrhenius (ROELS, 1983):

$$k_{AC} = A e^{-E^*/RT} \quad (3)$$

em que E^* é a energia de ativação da formação do AC (kJ/mol), A é a constante de Arrhenius (h^{-1}), R a constante do gás ideal (8,3145 J / mol.K) e T a temperatura absoluta (K).

A inativação dada pelo equilíbrio, responsável pela transformação da forma ativa da enzima limitante (E) em sua forma “desdobrada”, torna-se predominante em $T > T_{opt}$ e pode ser descrita pela equação:

$$E = \frac{E_0}{1 + K_i} \quad (4)$$

em que E_0 é a concentração inicial da enzima e K_i é a constante do desdobramento no equilíbrio.

Aplicando-se a equação de Gibbs para este equilíbrio, obtemos:

$$K_i = B_e^{-\Delta H_i^\circ / RT} \quad (5)$$

em que ΔH_i° é a variação de entalpia padrão do desdobramento no equilíbrio e

$$B = e^{\Delta S_i^\circ / R} \quad (6)$$

um fator pré-exponencial adicional dependente da variação da entropia padrão do mesmo equilíbrio (ΔS_i°).

Combinando-se as Eqs. (3) e (4)-(6) com a equação de Michaelis-Menten adaptada para essa fase de desdobramento da enzima, obtemos:

$$K_1 = \frac{Ae^{-E^\circ / RT}}{1 + Be^{-\Delta H_i^\circ / RT}} \quad (7)$$

À baixa temperatura, o segundo termo do denominador dessa equação torna-se insignificante, o denominador torna-se a unidade e a eq. (7) simplifica a equação de Arrhenius. Pelo contrário, em altas temperaturas, a contribuição da forma inativada da enzima torna-se predominante devido ao aumento de K_i , portanto, a unidade torna-se insignificante em relação ao segundo termo e a eq. (7) é simplificada para:

$$K_1 = \frac{A}{B} e^{(\Delta H_i^\circ - E^\circ) / RT} \quad (8)$$

V.3.3 Modelagem cinética da degradação do AC

Ao contrário do que se obteve para a formação de AC, a cinética de degradação térmica do AC e de compostos semelhantes tem sido amplamente explorada por vários autores (HAGINAKA *et al.*, 1981; KENJI *et al.*, 2006; LYNCH; YANG, 2004; MAYER; DECKER 1996; ROUBOS *et al.*, 2002). Parâmetros cinéticos do modelo de degradação do AC incluem a constante de velocidade da reação (k_d) e a ativação da energia relacionada (E_d^*). De acordo com Santos *et al.* (2009) e outros autores (BERSANETTI *et al.*, 2005; BRETHAUER *et al.*, 2008; HAGINAKA *et al.* 1981; MAYER; DECKER, 1996; ROUBOS *et al.*, 2002), a constante de degradação do AC pode ser modelada através de uma equação de primeira ordem:

$$dAC/dt = -k_d AC \quad (9)$$

em que AC é a concentração de ácido clavulânico (mg/L) e t o tempo (h) (LABUZA e RIBOH, 1982).

Quanto à hipótese de que, após a produção máxima de AC, ocorra progressiva diminuição da sua concentração, a qual foi o resultado da degradação térmica, sem qualquer outra formação, como uma reação irreversível; uma análise de regressão linear foi realizada na forma semi-log integrada da equação utilizando apenas os dados experimentais após essa ocorrência:

$$\ln \frac{AC}{AC_o} = -k_d \cdot t \quad (10)$$

em que AC_o é a concentração máxima de AC.

Da mesma forma que se observou a reação direta da formação de AC, a reação inversa de degradação é dependente da temperatura (k_d) e estimada pela equação de Arrhenius, da seguinte forma:

$$k_d = A_d \cdot e^{-E_d^* / RT} \quad (11)$$

em que a E_d^* é a energia de ativação relacionada com a degradação.

V.4 MATERIAL E MÉTODOS

V.4.1 Reagentes

O clavulanato de potássio, oriundo de *S. clavuligerus*, e o imidazol utilizados para determinar a concentração de AC na curva de calibração e na determinação da AC foram fornecidos pela Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). Sais, glicerol, peptona bacteriológica, extrato de malte e extrato de levedura, utilizados para preparar os meios de cultura, foram reagentes de grau analítico.

V.4.2 Microrganismo

O microrganismo *Streptomyces* DAUFPE 3060 foi gentilmente cedido da Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, PE, Brasil). O método de Lawrence (1956) foi utilizado para a etapa de isolamento desse microrganismo diretamente de amostras de solo. Esporos obtidos de colônias crescidas em meio de cultura sólido foram coletados e cultivados em meio de cultura líquido por 96h. Após o cultivo, a biomassa foi determinada por peso seco (em torno de 6 a 7 g/L), liofilizada, armazenada em criotubos (glicerol a 10% v/v) a -70°C e utilizada ao longo do presente trabalho.

V.4.3 Meios de cultura

O meio de reativação teve a seguinte composição (em g/L de água destilada): glicerol, 15; peptona bacteriológica, 10; extrato de malte, 10; extrato de levedura, 1,0; K₂HPO₄, 2,5; MgSO₄ . 7H₂O, 0,75; MnCl₂ . 4H₂O; 0,001; FeSO₄ . 7H₂O, 0,001 e ZnSO₄ . 7H₂O, 0,001. O pH do meio foi ajustado para 6,8 com NaOH 5,0 M antes de autoclavagem a 121 ° C por 15 min. Para preparação do inóculo foi utilizado o meio de cultura proposto por Maranesi *et al.* (2005) com a seguinte composição (em g/L de água destilada): glicerol, 10; farinha de soja (FS), 20; K₂HPO₄, 1,2; MnCl₂ . 4H₂O, 0,001; FeSO₄ . 7H₂O, 0,001 e ZnSO₄ . 7H₂O, 0,001, pH 6,8. A composição do meio de produção foi semelhante à utilizada para o inóculo, exceto para a concentração de FS (40 g/L).

V.4.4 Condições de cultivo

A reativação foi preparada pela adição de 3 mL da suspensão de esporos (6-7 g/L de peso seco) contidos no criotubo em 100 mL de meio de reativação em Erlenmeyers de 500 mL de capacidade. Após a incubação em 200 rpm de agitação a 28 °C, por 24 h, 90 mL de meio de inóculo contidos em Erlenmeyers de 500 mL de capacidade foram inoculados com 10 mL dessa cultura de reativação e incubados por 24 h nas mesmas condições descritas anteriormente. Essa cultura (100 mL) foi transferida para 900 mL de meio de produção contido em biorreator de 3,0 L, modelo Z61103CT04 (Applikon, Schiedam, Holanda) acoplado ao dispositivo eletrônico, modelo ADI1030 (Applikon), o qual permitiu maior controle das condições de cultivo. Os experimentos foram realizados em diferentes temperaturas (24, 28, 32, 36 e 40°C), a 800 rpm e 2,0 vvm de aeração, o pH foi controlado

automaticamente a $6,8 \pm 0,1$ por adição de soluções de 2 M de HCl e 2M de NaOH. A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada por um eletrodo galvânico esterilizado, InPro6000 Series (Mettler-Toledo, Novate Milanese, Itália). Duas amostras de 15 mL foram retiradas a cada 24h para determinação das concentrações de célula, de glicerol e de AC.

V.4.5 Métodos analíticos

O caldo fermentado foi centrifugado a 5.500 $\times g$ por 20 min a 4 °C e a massa celular foi lavada duas vezes com água destilada e seca a 80 °C. A dosagem espectrofotométrica de AC, através da sua reação com o imidazol, selecionada neste estudo, foi descrita em detalhe por Bird *et al.* (1982). Segundo este método, a concentração de AC no caldo fermentado é determinada pela medição do aumento da densidade óptica a 311 nm devido à liberação do produto [1 - (8-hidroxi-6-oxo-4-azooct-2-enol) imidazol-] da reação entre AC e imidazol. A concentração de glicerol foi determinada por HPLC (Hewlett Packard). O sistema é constituído pelo HP-1050 Intelligent Auto Sampler, pelo HP-1047A Refractive Index detector pela bomba HP 1050. A separação foi realizada usando uma coluna Supelcogel H59304-U (Sigma Aldrich Corp., Bellefonte, PA) e eluída com 0,005 M H₂SO₄ em um fluxo de 0,5 mL/min a 50°C. A curva de calibração com 1,0 g/L de glicerol foi utilizada como padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

V.4.6 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em valores médios. Os erros dos dados experimentais a partir de valores médios foram expressos como desvios padrões utilizando o programa Microsoft Excel 2000 (MapInfo Corporation, Troy, NY, USA) e ilustrados através de barras de erros.

V.4.7 Estimação dos parâmetros termodinâmicos

A energia de ativação da etapa de desdobramento da enzima foi estimada neste estudo através da análise de regressão, da inclinação da reta obtida pela plotagem $\ln k_1$ em função $1/T$, exclusivamente sob condições de $T < T_{opt}$. Os outros parâmetros termodinâmicos, ou seja, da entalpia (ΔH^*) e da entropia (ΔS^*), foram estimados pela análise de regressão de $\ln (k_1/T)$ em função $1/T$ (ARIAHU; OGUNSUA, 2000), de acordo com a equação de Eyring (1935) obtida a partir da teoria de transição de estado:

$$\ln \frac{k_1}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^*}{R} - \frac{\Delta H^*}{RT} \quad (12)$$

em que k_B é a constante Boltzmann ($1,380658 \cdot 10^{-23}$ J/K) e h é a constante de Plank ($6,6260755 \cdot 10^{-34}$ J.s).

Por outro lado, da plotagem, de acordo com Arrhenius, dos valores de k_1 coletados em $T > T_{opt}$, uma nova linha reta foi obtida cuja inclinação e intercepta foram estimadas pela eq. (8), através dos valores de ΔH°_i e B e, pela eq. (6), os de ΔS°_i .

Da mesma forma que calculada para a etapa de desdobramento da enzima, a energia de ativação da degradação do AC foi estimada por análise de regressão a partir da inclinação da reta obtida plotando-se $\ln k_d$ em função $1/T$, enquanto ΔH^*_d e ΔS^*_d foram estimados utilizando uma equação semelhante à eq. (12). Ambas as energias livres de ativação (ΔG^* e ΔG_d) e a variação de energia livre padrão do desdobramento da enzima no equilíbrio (ΔG°_i) foram estimadas a partir dos valores correspondentes de entalpia e entropia pela equação geral:

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (13)$$

V.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.5.1 Cinética de fermentação e degradação

A produção de ácido clavulânico (AC) através da fermentação do glicerol por *Streptomyces* DAUFPE 3060 foi investigada em temperaturas variando no intervalo de 24 a 40°C, a fim de se estimar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos de ambos os fenômenos: formação e degradação do AC. A Figura V.1 mostra, por exemplo, o comportamento, em função do tempo, da produção de AC, do consumo de glicerol e da produção de biomassa ao longo da fermentação a 32 °C, na qual os melhores resultados foram obtidos. Nota-se que a concentração de AC aumentou progressivamente até o valor máximo (539 mg/L) após 54h, correspondente à produtividade volumétrica de 10,0 mg/L.h e, em seguida, diminuiu a quase o seu total desaparecimento, após 120h. Este valor é semelhante ao relatado pela produção AC por *S. clavuligerus* por Ortiz *et al.* (2007) no mesmo meio de cultivo, porém suplementado com diferentes quantidades de fonte de nitrogênio (FS) e óleo de soja (9,5-10,8

mg/ L.h), e por Baptista Neto *et al.* (2005) para meio de cultura contendo Samprosoy, extrato de levedura e glicerol (11,7 mg/L.h). Valores superiores foram obtidos em fermentação contínua (18,3 mg/L.h) e com reciclo celular (221,1 mg/L.h) (BAPTISTA NETO *et al.*, 2005). Ao mesmo tempo, o glicerol continuou a ser consumido durante toda a fermentação, enquanto que o microrganismo diminuiu o seu crescimento após 24h. Vários autores relataram que a diminuição brusca da concentração AC seria a consequência de sua instabilidade, que se torna mais forte com o aumento da temperatura (BERSANETTI *et al.*, 2005; BRETHAUER *et al.*, 2008; HAGINAKA *et al.* 1981; MAYER; DECKER, 1996; ROUBOS *et al.*, 2002).

No entanto, nenhum estudo cinético sistemático foi feito. Essa degradação pode ocorrer ou não simultaneamente com a formação de AC durante a fermentação.

Figura V.1. Produção de ácido clavulânico pela fermentação de *Streptomyces* DAUFPE 3060 a 32°C. Concentração do AC (□), consumo de glicerol (●) e produção de biomassa (▲)

Os dados experimentais de $\ln (AC / AC_0)$ obtidos da fermentação realizada a 32 °C, selecionada como temperatura ótima, foram plotados em função do tempo na Figura V.2. Devem-se reconhecer duas fases diferentes, a primeira fase até 54h, na qual a formação de AC foi o principal evento (linha reta, à esquerda), a outra, após 54h, na qual prevaleceu a degradação do AC (linha reta, à direita). Os valores observados nestas linhas retas referem-se a todos os resultados das fermentações que se permitiram estimar, através dos modelos

propostos no item V.3; os valores de k_{AC} e k_d estão listados na Tabela V.1. Uma boa correlação foi obtida em ambos os casos ($r^2 = 0,9807$ para k_{AC} e $r^2 = 0,9609$ para k_d).

Figura V.2. Formação (■) e degradação (□) do ácido clavulânico durante a fermentação do glicerol pelo *Streptomyces* DAUFPE 3060 a 32 °C

Segundo o mecanismo proposto, o aumento progressivo no valor de k_{AC} com a temperatura, até valor máximo de $0,107 \text{ h}^{-1}$ em $T = 32 \text{ °C}$, está em conformidade com a teoria Arrhenius. Como esperado, a constante cinética de degradação de AC (k_d) aumentou progressivamente com a temperatura sem interrupção a partir de $0,028 \text{ h}^{-1}$ a 24 °C a $0,062 \text{ h}^{-1}$ a 40 °C , o que correspondeu à diminuição progressiva na meia-vida de 24 a 11h (Tabela V.1). Em outras palavras, após certo tempo de fermentação, a formação AC tornou-se insignificante e a sua degradação foi o fenômeno predominante.

Tabela V.1. Principais parâmetros cinéticos da fermentação do glicerol a ácido clavulânico por *Streptomyces* DAUFPE 3060 em diferentes temperaturas

T (°C)	24	28	32	36	40
k_{AC} (h ⁻¹) ^a	0,038	0,074	0,107	0,054	0,038
r^2	0,958	0,949	0,981	0,988	0,991
k_d (h ⁻¹) ^b	0,028	0,036	0,043	0,056	0,062
r^2	0,945	0,942	0,961	0,978	0,971
$t_{1/2}$ (h) ^c	24	19	16	12	11

^aTaxa de formação do ácido clavulânico.

^bTaxa de degradação do ácido clavulânico.

^cTempo de meia-vida do ácido clavulânico.

Nenhuma comparação foi possível para as constantes k_{CA} , k_i e K_i com a literatura, por causa da nova abordagem cinética do presente trabalho. Todavia, Kenji *et al.* (2006) estudaram a degradação de AC durante a fermentação utilizando um meio de cultivo complexo, contendo peptona, triptona, caldo de soja e glicerol, e obtiveram valor de k_d a 28 °C e pH 6,5 de 0,022 h⁻¹, cerca de 40% menor do que aquele obtido neste estudo à mesma temperatura, provavelmente devido à sensibilidade do AC a produtos químicos, tais como aminoácidos, e a outras substâncias inorgânicas. O aumento de 30% na taxa de degradação foi observado quando o mesmo meio de cultivo foi colocado três vezes ao calor da esterilização.

Da mesma forma que os nossos resultados, Bersanetti *et al.* (2005) observaram que em pH 7,0 o valor do k_d aumentou progressivamente com a temperatura em meio fermentado semelhante, atingindo valores a 30 °C de 0,041 h⁻¹ e a 40 °C de 0,055 h⁻¹, comparáveis aos do presente estudo. Haginaka *et al.* (1981) observaram, em solução aquosa de pH 6,7 praticamente coincidente, o valor de k_d a 35 °C (0,057 h⁻¹), bem como valores significativamente mais elevados quando a temperatura foi aumentada.

No que diz respeito às possíveis razões da degradação de AC, estão em consideração o grande número de diferentes hipóteses formuladas. Por exemplo: o resultado da ação de metabólitos ou enzimas produzidas pela linhagem (KENJI *et al.*, 2006) ou compostos no meio de cultura, tais como aminoácidos e outros materiais inorgânicos (ROUBOS *et al.*, 2002), autólise resultante do aumento do pH, decomposição microbiana e re-metabolização (HU *et al.*, 1984; LYNCH; YANG, 2004; MAYER; DECKER 1996;) ou ainda a capacidade do AC catalisar a sua própria decomposição, tal como ocorre com alguns antibióticos sensíveis, em geral, à catálise ácido-base ou contendo grupos hidroxila ou amino (BRETHAUER *et al.*, 2008).

V.5.2 Parâmetros termodinâmicos da formação e da degradação do ácido clavulânico

Como explicado no item V.3, a estimativa dos parâmetros termodinâmicos do sistema requer a elaboração dos gráficos do tipo Arrhenius e Eyring, conforme ilustrados nas Figuras V.3 e V.4, respectivamente. Em particular, de acordo com as eqs. (3) e (12), a Figura V.3 representa, segundo Arrhenius, a energia de ativação do AC nas etapas de formação e de degradação, bem como a variação de entalpia padrão da etapa de desdobramento da enzima no equilíbrio, enquanto que na Figura V.4 estão ilustradas as variações de entalpia padrão e de entropia das etapas de formação e de degradação do AC, segundo Eyring.

Figura V.3. Formação de AC ($\circ$), desdobramento da enzima ($\bullet$) e degradação de AC ($\blacktriangle$) segundo Arrhenius durante a fermentação do glicerol pelo *Streptomyces* DAUFPE 3060 a diferentes temperaturas

Figura V.4. Formação (○) e degradação (▲) de AC segundo Eyring durante a fermentação do glicerol pelo *Streptomyces* DAUFPE 3060 em diferentes temperaturas (24, 28, 32, 36 e 40°C)

A Tabela V.2 lista os parâmetros termodinâmicos desses dois supostos fenômenos. Embora a entalpia de ativação da degradação do AC ($\Delta H^*_d = 36,5 \text{ kJ/mol}$) tenha sido muito menor que a formação do AC ($\Delta H^* = 95,1 \text{ kJ/mol}$), a sua entropia foi muito maior em valor absoluto ($\Delta S^*_d = -219,7 \text{ J/(mol K)}$; ($\Delta S^* = -19,7 \text{ J/(mol K)}$), conduzindo, assim, a valores comparáveis de energia livre de ativação ($\Delta G^*_d = 103,5 \text{ kJ/mol}$; $\Delta G^* = 101,1 \text{ kJ/mol}$). Isso significa que a realização da fermentação no nível térmico, apenas um pouco acima da temperatura ótima, tornaria a degradação do AC irreversível e inevitável. É interessante observar que ambos valores de ΔH^* são positivos; isso confirma que tanto a formação quanto a degradação são processos endotérmicos. Além disso, ambos os valores de ΔS^* são negativos; como esperado pela formação, nos dois casos, ocorrem os estados de transição com moléculas rígidas reativas comparadas com aquelas reativas, porém, separadas. Esse resultado poderia ser consistente no primeiro caso com a formação do complexo entre a enzima e o substrato, entretanto, para o fenômeno de degradação do AC, ainda não é bem conhecido.

Outra possível explicação é que a degradação do AC pode não ser, na verdade, um fenômeno puramente térmico, sendo possível a ocorrência de algumas interações com outras substâncias, tanto presentes inicialmente no meio de cultivo (ROUBOS *et al.*, 2002) como produzidas pelo microrganismo durante a fermentação (KENJI *et al.*, 2006). Essa explicação poderia ser embasada no estudo de Bersanetti *et al.* (2005), que observaram energia de

ativação (66 kJ/mol) mais de duas vezes maior em soluções aquosas que aquela obtida em meio fermentado (24 kJ/mol). Entretanto, esse valor é menor que aquele observado neste trabalho ($E^* = 39$ kJ/mol).

Tabela V.2. Parâmetros termodinâmicos da formação e da degradação térmica do AC

Parâmetro	Formação de AC ^a	Degradação de AC ^a	Desdobramento da Enzima ^b
E (kJ/mol)	97,6	39,0	-
ΔH (kJ/mol)	95,1	36,5	183,7
ΔS (J/mol.K)	-19,7	-219,7	603
ΔG (kJ/mol)	101,1	103,5	-254,4

O valor muito alto e positivo da variação de entropia padrão da inativação enzimática ($\Delta S_i^\circ = 603$ J/mol .K) pode ser explicado pelo aumento já conhecido do número de graus de liberdade consequentes do desdobramento de qualquer enzima, responsável pela ruptura de sua estrutura tridimensional. Já o valor muito alto da variação de entalpia ($\Delta H_i^\circ = 183,7$ J/mol) está relacionado com a natureza endotérmica da inativação enzimática. Pelo contrário, o valor elevado e negativo da variação da energia livre padrão ($\Delta G_i^\circ = -254,4$ J/mol) nos induz a acreditar que esse desdobramento poderia levar a uma forma desnaturada da enzima ainda mais estável do que a forma ativa. No entanto, pelas hipóteses formuladas no presente estudo este parâmetro não pôde ser estimado.

V.6 CONCLUSÕES

A cinética e a termodinâmica da produção de AC durante a fermentação de *Streptomyces* DAUFPE 3060 foram bem representadas por um modelo dos tipos Arrhenius e Eyring, tendo-se em conta três diferentes eventos: a) formação de AC pelo modelo de Arrhenius; b) hipotético desdobramento reversível da enzima; c) degradação irreversível de AC. A literatura não contém relatos sobre os estudos de formação e de degradação simultâneos durante a fermentação de glicerol em AC por *Streptomyces* DAUFPE 3060. Neste trabalho, a temperatura mostrou seu efeito mais significativo sobre a constante de degradação (k_d), que aumentou progressivamente com a temperatura (até 40 °C), enquanto a constante de formação de AC (k_{AC}) aumentou até 32 °C e, em seguida, diminuiu. Todos os

parâmetros termodinâmicos dos três eventos foram estimados tendo esta última temperatura como referência. Os valores de variação dos parâmetros de entropia, entalpia e energia livre correspondentes ao desdobramento reversível da enzima foram: 603 J/mol.K, 183,7 kJ/mol e -254,4 kJ/mol, respectivamente. Os valores correspondentes à ativação na formação de AC foram -19,7 J/mol.K, 95,1 kJ/mol e 101,1 kJ/mol e os referidos à degradação de AC foram -219,7 J/mol. K, 36,5 kJ/mol e 103,5 kJ/mol, respectivamente.

Capítulo VI

COMPARAÇÃO DO COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA NOS SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO CONVENCIONAL E EXTRATIVA

Este artigo foi publicado no periódico Biochemical Engineering Journal com fator de impacto igual a 1,87. Anexo IV.

VI.1 RESUMO

Aeração e agitação são variáveis importantes para garantir a efetiva taxa de transferência de oxigênio em meios de cultivo utilizados em bioprocessos aeróbios. Por esse motivo, o conhecimento do coeficiente de transferência de massa volumétrico (k_{La}) é requerido. Neste trabalho foi realizada comparação entre os valores de k_{La} em água destilada, em meio simples de fermentação e em meio utilizado para fermentação extrativa em sistema de duas fases aquosas, na ausência de biomassa e sob diferentes condições de aeração e agitação, selecionadas como variáveis independentes. Ambas as variáveis apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre o k_{La} e o maior valor desse parâmetro para ambos os meios de cultivo, para fermentação simples (241 s^{-1}) e fermentação extrativa com SDFA ($70,3\text{ s}^{-1}$), foi observado nos maiores níveis de aeração (5 vvm) e de agitação (1.200 rpm). Os valores de k_{La} foram então utilizados para estabelecer correlações matemáticas dessa resposta em função das variáveis do processo. Os expoentes do *power number* (relacionados com a distribuição de forças totais sobre o *impeller*) ($N^3 D^2$) e da velocidade superficial do gás (V_s), determinados em água destilada ($\alpha = 0,39$; $\beta = 0,47$, respectivamente), estão de acordo com os relatados na literatura para sistemas aquosos semelhantes; aqueles determinados para o meio simples de fermentação também corresponderam ($\alpha = 0,38$ e $\beta = 0,41$). Por outro lado, como esperado, com o aumento da viscosidade, na presença de PEG, esses valores foram notavelmente mais elevados no meio de cultivo utilizado para a fermentação extrativa em sistema de duas fases aquosas ($\alpha = 0,50$ e $\beta = 1,0$). Razoável concordância foi encontrada entre os dados experimentais do k_{La} para os três sistemas selecionados e os valores previstos pelos modelos teóricos, no âmbito de vasta gama de condições operacionais.

Palavras-chave: meio de fermentação, meio de fermentação extrativa, k_{La} , coeficiente de transferência de massa, agitação, aeração.

VL.2 INTRODUÇÃO

A fermentação extrativa pode representar uma solução tecnológica para a recuperação do produto *in situ* para diminuir a inibição pelos contaminantes e a baixa produtividade volumétrica, que ocorrem frequentemente em muitos processos fermentativos. Como o próprio nome sugere, o conceito implica em um método que integra a etapa de produção e de extração da molécula como a primeira etapa de *downstream* para a recuperação do produto (KANNAN, 1997).

O sistema de duas fases aquosas (SDFA) é uma ferramenta alternativa e eficiente para concentrar e purificar biomoléculas por particionamento para alguma das fases líquidas. O sistema é constituído de duas fases imiscíveis compostas de dois polímeros em água ou de uma solução de polímero e uma solução de sal; geralmente contém cerca de 80 a 90% de água e, conseqüentemente, proporciona excelente ambiente para células, organelas celulares e substâncias biologicamente ativas (KULA *et al.*, 1982).

Na fermentação extrativa utilizando SDFA, as células geralmente são imobilizadas em uma das duas fases e o produto desejado particiona para outra fase do sistema. Sistemas polímero/sal são mais utilizados em grande escala por causa de seu custo relativamente baixo, separação em curto tempo, alta seletividade e estabilização da estrutura da biomolécula pelos polímeros (BANIK *et al.*, 2003; KANNAN, 1997).

O nível de oxigênio dissolvido (OD) e o efeito de rompimento da biomassa são importantes fatores que influenciam nos bioprocessos com SDFA utilizando polietileno glicol (PEG) como uma fase polimérica e solução de sais como fase líquida. A diminuição na taxa de transferência de oxigênio pode ocorrer no meio de cultivo, tanto quando se aumenta a concentração do soluto, como com a ação do PEG reduzindo significativamente a difusão e a solubilidade do oxigênio. No entanto, nenhum estudo foi realizado sobre a difusão de oxigênio nos sistemas de fermentação extrativa, embora esse seja um dos fatores mais importantes (BANIK *et al.*, 2003).

A aeração eficiente depende da solubilização do oxigênio, da taxa de difusão no meio de cultura e da capacidade do biorreator em permitir uma demanda de oxigênio satisfatória para o crescimento microbiano. Em particular, o OD do meio de cultura depende da taxa de absorção do oxigênio (OUR) pela célula ou da taxa de transferência de oxigênio (OTR). Esse último parâmetro, por sua vez, depende da taxa de fluxo de ar, pode desempenhar papel importante e, muitas vezes, afeta o coeficiente volumétrico de transferência de massa global (k_La) e, conseqüentemente, a produtividade (MONTES; CATALAN, 1998).

O k_{La} , principal parâmetro estudado em fermentações em biorreatores agitados, depende de uma série de fatores, tais como: características geométricas e operacionais do próprio biorreator, composição do meio de cultura, viscosidade, tensão superficial, concentração de solutos, morfologia do microrganismo e, principalmente, da área superficial, a , das bolhas de ar (ligada à velocidade de agitação e à homogeneização do meio de cultura). A análise do k_{La} em reatores de tanque agitado pode ser estimada por grande número de equações, a maioria das quais empíricas (CALDERBAK; MOO-YOUNG, 1961; PEREZ; SANDALL, 1974) e outras com base teórica (LAMONT; SCOTT, 1970; ZHANG; THOMAS, 1996). Os sistemas poliméricos podem interferir na transferência de oxigênio e no k_{La} pela sua alta viscosidade (EICKENBUSCH *et al.*, 1995; KOBAYASHI *et al.*, 1994; KWON *et al.*, 1996).

O objetivo deste trabalho foi determinar as melhores condições de transferência de oxigênio, comparando os valores k_{La} em um sistema de fermentação extrativa utilizando SDFA (SFE), em água destilada e no meio simples de fermentação (SF), na ausência de biomassa e em diferentes condições de aeração e agitação.

VI.3 MATERIAL E MÉTODOS

VI.3.1 Reagentes

O polietilenoglicol de massa molar de 8.000 g/mol (PEG 8000) (catálogo no. P-2139) e a farinha de soja (FS) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO). Todos os outros produtos químicos utilizados para preparar os meios de cultura, especificamente sais, glicerol, peptona bacteriológica, extrato de malte e extrato de levedura, foram reagentes de grau analítico da Fluka (Buchs, Suíça) e da Merck (Darmstadt, Alemanha).

VI.3.2 Meio simples de fermentação

O meio de cultura proposto por Maranesi *et al.* (2005) foi utilizado como meio simples de fermentação e possui a seguinte composição (em g/L de água destilada): glicerol, 10; farinha de soja (FS), 40; K_2HPO_4 , 1,2; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,001; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001 e $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001, pH 6,5.

VI.3.3 Meio para fermentação extrativa utilizando SDFA

Um litro de uma solução de sais de fosfato 25,0% (p/p) foi preparado pela mistura de 479 mL de 27,3% (p/p de solução de NaH_2PO_4) e 521 mL de 22,9% (p/p de solução de K_2HPO_4) (pH 6,5). Esta solução de sais foi misturada com 25,0% (p/p) PEG 8.000 e meio de cultura contendo 40 g/L de FS e 10 g/L de glicerol. Depois de ajustar novamente o pH para 6,5, o sistema foi autoclavado a 121 °C por 20 min.

VI.3.4 Fermentador

Todos os experimentos foram realizados a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ em biorreator de 3,0L, modelo Z61103CT04 (Applikon, Schiedam, Holanda), acoplado ao dispositivo eletrônico, modelo ADI1030 (Applikon), o qual permitiu maior controle das condições de cultivo. A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada por um eletrodo galvânico esterilizado, InPro6000 Series (Mettler-Toledo, Novate Milanese, Itália).

VI.3.5 Planejamento fatorial completo

O planejamento estatístico completo 2^2 foi utilizado com o objetivo de investigar a influência de duas variáveis independentes, agitação e aeração, na resposta selecionada ($y = k_La$) (Tabela VI.1), tanto no sistema de fermentação quanto no sistema de fermentação extrativa utilizando SDFA. Um modelo de regressão linear foi proposto para prever a resposta:

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

em que b_0 é o coeficiente de intercepção, b_i são os coeficientes lineares, b_{ij} são os coeficientes de interação e x_i e x_j são os valores codificados das variáveis independentes. A validação do modelo foi obtida através do coeficiente de determinação (R^2) e da análise de variância (ANOVA); a equação do modelo de primeira ordem foi determinada pelo teste de Fischer. Esse planejamento contém 7 ensaios com 3 repetições no ponto central para possibilitar o cálculo do erro experimental. Após a realização dos experimentos foi feita a análise estatística dos resultados, com o auxílio do software *Statistic* 6,0.

Tabela VI.1. Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo 2^2 para estudar a influência da agitação e da aeração no k_{La} em água destilada, no meio simples de fermentação e no sistema de fermentação extrativa

Níveis	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
1- Agitação (rpm)	700	950	1200
2- Aeração (vvm)	2,0	3,5	5,0

VI.3.6 Determinação do k_{La}

Para determinar os valores experimentais do k_{La} foi utilizado o método estático (CASCAVAL *et al.*, 2002; MOO-YOUNG *et al.*, 1985; OZBEK; GAYIK, 2001), o qual tem a vantagem de ser aplicado em diferentes meios de cultivo sem crescimento microbiano. Isto consiste na determinação da taxa de incremento da concentração do oxigênio dissolvido (OD) no meio de cultivo após a diminuição dessa concentração pela passagem de gás nitrogênio pelo sistema por 20 minutos. O fluxo de gás nitrogênio é cessado quando a concentração de oxigênio se aproxima do valor 0. Nesse caso, o ar foi utilizado no lugar do oxigênio puro.

O balanço de massa do oxigênio dissolvido no meio de cultivo bem homogeneizado pode ser descrito como:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) \quad (2)$$

em que C é a concentração de O_2 acumulado na fase líquida e C^* a concentração de oxigênio saturado no meio de cultivo.

VI.3.7 Correlação entre k_{La} e as variáveis operacionais

A taxa de absorção de um composto gasoso em um tanque agitado é geralmente baseada em correlações entre o k_{La} , a potência de agitação mecânica por unidade de volume (P/V_L) e a taxa de dispersão do gás expressa em termos de velocidade superficial (V_s) (ms^{-1}) (OZBEK; GAYIK, 2001):

$$k_L a = A \left[\frac{P}{V_L} \right]^\alpha [V_s]^\beta \quad (3)$$

em que P é a potência de agitação mecânica na dispersão de gás liquefeito (W), V_L é o volume de líquido (m^3), A é uma constante e α e β são expoentes empíricos que serão determinados experimentalmente para cada sistema.

No entanto, de acordo com Ozbek e Gayik (2001), uma vez que o cálculo da exata medição da potência de agitação real no sistema pode vir a ser complicado, a equação (3) pode ser geralmente adaptada dessa forma:

$$k_L a = AND^{\alpha_1 \alpha_2} [V_s]^\beta \quad (4)$$

em que D é o diâmetro do agitador mecânico (m) e N (s^{-1}) é a velocidade de agitação do agitador mecânico.

Portanto, como sugerido na literatura (RICHARDS, 1961; YOSHIDA *et al.*, 1960), optamos por utilizar o número de potência (*power number*), ou seja, $N^3 D^2$, para representar potência de agitação mecânica por unidade de volume:

$$k_L a = A(N^3 D^2)^\alpha [V_s]^\beta \quad (5)$$

Seguindo a mesma abordagem de outros pesquisadores (WISEMAN, 1977; WU, 1995), os valores de $k_L a$ calculados a partir dos dados experimentais, nas condições listadas na Tabela VI.1, foram plotados em base log entre $N^3 D^2$ e V_s , e os expoentes α e β foram estimados pelo método dos mínimos quadrados para os três sistemas selecionados.

As principais informações mecânicas do fermentador de bancada são as seguintes: volume de operação, 1,0 L; diâmetro interno do fermentador, 13 cm; altura do fermentador, 20 cm; número de chicana, 3; altura da chicana, 13,5 cm; largura da chicana, 1,5 cm; número de agitadores mecânicos, 2; localização dos agitadores mecânicos em relação ao topo, 14 cm; localização dos agitadores mecânicos em relação ao fundo, 5 cm; tipo de agitadores mecânicos, Rushton disco de turbina, diâmetro do disco do agitador mecânico, 3,0 cm; largura da lâmina do agitador mecânico, 1,4 cm comprimento da lâmina do agitador mecânico, 1,9 cm; número de lâminas do agitador mecânico, 6.

VI.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI.4.1 Relação entre k_{La} e C^* nos sistemas do meio de fermentação simples e da fermentação extrativa

Conforme alguns autores que estudaram diferentes sistemas de fermentação (BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006; KIM *et al.*, 2002; KOUDA *et al.*, 1997), os valores de k_{La} determinados nos sistemas do meio de fermentação simples (k_{La_f}) e da fermentação extrativa ($k_{La_{ef}}$) foram máximos em altos níveis de aeração (5 vvm) (Figura VI.1) e agitação (1.200 rpm) (Figura VI.2). O valor de k_{La_f} foi três vezes maior que o de $k_{La_{ef}}$; isso significa que a transferência de oxigênio foi influenciada pela alta viscosidade do PEG (140 mPa.s), o qual é também utilizado em outros estudos como componente polimérico em sistema de fermentação extrativa (CHRISTI; JAUREGUI-HAZA, 2002; GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 1998; MONTES *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 1979;); entretanto, as diferentes quantidades de sal usadas podem ter, de alguma forma, também contribuído para aquele efeito (BADINO *et al.*, 2001). Em condições similares, Clarke *et al.* (2006) investigaram os efeitos da adição de hidrocarbonetos no k_{La} em biorreatores. Esses autores observaram que o valor de k_{La} diminuía quando a viscosidade aumentava, o que acontecia devido à dificuldade da transferência de oxigênio. Comportamento semelhante foi observado na presença de emulsificantes (ROLS *et al.*, 1990).

Figura VI.1. Relação entre os valores de k_{La} em função da agitação e da aeração no meio simples de fermentação, de acordo com o planejamento fatorial completo 2^2 da Tabela VI.1

Figura VI.2. Relação entre os valores de k_{La} em função da agitação e da aeração no meio de fermentação extrativa, de acordo com o planejamento fatorial completo 2^2 da Tabela VI.1

Como esperado, o valor da concentração de oxigênio dissolvido (OD) no equilíbrio ($C^* = 9,15 \pm 0,54 \text{ mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$), calculado nesse estudo pela eq. (2) para o meio de fermentação simples, foi similar aquele em água ($C^* = 8,50 \pm 0,50 \text{ mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$). Entretanto, esse foi significativamente maior que o obtido no meio de fermentação extrativa ($5,99 \pm 0,28 \text{ mg}_{\text{O}_2}/\text{L}$). Esse fenômeno ocorreu devido à diminuição na polaridade induzida pela solução de PEG (GAGNON *et al.*, 1998).

A lenta difusão do oxigênio no sistema contendo PEG não necessariamente afeta o rendimento da produção, o qual depende, por outro lado, do bioprocessamento como um todo. Um exemplo foi observado pelo aumento da produção de α -amilase por *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* na fase de alta atividade metabólica usando o sistema PEG/dextrana em SDFA com altos níveis de PEG (25%) (ANDERSSON *et al.*, 1985; BAILEY, 1986).

Na produção de subtilina por *B. subtilis*, a concentração de 20% (p/p) PEG 6.000 não apresentou nenhum efeito inibitório significativo (KUBOI *et al.*, 1994), enquanto Hotha e Banik (1997) observaram produção máxima de protease alcalina em SDFA 13,6% (p/p) PEG 4.000/13,75% (p/p) de fosfato de potássio, que foram 2,8 vezes superiores ao obtido em meio simples de fermentação sem SDFA. O nível de OD pode realmente ser influenciado pela fase rica em polímeros em função da área interfacial exposta ao ar, a , que aumenta, enquanto a tensão superficial e o coeficiente de transferência, k_L , diminuem, levando à interface mais rígida, por causa da alta capacidade do PEG de se ligar com a água (ARNOLD *et al.*, 1985; BLOW *et al.*, 1978; TILCOCK e FISHER, 1982).

VI.4.2 Análise do planejamento estatístico completo

Os principais resultados experimentais do k_La , obtidos para os dois sistemas de fermentação selecionados, estão listados na Tabela VI.2. Os experimentos foram realizados de acordo com um planejamento fatorial completo 2^2 para obter modelos lineares que descrevem a influência da agitação e da aeração no valor de k_La calculado para os sistemas no meio de fermentação simples (k_{La_f}) e de fermentação extrativa ($k_{La_{ef}}$). Esses resultados demonstram que o maior valor de k_La obtido no sistema de fermentação simples (241 s^{-1}), observado a 28°C , pH 6,8, 1.200 rpm e 5 vvm (ensaio 4), foi aproximadamente 3 vezes maior que aquele obtido no sistema de fermentação extrativa (70 s^{-1}) nas mesmas condições.

Tabela VI.2. Combinações dos níveis das duas variáveis independentes (agitação e aeração) utilizadas no planejamento fatorial completo 2^2 e os valores das relativas respostas

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	$k_L a_f$ (s ⁻¹) ^b	$k_L a_{ef}$ (s ⁻¹) ^c
6 (C) ^a	950	3,5	200	47,9
2	1200	2,0	167	27,9
7 (C) ^a	950	3,5	193	49,0
3	700	5,0	131	31,0
4	1200	5,0	241	70,3
5 (C) ^a	950	3,5	184	46,9
1	700	2,0	89,9	11,7

^a O erro puro estimado a partir dos ensaios repetidos dos pontos centrais (C) foi de $\pm 1,2$. Todos os valores foram estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança.

^b $k_L a_f$ = coeficiente volumétrico de transferência de massa no meio simples de fermentação.

^c $k_L a_{ef}$ = coeficiente volumétrico de transferência de massa no sistema de fermentação extrativa.

Os dados experimentais da Tabela VI.2 foram utilizados para fazer a análise de regressão. As equações, a seguir, nas quais as variáveis apresentam os seus valores codificados, expressam o melhor modelo para o valor de $k_L a$ de ambos os sistemas:

$$k_L a_f = 168,22 + 35,54 x_1 + 24,20 x_2 \quad (6)$$

$$k_L a_{fe} = 47,92 + 13,87 x_1 + 15,41 x_2 + 5,76 x_1 x_2 \quad (7)$$

O termo que expressa a interação entre as duas variáveis ($x_1 x_2$) no SF não foi significativo, por isso, foi omitido do processo. Com isso, as análises estatísticas revelaram efeitos lineares principais positivos para ambas variáveis independentes (nível de confiança de 95%). O efeito da agitação no $k_L a_f$ foi mais forte do que o da aeração, enquanto que o contrário aconteceu para o $k_L a_{ef}$, provavelmente pelas já conhecidas características de alta viscosidade e coalescência do PEG, as quais poderiam ter dificultado a difusão do oxigênio. Todavia, o coeficiente de correlação entre $k_L a_f$ e $k_L a_{ef}$ foi positivo ($R^2 = 0,92$), isto é, ambas as variáveis independentes exerceram efeitos qualitativos similares na determinação do valor do $k_L a$.

Regressões simultâneas das eqs. (6) e (7) demonstraram os máximos valores previstos dos $k_L a_f$ (228 s⁻¹) e $k_L a_{ef}$ (83 s⁻¹) que apenas foram 8 e 18% maiores que os respectivos valores experimentais (veja acima); isso mostra a validação do modelo estatístico utilizado. As equações de primeira ordem foram confirmadas estatisticamente como significativas, através dos testes de Fisher da análise de variância e de regressão múltipla. Os valores de F

calculados (61 para k_{La_f} e 559 para $k_{La_{ef}}$) foram de fato maiores que os tabulados [$F_{(2,3)} = 6,4$ e $F_{(3,3)} = 2,3$, respectivamente], enquanto que não teve falta de ajuste para ambos k_{La_f} [$F = 61 > F_{(2,3)}$] e $k_{La_{ef}}$ [$F = 559 > F_{(3,3)}$]; e o erro puro foi de apenas 1,2. Em adição a essas análises, os valores dos coeficientes de determinação ($R^2 = 0,76$ e $0,87$, respectivamente) indicaram que o modelo explica 76 e 87% dos dados e que ambas as regressões são estatisticamente significativas ($p < 0,00010$) no nível de confiança de 95%.

VI.4.3 Correlações entre o k_{La} e as variáveis operacionais

Os valores dos expoentes α e β da eq. (5), estimados para correlação entre o k_{La} com o número de potência (*power number*) ($N^3 D^2$) e a velocidade superficial do gás (V_s), são significativamente diferentes daqueles relatados por muitos autores, provavelmente devido a diferenças acentuadas na configuração do fermentador, nas propriedades do meio de cultura e nas condições de cultivo estudadas (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2004; GOGATE *et al.*, 2000).

Figura VI.3. Valores observados e previstos do coeficiente volumétrico de transferência de massa em função das variáveis velocidade de agitação ($N^3 D^2$) e aeração (V_s) de acordo com o planejamento fatorial completo 2^2 da Tabela VI.1. Água destilada (○); meio simples de fermentação (□); meio de fermentação extrativa (▲)

Conforme esperado, os valores de α (0,39) e β (0,47) (Tabela VI.3) observados no meio contendo apenas água destilada, os quais representam as inclinações das retas correlacionando $\ln k_{La}$ com $\ln N^3 D^2$ e $\ln V_s$, respectivamente, estão dentro da ampla faixa de valores relatados na literatura ($0,1 \leq \alpha \leq 0,7$ e $0,3 \leq \beta \leq 0,8$) para a água em diferentes condições operacionais (CHANDRASEKHARAN; CALDERBANK, 1981; GAGNON *et al.*, 1998; GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 1998; GOGATE *et al.*, 2000; KWON *et al.*, 1996; OZBEK; GAYIK, 2001; PUTHLI *et al.*, 2005; RICHARDS, 1961; VASCONCELOS *et al.*, 2000; WU, 1995; YOSHIDA *et al.*, 1960). Segundo Ozbek e Gayik (2001), a relação entre a agitação e o k_{La} pode ser observada em duas regiões. Na primeira região, abaixo de 300 rpm, a inclinação é muito menor, enquanto que na segunda, acima desse limiar, o k_{La} aumenta linearmente com a agitação. Westerterp *et al.* (1963), bem como Perez e Sandall (1974), observaram resultados similares, sugerindo a existência de uma agitação crítica (N_c), acima da qual o k_{La} é uma função linear da agitação; esses mesmos autores verificaram também que este parâmetro variou de 200 a 650 rpm, dependendo da geometria do fermentador. No presente estudo, que foi realizado com a agitação relativamente intensa (> 650 rpm), apenas uma relação linear foi observada. Para o sistema de fermentação simples, o expoente α (0,38) foi quase o mesmo que o obtido em água destilada (0,39), enquanto que o expoente β foi significativamente menor (0,41 em vez de 0,47) (Tabela VI.3).

Este resultado foi provavelmente devido à presença de solutos na fase líquida (meio de cultivo), que são conhecidos por afetar a solubilização do O_2 e, conseqüentemente, a transferência de massa, alterando as propriedades físico-químicas do meio, perturbando o comportamento coalescente das bolhas e o tamanho das bolhas (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). Para o sistema de fermentação extrativa, os expoentes ($\alpha = 0,52$ e $\beta = 1,0$) foram significativamente mais elevados, e sempre todos os valores de k_{La} notavelmente inferiores aos dos outros dois sistemas (Tabela VI.3); esse fenômeno pode ser explicado, novamente, pela alta viscosidade do PEG, que exige altos níveis de aeração e de agitação, especialmente para a aeração.

Tabela VI.3. Correlação dos coeficientes α e β estimados para água destilada, meio simples de fermentação e meio de fermentação extrativa com SDFA pela linearização logarítmica da eq. (5)

Sistemas	A	α	β	R^2	DEP ^a
Água destilada	$3,9 \times 10^{-4}$	0,39	0,47	0,993	$1,5 \times 10^{-4}$
Meio simples de fermentação	$3,7 \times 10^{-4}$	0,38	0,41	0,889	$1,0 \times 10^{-4}$
Meio de fermentação extrativa utilizando SDFA	$2,1 \times 10^{-5}$	0,52	1,0	0,924	$1,3 \times 10^{-4}$

^aDEP: desvio do erro padrão calculado como a diferença entre os valores previstos e observados.

Segundo Kouda *et al.* (1997), o aumento no fluxo de ar como fonte de oxigênio deve apenas reduzir o tempo de retenção de oxigênio, aumentando, assim, a velocidade de entrada do gás em médio prazo. Por outro lado, a agitação é bem conhecida em influenciar tanto a distribuição de bolhas de ar, como também a mistura e a homogeneização dessa distribuição, ou seja, insuficiente agitação resulta em baixa transferência de oxigênio, principalmente em meio altamente viscoso.

VI.5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram comparados os valores de k_{La} em água, no meio de fermentação simples e no meio de fermentação extrativa utilizando SDFA, sem crescimento microbiano e sob diferentes condições de aeração e de agitação. O planejamento fatorial completo foi utilizado para investigar a influência de duas variáveis independentes: agitação e aeração no k_{La} , selecionado como resposta. Esse estudo foi importante porque permitiu melhor compreensão da diferença entre os sistemas simples e outro complexo, no caso, o sistema de fermentação extrativa. Correlações entre o k_{La} , o número de potência e a velocidade superficial combinadas à análise de variância revelaram que as duas variáveis foram estatisticamente significativas. Para o meio utilizado na fermentação extrativa com SDFA, todos os valores do k_{La} foram inferiores aos dos outros dois sistemas, o que pode ser explicado pela alta viscosidade do PEG, exigindo níveis particularmente altos de aeração e de agitação. Apesar da diferença entre os sistemas e da ampla gama de condições operacionais, os valores previstos e observados de k_{La} estavam de acordo para os três sistemas escolhidos, confirmando assim a validade da proposta estudada.

Capítulo VII

FERMENTAÇÃO EXTRATIVA DE ÁCIDO CLAVULÂNICO DE *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060 UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

O artigo será submetido para a publicação no periódico *Biotechnology and Bioengineering*, com fator de impacto 2,93.

VII.1 RESUMO

A integração entre os processos fermentativos e de extração líquido-líquido é uma proposta alternativa para obtenção de altos rendimentos do produto, além de apresentar boa relação custo-benefício. O ácido clavulânico (AC) é um inibidor de β -lactamases muito utilizado na área médica. Conhecimento e melhoramento da obtenção e da produção do AC são pontos importantes para boa recuperação do produto. A influência de quatro variáveis no processo de fermentação extrativa do AC: massa molar do PEG (400, 1.000 e 8.000 g/mol); concentrações de PEG (15, 20 e 25%) e de fosfato (15, 20 e 25%) e velocidade de agitação (110, 150 e 200 rpm), foi avaliada com auxílio de um planejamento estatístico fracionário 2^{4-1} , com a finalidade de estudar a extração do ácido clavulânico em frascos agitados, no sistema de fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas PEG/sais fosfato. Após a seleção das variáveis mais significativas, foi realizado um estudo de otimização dessas variáveis utilizando um planejamento central composto 2^2 . Por fim, as condições otimizadas foram testadas em biorreator para avaliar a reprodutibilidade do processo integrado em escala maior (1.000g). A velocidade de agitação do sistema e a massa molar do PEG mostraram maior efeito significativo nas variáveis-resposta. O ensaio 6 (8.000 g/mol de massa molar do PEG; 25% de concentração tanto para PEG quanto para os sais fosfato e 240 rpm de velocidade de agitação) proporcionou os melhores resultados para o coeficiente de partição ($k = 8,2$) e para o rendimento na fase superior, rica em PEG ($\eta_s = 93\%$), no processo de extração de ácido clavulânico. O comportamento da extração foi reproduzido em biorreator com a máxima concentração de AC (691 mg/L) obtida na fase rica em PEG e 30% superior em comparação aos experimentos realizados em frascos agitados. Como consequência, todos os

resultados das variáveis-resposta selecionadas ($k = 12,8$ e $\eta_s = 95\%$) foram melhores, provavelmente em função da melhor agitação e da melhor transferência de oxigênio no biorreator. A escolha de um novo processo que integra produção e extração é uma tecnologia alternativa na remoção de produtos formados durante a fermentação e, dessa forma, o rendimento e a produtividade dos processos podem aumentar em pouco tempo e com baixo custo.

Palavras-chave: fermentação extrativa, sistema de duas fases aquosas, ácido clavulânico, sistema integrado, extração, *Streptomyces*.

VII. 2 INTRODUÇÃO

O ácido clavulânico (AC) é um importante β -lactâmico com dois anéis (β -lactâmico e oxazolidina condensados), que tem uma potente atividade inibitória contra as enzimas β -lactamases produzidas por uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas resistentes (SANTOS *et al.*, 2009). É produzido por cultivo de *Streptomyces* e retirado do meio de fermentação em várias etapas, como filtração e centrifugação, para separação de células, seguido de extração e/ou técnicas de adsorção para a purificação subsequente (HIRATA *et al.*, 2009).

O sistema de duas fases aquosas (SDFA) se forma quando dois polímeros ou um polímero e um sal são preparados em uma solução aquosa acima de sua solubilidade crítica. A mistura será então separada em duas fases imiscíveis, sendo, em geral, a fase superior rica em um polímero e a fase inferior em um segundo polímero ou solução de sais e, ainda, uma interface, linha fina que se forma entre eles (ALBERTSSON, 1986).

Devido ao baixo custo e à ampla diferença de hidrofobicidade entre as duas se utiliza, principalmente, sistemas de polietileno glicol (PEG)/sal para a biosseparação de moléculas, tais como enzimas (PORTO *et al.* 2008), proteínas (JOHANSSON *et al.* 2008), antibióticos (MOKHTARANI *et al.*, 2008), vírus (BENAVIDES *et al.*, 2006), corpos de inclusão (WALKER *et al.*, 1999) e DNA plasmidial (TRINDADE *et al.*, 2005).

Algumas vantagens da aplicação do SDFA integrado com meio de cultivo são: aumento de rendimento de extração; viabilidade para operação contínua do processo; redução do número de etapas de purificação e diminuição dos custos do processo (ESMANHOTO; KILIKIAN, 2004). No estudo de extração de antibióticos, Yang *et al.* (1994) e Lee (1990) relataram a extração bem sucedida de cefalosporina C e vancomicina em SDFA utilizando

PEG/sais fosfato. Entretanto, há poucas informações na literatura sobre o processo de extração de antibióticos, como, também, de AC utilizando SDFA.

Por esse motivo, um processo alternativo está proposto neste trabalho, que integra a fermentação com extração, e tem o objetivo de melhorar a extração do produto e diminuir os custos do processo (ALBERTSSON, 1986). A fermentação extrativa ou a recuperação de produtos *in situ* é uma metodologia ideal para reduzir a inibição do produto e a baixa produtividade volumétrica, que são tipicamente observadas em processos biotecnológicos. O conceito, como o nome sugere, envolve a integração da etapa de produção com a de purificação, a fim de se remover o produto simultaneamente após sua síntese. Na fermentação extrativa utilizando SDFA, as células são, geralmente, imobilizadas em uma das fases e o produto desejado particiona para a outra fase, facilitando, assim, a manipulação adequada do sistema e a diminuição de contaminantes (BANIK *et al.*, 2003).

Os objetivos deste trabalho foram produzir e extrair AC por fermentação extrativa utilizando SDFA PEG/sais fosfato. Um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} foi primeiramente utilizado para avaliar os principais efeitos das variáveis de extração (massa molar do PEG, intensidade de agitação, concentrações de PEG e sais de fosfato) nas variáveis-resposta selecionadas: produtividade, coeficiente de partição e rendimento da extração do AC. Uma vez identificadas as variáveis que mais influenciaram no processo, um estudo de otimização também foi realizado, de acordo com um planejamento central composto utilizando Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).

VII.3 MATERIAL E MÉTODOS

VII.3.1 Reagentes

O polietilenoglicol com diferentes massas molares (400, 1.000, 2.000, 4.000, 8.000, 10.000 e 12.000 g/mol) foi adquirido da Sigma (St. Louis, MO). Todos os outros produtos químicos utilizados para preparar os meios de cultura, especificamente sais, glicerol, peptona bacteriológica, extrato de malte, extrato de levedura e farinha de soja (FS), foram de grau analítico e obtidos da Fluka (Buchs, Suíça) e da Merck (Darmstadt, Alemanha).

VII.3.2 Microrganismo

O microrganismo *Streptomyces* DAUFPE 3060 foi gentilmente cedido da Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, PE, Brasil). Esse microrganismo foi isolado diretamente de amostras de solo. Para cada amostra recolhida, 3 g de solo foram diluídos em 100 mL de solução salina estéril (0,85% NaCl) e essa solução permaneceu em repouso durante 15 min. Após o repouso, três diferentes diluições (1:10, 1:100 e 1:1.000) foram preparadas utilizando solução salina estéril, num volume total de 10 mL. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em glicose-asparagina-ágar (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) em pH 6,5 como meio seletivo. As placas foram incubadas a 28 °C e verificadas após 48, 72 e 96 h. Colônias íntegras foram selecionadas e repicadas em novas placas deste mesmo meio de cultivo para a purificação das colônias. As espécies de *Streptomyces* isoladas foram mantidas em placas com extrato de malte e levedura a 4 °C até posterior utilização. A caracterização preliminar foi realizada por macroscopia e microscopia das culturas, a fim de avaliar a morfologia das cadeias de esporos, a cor da colônia e a liberação de pigmentos no meio de cultivo (LAWRENCE, 1956). O microrganismo, que está ainda na fase de caracterização molecular, foi armazenado em criotubos (10% v/v de glicerol) a -70 °C.

VII.3.3 Meios de cultura

O meio de reativação teve a seguinte composição (em g/L de água destilada): glicerol, 15; peptona bacteriológica, 10; extrato de malte, 10; extrato de levedura, 1,0; K₂HPO₄, 2,5; MgSO₄ . 7H₂O, 0,75; MnCl₂ . 4H₂O, 0,001; FeSO₄ . 7H₂O, 0,001 e ZnSO₄ . 7H₂O, 0,001. O pH do meio foi ajustado para 6,8 com NaOH 5,0 M antes de autoclavar a 121 °C por 15 min. O meio de inóculo utilizado nos cultivos, com base no que foi proposto por Maranesi *et al.* (2005), tinha a seguinte composição (em g/L de água destilada): glicerol, 10; farinha de soja (FS), 20; K₂HPO₄, 1,2; MnCl₂ . 4H₂O, 0,001; FeSO₄ . 7H₂O, 0,001 e ZnSO₄ . 7H₂O, 0,001, pH 6,8.

VII.3.4 Meio para fermentação extrativa utilizando SDFA

O meio de cultivo para a fermentação extrativa utilizando SDFA foi preparado misturando-se as soluções de PEG e sais fosfato de acordo com os planejamentos experimentais descritos posteriormente e ainda o meio de cultura contendo 40 g/L de FS e 10

g/L de glicerol. Depois de ajustar o pH para 6,5, o sistema foi autoclavado a 121 °C por 20 min.

VII.3.5 Condições de cultivo

A reativação foi preparada pela adição da suspensão de esporos (6,6 g/L de peso seco) contidos no criotubo (3,0 mL) em 25 mL de meio de reativação em Erlenmeyers de 250 mL e incubados a 200 rpm e 28 °C, por 24h. Após essa etapa, 5,0 mL dessa cultura de reativação foram inoculados em 45 mL de meio de inóculo e incubados por 24h nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, alíquotas de 5,0 mL dessa cultura foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 g de meio de fermentação extrativa utilizando SDFA. A fermentação extrativa durou 168h e foi realizada a 32°C em condições diferentes, de acordo com o planejamento experimental descrito posteriormente. Um Erlenmeyer foi retirado a cada 24h e utilizado para determinar as concentrações de células, glicerol e AC.

A reprodutibilidade da condição ótima de cultivo obtida em frascos agitados foi checada por uma fermentação extrativa adicional em triplicada utilizando um biorreator de 3,0L, modelo Z61103CT04 (Applikon, Schiedam, Holanda), contendo 1.000g de meio de fermentação extrativa utilizando SDFA. Um dispositivo eletrônico, acoplado ao biorreator, modelo ADI1030 (Applikon), permitiu controle maior das melhores condições determinadas em frascos agitados. A aeração foi fixada em 0,5 vvm (ORTIZ *et al.*, 2007). A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada por um eletrodo galvânico esterilizado, InPro6000 Series (Mettler-Toledo, Novate Milanese, Itália).

VII.3.6 Métodos analíticos

O caldo proveniente da fermentação extrativa foi centrifugado a 5.500 xg por 20 min a 4 °C. Após a centrifugação, o sistema de duas fases foi melhor visualizado e as fases superior e inferior foram cuidadosamente retiradas com seringa de insulina (1 mL) sem perturbar a interface. A massa celular foi retirada e lavada duas vezes com água destilada e seca a 80 °C para determinação da biomassa. A dosagem espectrofotométrica de AC foi realizada para as duas fases do sistema livre de células, a fase superior (PEG + meio de cultivo) e a fase inferior (sais fosfato + meio de cultivo). Utilizou-se a reação com o imidazol descrita em detalhe por Bird *et al.* (1982) e utilizada pela maioria dos pesquisadores que trabalham nesta área (BERSANETTI *et al.*, 2005; MARANESI *et al.*, 2005; ORTIZ *et al.*, 2007). Segundo

este método, a concentração de AC no caldo fermentado é determinada pela medição do aumento da densidade óptica a 311 nm ocorrido com a liberação do produto [1 - (8-hidroxi-6-oxo-4-azooct-2-enol) imidazol-] da reação entre AC e imidazol. A concentração de glicerol também foi determinada em ambas as fases de acordo com Hae Bok e Demain (1977). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

VII.3.7 Planejamentos experimentais

VII.3.7.1 Planejamento fatorial fracionário (PFF)

Um estudo preliminar sobre a influência das variáveis de extração no processo de fermentação extrativa do AC foi realizado de acordo com o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (PFF) destacado na Tabela VII.1. As variáveis independentes, massa molar do PEG, concentrações de PEG e de sais fosfato e velocidade de agitação, foram selecionadas para o estudo, enquanto que as respostas foram coeficiente de partição (k) e rendimento das fases superior e inferior de extração (η).

As concentrações de AC, utilizadas para os cálculos das variáveis-resposta, foram avaliadas no tempo fixo de 96h de cultivo, em função da maior concentração de AC obtida nesse tempo para a maioria dos ensaios. O planejamento experimental foi composto de 12 ensaios e 4 repetições no ponto central, necessárias para calcular o erro puro. Para identificar a melhor condição de extração do AC, utilizou-se o modelo linear expresso pela equação:

$$\hat{y}_i = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

em que x é o valor codificado da variável independente " i " ou " j ", $\hat{y}$ é o valor previsto da resposta, b_0 e b_i são a intercepta e o coeficiente linear, respectivamente, e b_{ij} a interação entre as variáveis.

Tabela VII.1. Níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

Níveis	Inferior	Central	Superior
Valores codificados	(-1)	(0)	(+1)
x₁ - massa molar do PEG (g/mol)	8.000	1.000	400
x₂ - concentração do PEG (%)	25	20	15
x₃ - concentração dos sais fosfato (%)	25	20	15
x₄ - velocidade de agitação (rpm)	200	150	110

VII.3.7.2 Planejamento central composto (PCC)

Para analisar a influência das variáveis independentes selecionadas, especificamente massa molar do PEG e velocidade de agitação, denominadas nesse planejamento de x_1 e x_2 , respectivamente, sobre as respostas (concentrações de AC e biomassa), foi utilizado um planejamento estatístico central composto 2^2 . Esse planejamento possui três níveis codificados e 14 ensaios, com uma matriz fatorial ou fatorial fracionária inserida, pontos centrais e pontos de estrela para permitir a estimativa da curvatura (CHEN *et al.*, 2002). Uma unidade foi designada como a distância do centro do espaço do planejamento para os pontos equidistantes, enquanto a unidade α foi designada como a distância do centro do espaço a um ponto de estrela. Os pontos de estrela representam novos valores extremos (mais alto e mais baixo) para cada variável neste planejamento. Como o planejamento é um fatorial completo, então $\alpha = [2k]^{1/4}$ e, neste estudo, $k = 2$ variáveis (massa molar do PEG e velocidade de agitação), para $\alpha = 1,414$. As outras condições foram as mesmas do PFF. Seis ensaios no ponto central foram realizados para estimar o erro puro. As mesmas considerações para os cálculos das variáveis-resposta do PFF foram utilizadas para o PCC.

O modelo quadrático para prever o ponto ótimo utilizando Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi expresso pela equação:

$$\hat{y} = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (3)$$

em que x_i são os valores codificados das variáveis independentes “ i ” ou “ j ”, $\hat{y}$ são os valores previstos da resposta, b_0 , b_i e b_{ii} são os coeficientes da intercepta, linear e quadrático, respectivamente, e b_{ij} os de interação.

Tabela VII.2. Níveis das variáveis utilizadas no planejamento central composto 2^2

Níveis	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)	Axial (- α)	Axial (+ α)
Valores codificados					
x_1 – velocidade de agitação (rpm)	180	200	220	150	240
x_2 – massa molar do PEG (g/mol)	4.000	8.000	10.000	2.000	12.000

VII.3.8 Análise estatística

A versão *Statistic 6,0* (Statsoft, Tulsa, OK) foi utilizada para a análise de regressão e a confecção dos gráficos. A validação do modelo foi obtida através do coeficiente de determinação (R^2) e da análise de variância (ANOVA), bem como pela comparação entre os valores observados e previstos.

VII.3.9 Metodologia para análise dos resultados

A distribuição de AC entre as fases foi expressa em termos de coeficiente de partição (k), que foi calculado como:

$$k = \frac{C_s}{C_I} \quad (5)$$

em que C_s e C_I são as concentrações em mg/L de AC nas fases superior e inferior, respectivamente.

Para avaliar a viabilidade da extração, o rendimento (ou recuperação) do AC nas fases superior e inferior do sistema de fermentação extrativa (η) foi calculado como:

$$\eta = \frac{V_f * C_f}{V_0 * C_{R0}} * 100 \quad (6)$$

em que V_0 (mL) e C_{R0} (mg/L) são o volume inicial do inóculo e a concentração inicial de AC, respectivamente, enquanto V_f (mL) e C_f (mg/L) são o volume da fase superior ou inferior e as concentrações de AC extraídas em cada fase para cada ensaio dos experimentos realizados.

O cálculo do balanço de massa do sistema foi realizado para saber se houve perda de ácido clavulânico durante a fermentação extrativa e define-se como:

$$BM = \frac{C_S * V_S + C_I * V_I}{V_0 * C_{R0}} * 100 \quad (7)$$

em que C_S , C_I e C_{R0} são as concentrações em mg/L de AC nas fases superior e inferior do sistema e na inicial, respectivamente, e V_S , V_I e V_0 em mL, os volumes das fases superior e inferior e da inicial do inóculo, respectivamente.

VII.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

VII 4.1 Partição das células no processo de fermentação extrativa utilizando SDFA

Em todos os ensaios realizados no presente trabalho, as células particionaram para a interface (Figura VII.1). De acordo com estudos similares utilizando um SDFA PEG/sais fosfato para extração de biomoléculas a partir do meio de cultivo, como, por exemplo, a produção de subtilina por *Bacillus subtilis* ATCC 6633, as células foram particionadas para a fase inferior (rica em sais fosfato) e o produto para a superior, rica em PEG (KUBOI *et al.*, 1994). O mesmo comportamento foi observado por Liao *et al.* (1999), na bioconversão extrativa de penicilina G produzida por *E. coli* recombinante utilizando SDFA constituído de PEG/sais fosfato.

Figura VII.1. Foto da fermentação extrativa utilizando SDFA PEG/sais fosfato para a extração de AC produzido por *Streptomyces* DAUFPE 3060

VII 4.2 Partição do ácido clavulânico no processo de fermentação extrativa utilizando SDFA em frascos agitados e biorreator

Após 96h de produção de AC pelo *Streptomyces* DAUFPE 3060 no meio de fermentação extrativa utilizando SDFA PEG/sais fosfato, a amostra retirada foi centrifugada e as fases superior e inferior foram utilizadas para dosagem da concentração de ácido clavulânico e a interface para a determinação da biomassa. O AC foi extraído em maior proporção na fase superior, rica em PEG, para todos os ensaios dos dois planejamentos estatísticos (FF e CC). Nos planejamentos FF e CC, a maior concentração de AC foi obtida nos ensaios 8 (426 mg/L) e 6 (509 mg/L), respectivamente, com concentração de 25% (p/p) de PEG 8.000 g/mol para ambos. Verificou-se que o AC foi obtido em maior proporção na fase rica em PEG, tanto em frascos agitados (40g), como no aumento de escala para biorreator (1.000g). Esses resultados estão de acordo com Videira e Aires-Barros (1994) que utilizaram um sistema de duas fases aquosas, constituído por PEG e sais fosfato, para a extração *in situ* de ácido clavulânico a partir do caldo fermentativo, e observaram que com o aumento na concentração de fosfato na fase inferior, a fase superior permanece relativamente constante. Isto provavelmente acontece porque em soluções com alta força iônica, a solubilidade da molécula a ser extraída, em geral, decresce. Este fenômeno é resultado da competição entre os íons salinos adicionados ao sistema e, assim, o soluto (biomolécula) diminui a capacidade de solvatação com o solvente aquoso. Esse fenômeno é conhecido como *salting out*. Nesse caso, o clavulanato de potássio foi repellido da fase rica em fosfato para a fase rica em PEG, na qual encontra maior solubilidade.

Recentemente, os resultados obtidos por Mokhtarani *et al.* (2008) em sistema de PEG/sulfato de sódio mostraram que a ciprofloxacina particionou para a fase rica em PEG

(fase superior). Em função dos efeitos eletrostáticos, a tendência da ciprofloxacina em permanecer na fase superior do sistema foi maior. Segundo Sinha *et al.* (2000), durante o processo de fermentação extrativa, é desejável que a biomolécula particione em direção a uma fase enquanto que as células e os outros contaminantes particionem para a outra fase. Desta forma é possível diminuir o efeito inibitório causado pelo produto.

VII 4.3 Influência das variáveis independentes sobre a extração de AC por fermentação extrativa utilizando S DFA

A Tabela VII.3 mostra os resultados dos ensaios de fermentação extrativa realizados para os níveis codificados das quatro variáveis independentes de acordo com o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (FFD).

Tabela VII.3. Influência das variáveis independentes nas respostas k , η e BM de acordo com o planejamento fatorial 2^{4-1}

Ensaios	Massa molar do PEG (g/mol)	Concentração do PEG (%)	Concentração de sais fosfato (%)	Velocidade de agitação (rpm)	k	η_s (%)	η_l (%)	BM (%)
11 (C)	1.000	20	20	150	6,7	71	21	92
10 (C)	1.000	20	20	150	6,5	75	19	94
8	8.000	25	25	200	13,5	90	9	99
5	400	15	25	200	2,1	62	24	86
12 (C)	1.000	20	20	150	6,2	79	15	94
7	400	25	25	110	4,9	89	14	103
3	400	25	15	200	5,0	81	18	99
2	8.000	15	15	200	19,4	92	10	102
9 (C)	1.000	20	20	150	6,8	72	20	92
4	8.000	25	15	110	7,2	83	16	99
6	8.000	15	25	110	3,6	65	30	95
1	400	15	15	110	1,2	60	28	88

Todos os valores foram estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança.

k = coeficiente de partição; η_s = rendimento da fase superior; η_l = rendimento da fase inferior; BM = balanço de massa

A análise de regressão dos dados apresentados na Tabela VII.3 mostrou que todas as variáveis foram estatisticamente significativas no nível de confiança de 95% para o coeficiente de partição (k), cujos respectivos coeficientes de regressão foram calculados pela seguinte equação de primeira ordem:

$$y_k = 6,92 + 3,81 x_1 + 0,54 x_2 - 1,09 x_3 + 2,88 x_4 - 1,11 x_1 x_2 - 1,29 x_1 x_3 + 2,63 x_1 x_4 \quad (8)$$

Observou-se, na eq. (8), que a massa molar do PEG (x_1) e a velocidade de agitação (x_4) foram as variáveis mais significativas, com os valores de seus coeficientes lineares, bem como aqueles de interação (x_1x_4), bastante superiores aos outros. Além disso, os sinais algébricos de todos os coeficientes das variáveis mais significativas foram positivos, indicando que o aumento em cada uma resultou em aumento correspondente no k .

Similarmente aos resultados acima, Li *et al.* (2000) estudaram a fermentação extrativa em SDFA constituído por 4% (p/v) de PEG /8% (p/v) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de nisina produzida por *Lactococcus lactis* e observaram que a produtividade da nisina foi maior quando se utilizou PEG 8.000 a 20.000 g/mol e a segunda massa molar foi a mais adequada para essa extração.

Como mencionado no item VII 4.2, o ácido clavulânico foi extraído para a fase rica em PEG em todos os ensaios com coeficientes de partição que variaram de 1,2 a 19,4. Videira e Aires-Barros (1994) também observaram, em sistema PEG/sais fosfato para extração *in situ* de ácido clavulânico comercial (clavulanato de potássio), valores para o coeficiente de partição superiores a 1, entre 1,5 e 114, o que confirma mais uma vez a afinidade da molécula do AC pela fase PEG.

Por outro lado, Silva *et al.* (2009), que estudaram a extração de AC a partir de meio fermentado, composto de solução de sais, aminoácidos, glicerol e hidrolisado de soja, utilizando sistemas PEG/sais de fosfato através de um planejamento fatorial 2^5 , observaram, em alguns ensaios, que houve decréscimo do k com o aumento da massa molar do PEG de 600 para 4.000 g/mol. Segundo esses autores, quanto maior a massa molar do PEG, melhor a distribuição do AC no sistema rico em sal. Este fato está relacionado à interação entre os componentes do sistema; assim, quanto menor a massa molar do PEG, mais alta a interação entre o AC e as moléculas que compõem o sistema. PEG com maior massa molar apresentou maior hidrofobia na fase superior. Portanto, outros compostos mais hidrofóbicos que faziam parte do sistema, como aminoácidos aromáticos, tiveram mais afinidade para a fase superior, constituída principalmente por PEG. No caso do presente trabalho, os maiores coeficientes de partição do AC (19,4 e 13,5) foram observados nos ensaios 2 e 8, os quais eram constituídos da maior massa molar de PEG (8.000 g/mol), e das concentrações de 15 e 25% para o sal e PEG, respectivamente; com isso, poderia ter ocorrido o aumento da hidrofobicidade, bem como o efeito do volume de exclusão; entretanto, como o AC é uma molécula pequena, não

foi influenciado por esses fatores (VIDEIRA; AIRES-BARROS, 1994). Outra explicação seria que, diferentemente do estudo de Silva *et al.* (2009), no nosso meio de cultura não foram adicionado mais sais e nem aminoácidos, diminuindo, assim, a contaminação da fase PEG e extraíndo melhor o AC.

Segundo as equações de primeira ordem (9) e (10) relativas aos valores de rendimento de extração do AC nas fases superior e inferior descritos na Tabela VII.3,

$$y \eta_s = 76,58 + 4,75 x_1 + 8,00 x_2 - 1,25 x_3 + 3,50 x_4 - 4,00 x_1 x_2 - 3,75 x_1 x_3 + 5,00 x_1 x_4 \quad (9)$$

$$y \eta_s = 18,67 - 2,37 x_1 - 4,37 x_2 + 0,63 x_3 - 3,38 x_4 + 0,63 x_1 x_2 + 2,63 x_1 x_3 - 3,38 x_1 x_4 \quad (10)$$

apenas os efeitos principais de x_1 e x_2 e a interação $x_1 x_4$ foram estatisticamente significativas no nível de 95% de confiança para o η_s . Isto significa que o aumento, tanto da massa molar como da concentração do PEG, favorece o incremento no rendimento de AC na fase superior do sistema. O efeito significativo da interação entre a massa molar do PEG (x_1) e a velocidade de agitação (x_4) mostra que a variável x_4 auxilia na distribuição de oxigênio na fase superior do sistema, promovendo melhor produção e extração do AC na fase rica em PEG.

Para η_l , as variáveis x_2 e x_4 e a interação $x_1 x_4$ foram mais significativas a 95% de confiança. Entretanto, os sinais algébricos dessas variáveis foram negativos. Isso significa que com a diminuição da concentração de PEG e da velocidade de agitação pode ocorrer melhor extração do AC para a fase sal. Porém, a interação entre a massa molar do PEG e a velocidade de agitação também influenciou negativamente no rendimento da fase inferior, exatamente o contrário do observado para η_s .

Conforme observado por Videira e Aires-Barros (1994) para a extração *in situ* de ácido clavulânico a partir do caldo fermentativo utilizando SDFA PEG/sais fosfato, o aumento simultâneo das concentrações de PEG e sal do sistema pode favorecer a partição da molécula para a fase PEG ou vice-versa. Esses autores obtiveram rendimentos entre 60 e 99%. No presente trabalho, o rendimento mais elevado (92%), obtido no sistema de fermentação extrativa constituído de meio de cultivo mais 15% PEG 8.000 e 15% de fosfato, foi pouco inferior ao intervalo (92-96%) relatado por Silva *et al.* (2009) para o mesmo sistema utilizando massa molar do PEG na faixa de 1.000 a 4.000 g/mol, e dentro da faixa observada por Videira e Aires-Barros (1994).

O coeficiente de determinação da análise de regressão das eqs. (8-10) foi muito bom para as três variáveis-resposta ($R^2 = 0,99$ para k , 0,94 para η_s e 0,95 para η_l), levando-se em consideração que $R^2 > 0,90$ é geralmente considerado satisfatório para bioprocessos

(HAALAND, 1989). Como esperado, os valores de R^2 ajustado (R_{adj}^2), que corrige seu valor com base no tamanho da amostragem e do número de termos no modelo, foram menores que R^2 , sendo 0,99 para k , 0,84 para η_s e 0,88 para η_l .

Os melhores resultados em termos de combinação das duas respostas foram observados no ensaio 2 ($k = 19,4$ e $\eta_s=92\%$), no qual a concentração de AC e o consumo de glicerol após a extração na fase rica em PEG ($k > 1$) foram, após 96h de cultivo, 307 mg/L e 82%, respectivamente. Entretanto, a maior concentração de ácido clavulânico (426 mg/L) foi obtida no ensaio 8 após 78% de consumo de glicerol e 4,4 mg/L.h de produtividade (P) em 96h de cultivo.

Com o cálculo do balanço de massa observou-se que, em geral, não houve perda significativa de AC no sistema, uma vez que se considerou o erro experimental entre 5 e 10% para mais e para menos.

Levando-se em conta todas estas considerações, decidimos investigar uma região experimental ótima a partir dos resultados observados no FFD. Sendo assim, as concentrações de PEG e sais fosfato foram fixadas (25%, cada) e as outras duas variáveis independentes (massa molar do PEG e velocidade de agitação) foram variadas de acordo com o planejamento experimental descrito na seção seguinte.

VII 4.4 Otimização do sistema de fermentação extrativa do AC utilizando SDFA pela MSR

A influência da velocidade de agitação (x_1) e da massa molar do PEG (x_2) na fermentação extrativa com SDFA de AC foi estudada por um planejamento central composto 2^2 (CCD) descrito na Tabela VII.2, constituído por 14 ensaios, cujas condições e resultados são resumidos na Tabela VII.4.

Tabela VII.4. Resultados do planejamento estatístico central composto 2²

Ensaio	Velocidade de agitação (rpm)	Massa molar do PEG (g /mol)	Coefficiente de partição (<i>k</i>)	η_s (%)	η_I (%)	<i>BM</i> (%)
5	150	8.000	5,5	68	9	77
8	200	12.000	7,5	68	8	76
13 (C)	200	8.000	12,5	55	40	95
10 (C)	200	8.000	12,8	57	38	95
2	180	10.000	6,1	82	11	93
12 (C)	200	8.000	13,2	58	34	92
3	220	4.000	6,6	92	11	103
6	240	8.000	8,2	93	9	102
14 (C)	200	8.000	13,4	62	35	97
4	220	10.000	7,8	74	9	83
11 (C)	200	8.000	13,1	60	36	96
9 (C)	200	8.000	13	61	35	96
7	200	2.000	6,4	65	31	200
1	180	4.000	5,8	62	15	180

Todos os valores foram estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança.

k = coeficiente de partição; η_s = rendimento da fase superior; η_I = rendimento da fase inferior; *BM* = balanço de massa

A influência das variáveis independentes, expressas em seus níveis codificados (x_I e x_2), sobre as respostas (y_k , y_{η_s} e y_{η_I}) foi descrita pelas equações (11), (12) e (13):

$$y_k = 13,00 + 0,79x_I - 3,16x_I^2 + 0,38x_2 - 3,11x_2^2 + 0,23x_Ix_2 \quad (11)$$

$$y_{\eta_s} = 58,83 + 7,17x_I + 11,83x_I^2 + 0,78x_2 + 4,83x_2^2 - 9,50x_Ix_2 \quad (12)$$

$$y_{\eta_I} = 36,17 - 0,90x_I - 14,39x_I^2 - 4,88x_2 - 9,02x_2^2 + 0,37x_Ix_2 \quad (13)$$

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi empregada para obter gráficos de otimização, enquanto que os modelos foram feitos através da análise de variância (ANOVA) e do teste estatístico de Fisher (Tabela VII.5). Para todas as respostas, o valor do *F*-calculado foi muito maior que o valor do *F*-tabelado, o que significa que o teste *F* foi significativo para ambas as variáveis independentes e os modelos foram adequados para descrever os resultados através da superfície. O coeficiente de determinação (R^2), cujo valor ideal está próximo de 1, indicando concordância entre os resultados experimentais e os valores teóricos previstos pelo modelo, também foi alto e significativo. Alguns termos lineares, de interação e quadráticos, foram significativos no nível de 95% de confiança. Os efeitos estimados e os valores de *p*

correspondentes indicam que duas variáveis independentes exerceram efeito significativo sobre todas as variáveis-resposta estudadas.

Tabela VII.5. Análise de variância do modelo descrito para cada variável-resposta, coeficiente de partição e rendimento das fases superior e inferior em relação às variáveis independentes massa molar do PEG e velocidade de agitação, de acordo com planejamento estatístico central composto 2^2

Variância	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	<i>F-calc</i>	<i>F-tab</i>	R^2	$R^2_{ajustado}$	valor <i>p</i>
<i>k</i>								
Regressão	5	140,83	28,17	242,59	3,69	0,99	0,99	<0,00001
Resíduo	8	0,93	0,12					
Total	13	141,76	-					
η_s								
Regressão	5	1925,46	385,09	34,32	3,69	0,96	0,93	0,000034
Resíduo	8	89,76	11,22					
Total	13	2015,22	-					
η_l								
Regressão	5	2193,03	438,61	26,02	3,69	0,94	0,91	0,000095
Resíduo	8	134,83	16,85					
Total	13	2327,86	-					

Embora os termos lineares de x_1 e x_2 , para as respostas η_l e η_s , respectivamente, e o termo de interação (x_1x_2), para o k e o η_l , não tenham sido significativos, todos foram mantidos no modelo para minimizar a determinação de erro.

A visualização em forma de sino do contorno das curvas das Figuras VII.2 e VII.3 e a natureza quadrática dos modelos estudados no planejamento central composto para as respostas k e η_l indicaram que as duas variáveis independentes foram significativas e os valores de ambas, estudados no ponto central, permitiram alcançar valores máximos de k e η_l , ou seja, os valores estatisticamente ótimos de k e η_l foram obtidos quando se deslocam dos pontos equidistantes (ao longo do nível codificado maior (+1) e menor (-1) das variáveis) até o ponto central. Esse comportamento pode ser confirmado visualizando-se os valores de ambas as respostas nos ensaios dos pontos centrais na Tabela VII.4. Isso significa que o AC particionou preferencialmente para fase superior, rica em PEG, nas condições de 8.000 g/mol de massa molar do PEG e velocidade de agitação de 200 rpm. E, ao mesmo tempo, o rendimento na fase inferior, rica em sal, foi melhor; entretanto, ainda menor que aquele obtido na fase superior, rica em PEG nos mesmos pontos centrais.

Figura VII.2. Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos das variáveis independentes, massa molar do PEG e velocidade de agitação, no coeficiente de partição

Figura VII.3. Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos das variáveis independentes, massa molar do PEG e velocidade de agitação, no rendimento da fase inferior do sistema

A Figura VII.3 mostra claramente que o efeito da velocidade de agitação em η_s foi mais significativo do que a massa molar do PEG. Essa foi a diferença fundamental para melhor recuperação do AC. Visualiza-se nesta Figura uma função unimodal, ou seja, uma região ótima nas bordas (entre os níveis +1 e +1,414 para a velocidade de agitação). Esse fenômeno pode ser explicado através da eq. (12), em que o termo quadrático x_1 apresenta o maior valor, seguido da interação x_1x_2 , o que sugere também que a massa molar do PEG poderia ter exercido influência considerável sobre o rendimento na extração de AC para a fase superior, rica em PEG. Como resultado do menor efeito significativo da massa molar do PEG na variável-resposta η_s , a faixa ótima para essa variável independente resultou entre 4.000 e 8.000 g/mol.

Figura VII.4. Superfície de resposta indicando os efeitos simultâneos das variáveis independentes massa molar do PEG e velocidade de agitação, no rendimento da fase superior do sistema

Esses resultados estão de acordo com a opinião generalizada de que, em meios altamente viscosos, a agitação influencia muito a produtividade e o rendimento do bioprocessamento, afetando a distribuição de bolha de ar, a homogeneização e a transferência de

oxigênio no meio de cultura (BANDINO *et al.*, 2001; CLARKE *et al.*, 2006; TUBIO *et al.*, 2004; VIANA MARQUES *et al.*, 2009). Conforme demonstrado por Kouda *et al.* (1997), não é apenas a lenta difusão de oxigênio, em um sistema contendo PEG, que afeta o rendimento da produção. Há outros fatores que se devem levar em consideração no bioprocessos. Esmanhoto e Kilikian (2004) estudaram a extração de rentamicina por SDFA PEG/sais fosfato utilizando planejamento estatístico completo 2^4 . Esses autores observaram que a massa molar de PEG foi umas das variáveis que mais influenciaram positivamente na extração da retamicina, ou seja, maior partição da molécula para a fase rica em PEG com o aumento da massa molar do polímero. O maior rendimento e o coeficiente de partição foram observados (90,5% e 8,2, respectivamente) no sistema de 20% de PEG 6.000 e 15% de solução de sais. O efeito da massa molar dos polímeros, por sua vez, depende da massa molar da biomolécula a ser separada. No caso de proteínas, aquelas com massas molares maiores são mais influenciadas pelas mudanças na massa molar dos polímeros que as proteínas com pequena massa molar (ASENJO, 1990). O PEG é capaz de excluir as proteínas sem desnaturação de acordo com o aumento de sua massa molar. O mesmo efeito não pode ser observado quando as moléculas menores de proteínas são utilizadas (SCHMIDT *et al.*, 1994).

Resumindo, após a etapa de otimização, a máxima concentração de AC (508 mg/L) foi observada na fase rica em PEG do ensaio 6, realizado a 240 rpm e com PEG 8.000 g/mol, o que garantiu $k = 8,2$ e $\eta_s = 93\%$. A produtividade alcançou 5,3 mg/L.h após, também, 96h de fermentação extrativa, com aproximadamente 85% de consumo do substrato.

Com o objetivo de estudar a reprodutibilidade do processo otimizado em frascos agitados e fornecer a primeira tentativa de aumento de escala de resultados, uma fermentação extrativa de AC adicional foi realizada sob as condições ideais selecionadas em frascos agitados de acordo com o PCC em biorreator. O comportamento da extração do AC exibido em biorreator foi similar àquele observado em frascos agitados. A máxima concentração de AC (691 mg/L) foi obtida na fase rica em PEG, entretanto em menos tempo, após 72h de cultivo, ou seja, 30% superior em comparação com os experimentos realizados em frascos agitados. O consumo de glicerol após a extração aumentou até 92%. Como consequência, todos os resultados das variáveis-resposta selecionadas ($k = 12,8$, $P = 9,6$ mg / L.h; $\eta_s = 95\%$) foram melhores, provavelmente devido à melhor agitação e, em seguida, à melhor transferência de oxigênio no biorreator. Assim, estes resultados confirmam, mais uma vez, a importância da velocidade de agitação no sistema de fermentação extrativa, especialmente na presença de agentes de alta viscosidade, como PEG (VIANA MARQUES *et al.*, 2009),

influenciando tanto na taxa de transferência de oxigênio, como na concentração do oxigênio dissolvido e, conseqüentemente, na produção e na recuperação do produto.

VII.5 CONCLUSÕES

A fermentação extrativa de ácido clavulânico por sistema de duas fases aquosas PEG/sais fosfato foi otimizada no presente trabalho. Inicialmente, o efeito da massa molar do PEG, as concentrações de PEG e sais fosfato e a velocidade de agitação sobre o processo de produção/extração de AC foi investigado, em frascos agitados, com auxílio de um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} . A massa molar do PEG e a velocidade de agitação foram as variáveis que mais influenciaram nas respostas selecionadas (coeficiente de partição (k) e rendimentos nas fases superior e inferior (η_s e η_l)). Após a seleção das variáveis mais significativas, realizou-se um estudo de otimização das condições de extração determinadas no primeiro planejamento. Os valores ótimos de k e η_l foram obtidos nos pontos centrais para a massa molar do PEG e a velocidade de agitação, entretanto para a variável-resposta η_s , a velocidade de agitação (faixa entre 220 e 240 g/mol) influenciou mais que a massa molar do PEG (faixa entre 4.000 e 10.000 g/mol). O ensaio adicional realizado nas condições ótimas em biorreator levou ao aumento de cerca de 30% na concentração de AC e rendimento de 95%, provavelmente devido à melhor agitação e transferência de oxigênio. Comparado aos métodos convencionais de fermentação seguido de purificação, este processo é caracterizado por diminuir custo, tempo de separação, bem como superar as limitações de inibição do produto e de baixa produtividade volumétrica, que são tipicamente observadas em processos biotecnológicos. Estes resultados são promissores para eventual aplicação na indústria farmacêutica.

Capítulo VIII

EFEITO DA AERAÇÃO E DA AGITAÇÃO NA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PRODUZIDO POR *STREPTOMYCES* DAUFPE 3060

O artigo será submetido para a publicação no periódico Bioresource Technology, com fator de impacto de 4,45.

VIII.1 RESUMO

O processo de purificação do ácido clavulânico consiste em múltiplas etapas, a fim de se aumentar o rendimento da produção e se obter alta pureza. A fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas é um processo alternativo que integra a produção e a extração de biomoléculas em uma única etapa. Esse trabalho teve como objetivo estudar a influência das variáveis aeração (2,0; 3,5; 5,0 vvm) e velocidade de agitação (700, 950 e 1.200 rpm) no sistema de fermentação extrativa utilizando SDFA para a produção e a extração simultâneas de ácido clavulânico por *Streptomyces* DAUFPE 3060 com o auxílio da ferramenta estatística. A taxa de oxigênio dissolvido permaneceu entre 60 e 80% na fase exponencial (até 48h), suprimindo a demanda de oxigênio para as células. A aeração influenciou mais o crescimento celular, a velocidade de consumo de oxigênio pelo microrganismo (OUR) e o rendimento da extração de AC na fase superior, rica em PEG. A taxa de transferência de oxigênio para a fase líquida (OTR) e o coeficiente de transferência de massa (k_{La}) foi constante para todos os ensaios. A maior concentração de AC (438 mg/L) foi observada para os ensaios dos pontos centrais do planejamento após 48h de cultivo e com consumo de glicerol de 75%.

Palavras-chave: fermentação extrativa, sistema de duas fases aquosas, ácido clavulânico, agitação, aeração, transferência de oxigênio.

VIII.2 INTRODUÇÃO

Um passo importante para o sucesso de qualquer processo fermentativo é o desenvolvimento de um método eficiente para o isolamento do produto desejado visando melhor purificação. No processo de fermentação, o ideal seria que o produto desejado fosse separado dos outros compostos presentes no caldo de fermentação, como, por exemplo: compostos metabólicos, precursores, substratos utilizados, restos celulares, etc. Além disso, para purificar produtos como: proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, organelas celulares, antibióticos, antígenos, etc., a atividade biológica deve ser preservada até a última etapa de purificação (BANIK *et al.*, 2003).

Sistemas de duas fases aquosas (SDFA) são formados quando as soluções de dois polímeros diferentes ou um polímero e um sal são misturados e depois separados em duas fases imiscíveis pela diferença de propriedades entre eles. Estes sistemas são geralmente biocompatíveis devido ao elevado teor de água das duas fases e possuem características favoráveis à sua aplicação em larga escala para separação e purificação de biomoléculas e bioconversão extrativa. Fermentação ou bioconversão extrativa com SDFA é a integração dos processos de fermentação e purificação de produtos obtidos de culturas de microrganismo (ALBERTSSON, 1986).

A aplicação do sistema de duas fases aquosas é viável quando a presença de substratos ou outros produtos do metabolismo do microrganismo liberados durante a fermentação limita a extração do produto desejado. Além disso, esse sistema forma um ambiente relativamente suave para as células, em relação ao SDFA água/solvente orgânico. Por esse motivo, eles são mais adequados para a extração de biomoléculas (SINHA *et al.*, 2000). Algumas vantagens deste sistema incluem a facilidade de aumento de escala, alta seletividade e estabilização da estrutura da molécula pelos polímeros que compõem o sistema. A mais importante seria a integração dos processos em uma única etapa, na qual a purificação primária ocorre simultaneamente com a produção, reduzindo significativamente o tempo e os custos. Um dos sistemas mais utilizados inclui o SDFA polímero/sal, que geralmente é selecionado para operações em grande escala devido ao fácil manuseio, ao custo relativamente baixo e ao menor tempo de separação (KAUL *et al.*, 1995; KANNAN, 1997).

O ácido clavulânico (AC) é um antibiótico β -lactâmico com atividade antibacteriana baixa. No entanto, é um potente inibidor da β -lactamases produzidas por muitos microrganismos patogênicos resistentes a antibióticos. A combinação do AC com a amoxicilina é o exemplo mais bem sucedido do uso de um antibiótico (MAYER; DECKER,

1996), sendo vendida comercialmente como clavulanato de potássio e prescrita clinicamente como Augmentin™ (WATVE, 2000).

Geralmente, a produção de AC é realizada através do cultivo de *Streptomyces clavuligerus* em biorreatores aerados e agitados. O aumento da viscosidade aparente no decorrer da fermentação, devido ao crescimento do microrganismo e aos componentes do meio de cultivo, pode ser contrabalanceado pela mudança nas condições, principalmente de agitação e de aeração, com o objetivo de manter a adequada transferência de oxigênio. Entretanto, o aumento na agitação, por exemplo, pode causar cisalhamento (rompimento) da biomassa, com consequente dano físico nas células e redução da produtividade do processo (ROSA *et al.*, 2005).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi estudar a influência das variáveis aeração e velocidade de agitação no sistema de fermentação extrativa utilizando SDFA para a produção por *Streptomyces* DAUFPE 3060 e extração simultâneas de ácido clavulânico através de um planejamento fatorial completo 2².

VIII.3 MATERIAL E MÉTODOS

VIII.3.1 Reagentes

O clavulanato de potássio obtido de *Streptomyces clavuligerus* (utilizado para a curva de calibração), o imidazol (necessário para determinar a concentração de ácido clavulânico e o polietileno glicol ((PEG) 8.000 g/mol) foram fornecidos pela Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). Sais, glicerol, peptona bacteriológica, extrato de malte e extrato de levedura utilizados para preparar os meios de cultivo foram reagentes de qualidade analítica.

VIII.3.2 Microrganismo e meio de fermentação

A linhagem de *Streptomyces* spp. DAUFPE 3060 foi gentilmente cedida da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Recife-PE, Brasil). O método sugerido por Lawrence (1956), que foi anteriormente descrito em detalhes (VIANA *et al.*, 2009), foi utilizado para isolar esta linhagem diretamente de amostras de solo. O *Streptomyces* foi então armazenado em criotubos (10% v/v de glicerol) a -70 °C e utilizado em todo o estudo. O inóculo foi construído em três fases, conforme descrito em trabalho anterior (VIANA *et al.*, 2009).

VIII.3.3 Preparação da fermentação extrativa em SDFA

Uma solução de sais de fosfato (25% p/p) foi preparada pela mistura de quantidades apropriadas de soluções de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e potássio dibásico (K_2HPO_4), à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Esta solução de sais foi então adicionada à solução de 25% (p/p) de PEG 8.000 g/mol e ao meio de cultura contendo 40 g/L de farinha de soja (FS) e 10 g/L de glicerol. O volume final do sistema foi de 1.000g. Depois de ajustar o pH para 6,5, o meio de cultura para a fermentação extrativa utilizando SDFA foi autoclavado a 121 °C por 20 min.

VIII.3.4 Fermentador

Todos os experimentos foram realizados em um fermentador de 3,0 L, Z61103CT04 modelo (Applikon, Roterdão, Holanda) acoplado ao dispositivo eletrônico, modelo ADI1030 (Applikon), o qual permitiu maior controle das condições de cultivo. Os experimentos foram realizados a 28 °C através de um planejamento fatorial completo 2^2 para estudar a influência das variáveis velocidade de agitação e aeração em dois níveis, mais o ponto central descritos na Tabela VIII.1. A concentração de oxigênio dissolvido foi medida por um eletrodo galvânico esterilizado, InPro6000 Series (Mettler-Toledo, Novate Milanese, Itália). Duas amostras de 15 mL foram retiradas diariamente para determinar concentrações de célula, glicerol e AC.

VIII.3.5 Métodos analíticos

O caldo de fermentação do sistema foi centrifugado a 5.500 $\times g$ por 20 min a 4 °C. Após a centrifugação, o sistema de duas fases foi melhor visualizado e as fases superior e inferior foram cuidadosamente retiradas com seringa de insulina (1 mL) sem perturbar a interface. O pellet celular foi retirado e lavado duas vezes com água destilada e seco a peso constante a 105 °C. A dosagem espectrofotométrica de AC foi realizada para as duas fases do sistema, livre de células, a fase superior (PEG + meio de cultivo) e a fase inferior (sal + meio de cultivo), através da reação com o imidazol descrita em detalhe por Bird *et al.* (1982) e utilizada pela maioria dos pesquisadores que trabalham nesta área (BERSANETTI *et al.*, 2005; MARANESI *et al.*, 2005; ORTIZ *et al.*, 2007). Segundo este método, a concentração de AC no caldo fermentado é determinada pela medição do aumento da densidade óptica a 311 nm devido à liberação do produto [1 - (8-hidroxi-6-oxo-4-azooct-2-enol) imidazol-] da reação entre AC e imidazol. A concentração de glicerol foi determinada por HPLC (Hewlett Packard). O sistema é constituído de um HP-1050 Intelligent Auto Sampler, e HP-1047A

Refractive Index detector, e uma bomba HP 1050. A separação foi realizada usando uma coluna Supelcogel H59304-U (Sigma Aldrich Corp., Bellefonte, PA) e eluída com 0,005 M H₂SO₄ em um fluxo de 0,5 mL/min a 50°C. A curva de calibração com 1,0 g/L de glicerol foi utilizada como padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

VIII.3.6 Procedimento experimental

O planejamento fatorial completo 2² foi utilizado para analisar a influência das duas variáveis independentes, ou seja, a velocidade de agitação (x_i) e a aeração (x_j), sobre as respostas: OUR e OTR no tempo de 48h de cultivo. O planejamento experimental foi composto por 7 ensaios e 3 repetições no ponto central, necessárias para calcular o erro puro. Um modelo de regressão linear foi empregado para prever a resposta:

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_j x_j + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

em que b_0 é o coeficiente de intercepção, b_i , o coeficiente linear, b_{ij} , o coeficiente de interação, e x_i e x_j são as variáveis independentes. O ajuste do modelo foi avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2) pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Fischer. Os valores observados e previstos foram comparados a fim de se determinar a validade do modelo desenvolvido pelo programa estatístico *Statistic 6,0*.

VIII.3.7 Efeito da aeração e da agitação na OUR, OTR e k_{La}

A partir do balanço de massa, a equação para determinar a taxa de oxigênio dissolvido durante a fermentação em biorreator agitado e aerado pôde ser estabelecida na equação (2):

$$\frac{dC_o}{dt} = OTR - OUR = k_{La} \cdot (C^* - C) - QO_2 \cdot C_x \quad (2)$$

em que dC_o/dt é a taxa de oxigênio dissolvido (DOT), $k_{La} \cdot (C^* - C)$ e $(QO_2 \cdot C_x)$ correspondem à taxa de transferência de oxigênio para a fase líquida (OTR) e à velocidade de consumo de oxigênio pela população de microrganismos (OUR). Para a determinação da OUR, a entrada de fluxo de ar foi interrompida ($OTR = 0$) e o valor da DOT (taxa de oxigênio dissolvido) diminuiu em função da respiração celular; assim, a OUR é igual a inclinação do gráfico (DOT x tempo), de acordo com a eq. (2):

$$\frac{dCo}{dt} = OUR = -(QO_2 \cdot C_x) \quad (3)$$

Para a determinação da OTR, a entrada de ar foi reiniciada e causou o aumento do percentual da DOT e o valor da OTR foi obtido através de cálculos de acordo com a eq. (3):

$$OTR = \frac{dCo}{dt} + OUR \quad (4)$$

Para a determinação do k_La , a eq. (1) pode ser integrada, levando em consideração o início da aeração ($t = t_1$ e $Co_2 = C_1$) até o fim do cultivo ($t = t_2$ e $Co_2 = C_2$), pela eq. (4):

$$(Qo_2 \cdot C_x)(t_2 - t_1) + (C_2 - C_1) = k_La \cdot \int (C^* - C)dt \quad (5)$$

O valor k_La foi calculado através da resolução da eq. (4) a partir dos valores experimentais do gráfico (DOT x tempo). Foram selecionados os valores de OUR e de OTR obtidos no tempo de maior produção do AC (48h) para o estudo do planejamento experimental descrito na Tabela VIII.1. Os valores de k_La foram calculados para dois tempos de cultivo, 48 e 72h, considerados tempos de aumento e de diminuição da produção do AC.

VIII.3.8 Metodologia para análise dos resultados

A distribuição de AC entre as fases foi expressa em termos de coeficiente de partição (k), que foi calculado como:

$$k = \frac{C_s}{C_l} \quad (6)$$

em que C_s e C_l são as concentrações de AC em mg/L nas fases superior e inferior, respectivamente.

Para avaliar a viabilidade da extração, o rendimento (ou recuperação) do AC nas fases superior e inferior do sistema de fermentação extrativa (η) foi calculado como:

$$\eta = \frac{V_f * C_f}{V_0 * C_{R0}} * 100 \quad (7)$$

em que V_0 (mL) e C_{R0} (mg/L) são o volume inicial do inóculo e a concentração inicial de AC, respectivamente, enquanto V_f (mL) e C_f (mg/L) são o volume da fase superior ou inferior e as concentrações de AC extraídas em cada fase para cada ensaio dos experimentos realizados.

O cálculo do balanço de massa do sistema foi realizado para saber se houve perda de ácido clavulânico durante a fermentação extrativa e define-se como:

$$BM = \frac{C_S * V_S + C_I * V_I}{V_0 * C_{R0}} * 100 \quad (7)$$

em que C_S , C_I e C_{R0} são as concentrações em mg/L de AC nas fases superior e inferior do sistema e na inicial, respectivamente, e V_S , V_I e V_0 em mL, os volumes das fases superior e inferior e da inicial do inóculo, respectivamente.

VIII.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O oxigênio é fundamental no crescimento e no metabolismo dos microrganismos em um sistema aeróbio. Nesse caso específico, o sistema é ainda mais complexo, pois além de produzir a biomolécula, deseja-se extraí-la em uma das fases do SDFA. Para isso, a transferência de oxigênio deve ser eficiente para que as células produzam satisfatória quantidade de AC, a fim de que depois se possa recuperá-la na próxima fase de purificação. Por esse motivo, a influência das variáveis aeração e velocidade de agitação foi avaliada para os parâmetros de produção, como DOT, crescimento celular, OUR, OTR e k_La , bem como para os parâmetros de extração, concentração de AC, rendimento das fases superior e inferior do SDFA e balanço de massa. As fermentações de *Streptomyces* DAUFPE 3060 foram realizadas em biorreator, em diferentes condições de velocidade de agitação (700, 950 e 1.200 rpm) e de aeração (2,0, 3,5 e 5,0 vvm) e todos os parâmetros citados acima foram determinados na fase exponencial de crescimento, já que a maior produção de AC ocorreu em 48h de cultivo.

VIII.4.1 Efeito das velocidade de agitação e aeração na DOT

Os efeitos da velocidade de agitação e da aeração sobre a fermentação de *Streptomyces* DAUFPE 3060 para cada ensaio do planejamento estatístico são ilustrados na Figura VII.1. De acordo com a Figura, os valores de DOT de todos os ensaios diminuíram lentamente com o tempo e somente permaneceram constantes após 96h de cultivo. Isso pode ter ocorrido devido à viscosidade do PEG adicionado como parte do SDFA. Ao mesmo tempo, o oxigênio permaneceu mais tempo no meio, favorecendo o crescimento celular e, consequentemente, a produtividade do processo.

Figura VIII.1. Efeito da velocidade de agitação e de aeração de todos os ensaios do planejamento estatístico na DOT durante a fermentação de *Streptomyces* DAUFPE 3060 para a produção e a extração de AC

Esse comportamento é diferente daqueles encontrados na literatura com sistemas fermentativos convencionais. Em geral, a DOT chega ao valor zero após certo tempo de cultivo. Rosa *et al.* (2005) estudaram a DOT em seis condições de velocidade de agitação diversas para a produção de AC por *S. clavuligerus* em fermentação convencional. Esses autores observaram que, no ensaio com a maior produção de AC (1.000 rpm e 0,5 vvm), a DOT diminuiu até 35% e depois permaneceu constante com 36h de cultivo. No ensaio com a

menor velocidade de agitação, 300 rpm e a 0,5 vvm, a DOT diminui rapidamente, antes das 10h de cultivo, e, com isso, não houve a produção de AC. No presente trabalho, a maior extração de AC por *Streptomyces* DAUFPE 3060 foi observada nos ensaios 5, 6 e 7 (950 rpm e 3,5 vvm) nos quais os valores de DOT ainda eram na faixa de 80% com 48h de cultivo. Esse fenômeno ocorreu pela combinação da aeração e, principalmente, da satisfatória velocidade de agitação, a qual favoreceu a distribuição de bolhas de ar menores e, conseqüentemente, manteve o oxigênio dissolvido em meio de cultivo viscoso.

VIII.4.2 Efeitos da velocidade de agitação e da aeração na biomassa

O crescimento celular foi influenciado principalmente pelo aumento da velocidade de agitação devido ao rompimento da célula após algum tempo de cultivo. Assim, os ensaios com o nível maior de velocidade de agitação (1.200 rpm) não apresentaram um bom crescimento celular (Figura VIII.2). Os ensaios dos pontos centrais (950 rpm e 3,5 vvm) e o ensaio 1 (700 rpm e 2 vvm) apresentaram maior biomassa em 48h de cultivo, entretanto, talvez devido à baixa aeração, nesse último ensaio, não foi observada satisfatória produção de AC.

Figura VIII.2. Efeito da velocidade de agitação e da aeração de todos os ensaios do planejamento estatístico na biomassa durante a fermentação de *Streptomyces* DAUFPE 3060 para a produção e a extração de AC

Sabe-se que com o aumento da velocidade de agitação podem ocorrer o rompimento e o estresse da célula após algum tempo de cultivo. Quando se encontra um valor adequado dessa variável, se observa a diminuição do cisalhamento celular e a melhor homogeneização do meio de cultivo. O contrário acontece quando se diminui muito a velocidade de agitação, pois as células acabam presas na parede do reator, devido à “pobre mistura do meio”

(BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006). No presente trabalho, como o meio de cultivo já era viscoso, devido ao PEG, ainda se observou crescimento celular nos ensaios de alta velocidade de agitação. Entretanto, esse crescimento foi baixo em relação aos outros ensaios do planejamento estatístico, pois esse fenômeno alterou a transferência de oxigênio e a atividade celular no sistema (GIBBS; SEVIOUR, 1996). No caso da variável aeração, a quantidade de oxigênio no cultivo deve ser suficiente para suprir a demanda do microrganismo estudado, mas quando se alimenta o sistema com alto teor de oxigênio, este pode vir a ser tóxico e o microrganismo não cresce. Por esse motivo, a aeração eficiente depende da solubilidade e da difusão do oxigênio dentro do meio de cultivo no biorreator para suprir a demanda desse microrganismo (GALACTION *et al.*, 2004).

Em estudos anteriores (VIANA *et al.*, 2009), o crescimento celular para o sistema de fermentação convencional por *Streptomyces* DAUFPE 3060 para a produção de AC foi muito maior, chegando até a 3,75 g/L em 48h de cultivo. Entretanto, no atual trabalho, utilizando fermentação extrativa com SDFA, o maior valor de biomassa obtido foi de 1,6g/L. Segundo Galaction *et al.* (2004), o aumento demasiado de biomassa no início do cultivo pode influenciar a continuação do crescimento, como também a transferência de oxigênio, pois reduz a solubilidade do oxigênio, principalmente na superfície do reator, e, assim, bloqueia o sistema de aeração e de agitação do reator.

VIII.4.3 Influência das variáveis independentes aeração e velocidade de agitação nos valores de OUR, de OTR e de k_La utilizando planejamento estatístico completo 2^2

A Tabela VIII.1 mostra os resultados do planejamento estatístico completo 2^2 para as respostas OUR e OTR. Todas as respostas foram calculadas em relação ao tempo de 48h de cultivo no sistema de fermentação extrativa utilizando SDFA para a produção e a extração de AC por *Streptomyces* DAUFPE 3060.

Tabela VIII.1. Resultados do planejamento estatístico completo 2²

Ensaio	Aeração (vvm)	Velocidade de agitação (rpm)	OUR (mmol/L.h)	OTR (mmol/L.h)
1	2	700	0,0313	0,7456
6 (C)	3,5	950	0,1343	1,6681
4	5	1.200	0,1581	2,6816
3	2	1.200	0,0821	1,4853
2	5	700	0,1265	1,4586
7 (C)	3,5	950	0,1343	1,5705
5 (C)	3,5	950	0,1282	1,6132

Todos os valores foram estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança.

OUR = velocidade de consumo de oxigênio pela população de microrganismos

OTR = taxa de transferência de oxigênio para a fase líquida

A influência das variáveis independentes, aeração e velocidade de agitação, expressa em seus níveis codificados (x_1 e x_2), sobre as respostas (y_{OUR} e y_{OTR}) foi descrita pelas equações (9) e (10):

$$y_{OUR} = 0,1135 + 0,0428x_1 + 0,020x_2 - 0,0048 x_1x_2 \quad (9)$$

$$y_{OTR} = 1,6033 + 0,4773x_1 + 0,4907x_2 + 0,1208x_1x_2 \quad (10)$$

O termo linear da interação (x_1x_2) para a resposta OUR não foi significativo, mesmo assim foi mantido no modelo para minimizar a determinação de erro. Para as respostas OTR, todos os termos foram significativos.

Para todas as respostas, o valor do F -calculado foi muito maior que o valor do F -tabelado; isto significa que o teste F foi significativo para ambas as variáveis independentes e que os modelos foram adequados para descrever os resultados através da superfície de resposta. O coeficiente de determinação (R^2), com valor próximo de 1, indicou concordância entre os resultados experimentais e os valores teóricos previstos pelo modelo. Os efeitos estimados e os valores de p correspondentes indicam que duas variáveis independentes exerceram efeito significativo sobre todas as variáveis-resposta estudadas (Tabela VIII.2).

Tabela VIII.2. Análise de variância do modelo descrito para cada variável-resposta, OUR e OTR em relação as variáveis independentes massa molar do PEG e velocidade de agitação de acordo com planejamento estatístico central composto 2²

Variância	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F- calc	F- tab	R ²	R ² _{ajustado}	valor p
<i>OUR</i>								
Regressão	2	0,0090	0,0045	9,22	6,94	0,91	0,82	0,0318
Resíduo	4	0,0019	0,0005					
Total	6	0,0109	-					
<i>OTR</i>								
Regressão	2	1,8744	0,9372	58,38	6,94	0,98	0,97	0,0011
Resíduo	4	0,0642	0,0160					
Total	6	1,9386	-					

Todos os valores foram estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança.

OUR = velocidade de consumo de oxigênio pela população de microrganismos

OTR = taxa de transferência de oxigênio para a fase líquida

A influência das variáveis x_1 e x_2 sobre as respostas OUR e OTR foi diferente. Segundo as equações (9) e (10), para a resposta OUR, a aeração influenciou muito mais que a velocidade de agitação; e para a OTR foi exatamente o contrário. Porém, a diferença entre os coeficientes dessas variáveis, x_1 e x_2 , para a resposta OTR, foi pequena, na ordem de 0,02. Como a OUR está envolvida com a biomassa, a aeração é uma variável imprescindível para o crescimento celular em processos aeróbios; enquanto que a velocidade de agitação pode causar o cisalhamento da célula e diminuir esse crescimento. No caso da OTR, a transferência de oxigênio no meio de cultivo, não só depende da aeração, mas também da velocidade de agitação que auxilia na distribuição homogênea desse gás no sistema.

Bandaiphet e Prasertsan (2006) avaliaram os efeitos da aeração e da velocidade de agitação na produção de um polissacarídeo por *Enterobacter cloacae* WD7. Esses autores observaram o aumento da OTR e da OUR com o aumento daquelas variáveis. Eles concluíram que quanto melhor o oxigênio for transferido para o sistema, mais ele vai ser utilizado pelas células e, consequentemente, a OTR também influenciará na OUR. Os valores de OTR foram muito maiores que aqueles para OUR (Tabela VIII.1), indicando que o suprimento de oxigênio foi suficiente para o cultivo.

Em relação ao k_La , observou-se que os valores determinados para os tempos de 48h (fase de maior produção de AC) e 72h (fase de baixa produção) de cultivo eram constantes para todos os ensaios (entre 33 e 35 s⁻¹). Esses resultados foram mais baixos que aqueles obtidos no estudo anterior sobre a comparação dos sistemas de fermentação convencional e de fermentação extrativa utilizando SDFA sem crescimento microbiano (VIANA MARQUES *et al.*, 2009), com maior valor de 70 s⁻¹ observado para o sistema de fermentação extrativa

utilizando SDFA. Esse fenômeno ocorreu em função do aumento de viscosidade no meio de cultivo tanto pelo crescimento do microrganismo quanto pela presença do PEG. Dessa forma, o oxigênio disponível foi quase que totalmente consumido pelas células.

Em condições similares, Clarke *et al.* (2006) investigaram os efeitos da adição de hidrocarbonetos no valor de k_La em biorreatores; observaram que o valor de k_La diminuía quando a viscosidade aumentava; isso acontecia devido à dificuldade da transferência de oxigênio. Comportamento semelhante também foi observado na presença de emulsificantes (ROLS *et al.*, 1990).

VIII.4.4 Efeitos da velocidade de agitação e da aeração nos parâmetros de extração do AC em uma das fases do SDFA

Conforme já verificado em estudos anteriores do grupo, em todos os ensaios realizados no presente trabalho, as células particionaram para a interface e o produto para a fase superior, rica em PEG (Figura VIII.3). Sendo assim, a influência da aeração (x_1) e da velocidade de agitação (x_2) na fermentação extrativa com SDFA de AC foi estudada, obtendo-se as seguintes respostas: concentração de AC (mg/L), coeficiente de partição (k), rendimentos das fases superior e inferior (η_s e η_I) e balanço de massa (BM).

Figura VIII.3. Foto do biorreator contendo a fermentação extrativa utilizando SDFA, após o cultivo de *Streptomyces* DAUFPE 3060 por 48h

Tabela VIII.3. Resultados dos ensaios realizados para determinação dos parâmetros de extração do AC no sistema de fermentação extrativa utilizando SDFA

Ensaio	Aeração (vvm)	Velocidade de agitação (rpm)	AC (mg/L)	k	η_s (%)	η_l (%)	BM (%)
1	2	700	2,9	0,7	20	40	60
6 (C)	3,5	950	431,2	67,4	73	19	92
4	5	1.200	350,8	74,8	68	15	83
3	2	1.200	90,5	21,2	56	23	79
2	5	700	150	33,2	81	11	92
7 (C)	3,5	950	438,1	67,4	78	21	99
5 (C)	3,5	950	432,3	64,8	75	18	93

Todos os valores foram estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança.

AC = concentração de ácido clavulânico; k = coeficiente de partição; η_s = rendimento da fase superior; η_l = rendimento da fase inferior; BM = balanço de massa

A maioria dos trabalhos citados na literatura sobre extração de antibióticos por SDFA reporta a partição desses para a fase superior, rica em PEG (ESMANHOTO; KILIKIAN, 2004; MOKHTARANI *et al.*, 2008; VIDEIRA; AIRES-BARROS, 1994). O maior coeficiente de partição foi obtido no ensaio 4, seguido daqueles observados nos ensaios dos pontos centrais. Esses valores estão de acordo com aqueles observados por Videira e Aires-Barros (1994), os quais também observaram, em sistema PEG/sais fosfato para extração de ácido clavulânico comercial (clavulanato de potássio), valores para o coeficiente de partição entre 1,5 e 114, o que confirma mais uma vez a afinidade da molécula do AC pela fase PEG.

Entretanto, a máxima concentração de ácido clavulânico foi observada nos pontos centrais, ou seja, nas condições de 3,5 vvm e 950 rpm (438,1, 432,3 e 431,2 mg/L) e não no ensaio 4, de maiores valores de velocidade de agitação e de aeração. Isso se deve ao fato de que, aumentando, demasiadamente, a velocidade de agitação, pode ocorrer o cisalhamento da biomassa, ou seja, o rompimento das células e a diminuição da produtividade. Segundo Elibol e Ozer (2000), o efeito positivo da velocidade de agitação afeta mais o rendimento do produto que a aeração. Esse fenômeno pode ser explicado, pois a ação mecânica da agitação afeta a taxa de transferência de oxigênio, que está diretamente correlacionada com a DOT e o k_La .

No caso da produção e da extração de AC, outro fator que pode ter influenciado foi a considerável viscosidade do meio de cultivo, devido ao PEG e ao crescimento celular. Alta viscosidade induz a coalescência de bolhas e as características de transferência de massa diminuem (EICKENBUSCH *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 2002). No entanto, esse fator não foi tão importante, pois a OTR, responsável pela transferência de oxigênio no sistema, não foi influenciada. A alta velocidade de agitação também seria uma variável fundamental na

diminuição da viscosidade; entretanto, no presente trabalho, esse comportamento afetou muito mais no rompimento da biomassa, por isso, no ensaio 4 a concentração de AC foi menor.

Os rendimentos na fase superior, rica em PEG, foram máximos nos ensaios 2, 5, 6 e 7. Esses valores confirmam aqueles obtidos para a concentração de AC, ou seja, quanto menor a velocidade de agitação maior o rendimento do processo. Nesse caso a aeração influenciou muito mais no rendimento. De acordo com Çalik *et al.* (2000), a transferência de oxigênio para dentro das células microbianas em processos fermentativos aeróbios afeta fortemente a formação do produto devido a possíveis modificações nos fluxos metabólicos. Além disso, essa transferência de oxigênio não só depende da fisiologia do microrganismo, como, também, da eficiência do biorreator.

A média da produtividade de AC entre os ensaios dos pontos centrais alcançou 9,0 mg/L.h após 48h de fermentação extrativa, com aproximadamente 75% de consumo do substrato.

Com o cálculo do balanço de massa observou-se que, em geral, não houve perda significativa de AC no sistema, uma vez que se considerou o erro experimental entre 5 e 10% para mais e para menos. Apenas o ensaio 1 apresentou perda maior, pois a concentração de AC (2,9 mg/L) foi muito pequena na fase superior, rica em PEG, em relação aos outros ensaios, talvez em função das baixas agitação e aeração.

VIII.5 CONCLUSÕES

A influência das variáveis, velocidade de agitação e aeração, no processo integrado de produção e extração de ácido clavulânico de *Streptomyces* DAUFPE 3060 por fermentação extrativa utilizando SDFA foi avaliada. Ambas as variáveis foram significativas para todas as respostas estudadas. A concentração de oxigênio dissolvido (OD) foi suficiente em todos os ensaios, permanecendo em torno de 60 a 80% em 48h de cultivo. O AC particionou para a fase superior do sistema, rica em PEG. Os valores de OTR foram maiores que os de OUR, indicando adequado suprimento de oxigênio para o sistema. O crescimento celular e a presença de PEG no meio aumentou a viscosidade, tornando o valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_{La}) constante para todos os ensaios nos tempos de 48 e 72h de cultivo. Os melhores resultados para os parâmetros de extração de AC foram obtidos nos ensaios referentes aos pontos centrais do planejamento estatístico com concentração de AC extraída na fase superior, rica em PEG, de 438 mg/L.

CAPÍTULO IX

IX. CONCLUSÕES FINAIS

Dos resultados apresentados nesta tese, conclui-se que:

- Dentre as linhagens de *Streptomyces* estudadas na etapa de seleção, a linhagem *Streptomyces* DAUFPE 3060 foi a maior produtora de ácido clavulânico e, portanto, foi selecionada para a continuação do trabalho.
- Na etapa de seleção das condições de cultivo pelo processo de fermentação convencional em frascos agitados utilizando planejamento estatístico, a concentração de farinha de soja e a temperatura foram as variáveis independentes que mais influenciaram na produção de AC por *Streptomyces* DAUFPE 3060. Após o estudo em frascos agitados, as condições selecionadas foram reproduzidas em biorreator.
- As condições de cultivo para a produção do AC por *Streptomyces* DAUFPE 3060 pelo processo de fermentação convencional em frascos agitados otimizadas foram: concentração de farinha de soja de 40 g/L, concentração de glicerol de 10 g/L, pH de 6,0, velocidade de agitação de 150 rpm e temperatura de 32°C.
- No estudo termodinâmico de formação e de degradação do AC durante a sua produção por *Streptomyces* DAUFPE 3060 em biorreator, a constante de degradação (k_d) aumentou progressivamente com a temperatura (até 40 °C), enquanto a constante de formação de AC (k_{AC}) aumentou até 32 °C e, em seguida, diminuiu; confirmando que a temperatura ótima de produção é a 32 °C.
- Os valores de k_{La} foram comparados em três sistemas (água, no meio de fermentação simples e no meio de fermentação extrativa utilizando SDFA), sem crescimento microbiano e sob diferentes condições de aeração e de agitação. Correlações entre o k_{La} , e as variáveis operacionais, número de potência e velocidade superficial, revelaram que as duas variáveis foram estatisticamente significativas.

- Para o meio utilizado na fermentação extrativa com SDFA, todos os valores do k_{La} foram menores que os dos outros dois sistemas (água e meio simples de fermentação), o que pode ser explicado pela alta viscosidade do PEG. Os valores previstos e observados de k_{La} estavam de acordo para os três sistemas escolhidos, confirmando assim a validade da proposta estudada.
- No estudo de produção e extração simultâneas de AC pelo processo de fermentação extrativa utilizando SDFA através do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , a massa molar do PEG e a velocidade de agitação foram as variáveis que mais influenciaram no coeficiente de partição e no rendimento do processo.
- O AC particionou para a fase superior, rica em PEG para todos os ensaios dos planejamentos fracionário e central composto.
- O ensaio adicional realizado nas condições ótimas (25 % de PEG 8.000 g/mol e 25% de solução de sais fosfato) em biorreator levou ao aumento de cerca de 30% na concentração de AC na fase superior, rica em PEG, com rendimento de 95% do processo, provavelmente devido a uma melhor agitação e transferência de oxigênio.
- A concentração de oxigênio dissolvido (OD) no processo de fermentação extrativa utilizando SDFA foi suficiente em todos os ensaios do planejamento completo 2^2 , permanecendo em torno de 60 a 80% em 48h de cultivo.
- Os valores de OTR foram maiores que os de OUR, indicando o adequado suprimento de oxigênio para o sistema.
- Os melhores resultados de rendimento, coeficiente de partição, balanço de massa e concentração de AC foram obtidos nos ensaios referentes aos pontos centrais do planejamento completo 2^2 (5, 6 e 7).
- A viscosidade dada pela presença do PEG e pela biomassa influenciou o k_{La} para todos os ensaios nos tempos de 48 e 72h de cultivo.

X. REFERÊNCIAS

ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell particles and macromolecules**: separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. 3.ed. New York: Wiley, 1986. 346p.

ANDERSSON, E.; JOHANSSON, A.C.; HAHN-HAGERDAL, B. α - Amylase production in aqueous two-phase systems with *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.7, p.333-338, 1985.

ARIAHU, C.C.; OGUNSUA, A.O. Thermal degradation kinetics of thiamine in prewinkle based formulated low acidity foods. **International Journal of Food Science and Technology**, v.35, p.315–321, 2000.

ARNOLD, K.; HERRMANN, A.; PRATSCH, L.; GAWRISCH, K. The dielectric properties of aqueous solutions of poly(ethylene glycol) and their influence on membrane structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.815, p.515-518, 1985.

ASENJO, J.A., ed. **Separation processes in biotechnology**. New York: Marcell Dekker, 1990. 801p. (Bioprocess technology, v.9).

ATLAS, R. M. **Principles of Microbiology**. 2a ed., Boston, WCB/MacGrall-Hill, 1997, 1298p.

BADINO Jr., A.C.; FACCIOTTI, M.C.R.; SCHMIDELL, W. Volumetric oxygen transfer coefficients (k_La) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. **Biochemical Engineering Journal**, v.8, p.111–119, 2001.

BAGGALEY, K.H.; BROWN, AG.; SCHOFIELD, C.J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and others clavams. **Natural Product Reports**, v.14, p.309-333, 1997.

BANDAIPHET, C.; PRASERTSAN, P. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, k_La in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. **Carbohydrate Polymers**, v.66, p.216–228, 2006.

BANIK, R.M.; SANTHIAGU, A. Extractive fermentation for enhanced gellan hydrolyzing enzyme production. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.715-720, 2002.

BANIK, R.M.; SANTHIAGU, A.; KANARI, B.; SABARINATH, C.; UPADHYAY, S.N. Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems, **World Journal Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.337–348, 2003.

BAPTISTA NETO, A.; HIRATA, D.B.; CASSIANO FILHO, L.C.M.; BELLÃO, C.; BADINO Jr., A.C.; HOKKA, C.O. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous processes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.22, p.557–563, 2005.

BARBOZA, M.; ALMEIDA, R.M.R.G.; HOKKA, C.O. Influence of temperature on the kinetics of adsorption and desorption of clavulanic acid by ionic exchange. **Biochemical Engineering Journal**, v.14, p.19–26, 2003.

BELMAR-BEINY, M.T.; THOMAS, C.R. Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: effect of stirrer speed in batch fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, p.456-462, 1991.

BENAVIDES, J.; MENA, J.A.; CISNEROS-RUIZ, M.; RAMÍREZ, O.T.; PALOMARES, L.A.; RITO-PALOMARES, M. Rotavirus-like particles primary recovery from insect cells in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.842, n.1, p.48-57, 2006.

BERSANETTI, P.A.; ALMEIDA, R.M.R.G.; BARBOZA, M.; ARAÚJO, M.L.G.C.; HOKKA, C.O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochemical Engineering Journal**, v.23, n.1, p.31-36, 2005.

BEZERRA, R.P.; BORBA, F.K.; MOREIRA, K.A.; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F.; CHAVES, A.C. Liquid-liquid extraction of amylase produced from *Bacillus subtilis* in poly(ethylene glycol)/salt aqueous two-phase system. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, p.547-555, 2006.

BIRD, A.E.; BELLIS, M.J.; GASSON, B.C. Spectrophotometric assay clavulanic acid by reaction with imidazole. **Analyst**, v.107, p.1241-1245, 1982.

BLOW, A.M.J.; BOTHAM, G.M.; FISHER, D.; GOODALL, A.H.; TILCOCK, C.P.S.; LUCY, J.A. Water and calcium ions in cell fusion induced by poly(ethylene glycol). **FEBS Letters**, v.94, p.305–310, 1978.

BORA, M.M.; BORTHAKUR, S.; RAO, P.C.; DUTTA, N.N. Aqueous two-phase partitioning of cephalosporin antibiotics: effect of solute chemical nature. **Separation and Purification Technology**, v.45, p.153–156, 2005.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude/>. Acesso em: 30 de maio de 2009.

BRETHAUER, S.; HELD, M.; PANKE, S. Clavulanic acid decoposition is catalyzed by the compound itself and by its decomposition products. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.97, n.8, p.3451-3455, 2008.

BROWN, A.G.; BUTTERWORTH, D.; BOLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J.D.; READING, C. Natrually occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. **Journal of Antibiotics**, v.9, p.29-668, 1976.

BRUNS, R.E.; SCARMINION, I.S.; BARROS NETO, B. **Statistical desing-chemometrics**. Amsterdam, Oxford: Elsevier, 2006. 412p. (Data handling in science and technology, v.25).

BUSH, K. Why it is important to continue antibacterial drug discovery. **ASM News**, v.70, p.282-287, 2004.

BUSH, K. Metallo-betalactamases: a class apart. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p.S48-S53, 1998.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for b-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.3, p.1211-1233, 1995.

BUSHELL, M.E.; KIRK, S.; ZHAO, H.J.; AVIGNONE-ROSSA, C.A. Manipulation of the physiology of clavulanic acid biosynthesis with the aid of metabolic flux analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.149–157, 2006.

CALDERBANK, P.H.; MOO-YOUNG, M.B. The power characteristic of agitators for the mixing of Newtonian and non-Newtonian fluids. **Transactions of the Institution of Chemical Engineers**, v.39, n.5, p.337–347, 1961.

CARTWRIGHT, S.J.; WALEY, S.G. Beta-laetamase inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v.3, p.341-382, 1983.

CASTILLO, U.F.; STROBEL, G.A.; FORD, E.J.; HESS, W.M.; PORTER, H.; JENSEN, J.B.; ALBERT, H.; ROBINSON, R.; CONDRON, M.A.M.; TEPLow, D.B.; STEVENS, D.; YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, v.148, p.2675–2685, 2002.

CHANDRASEKHARAN, K. CALDERBANK, P.H. Further observations on the scale-up of aerated mixing vessels. **Chemical Engineering Science**, v.36, p.819–823, 1981.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.100, p.14555-14561, 2003.

CHARNAS, R.L.; KNOWLES, J.R. Inactivation of RTEM β -lactamase from *Escherichia coli* by clavulanic acid and 9-deoxyclavulanic acid. **Biochemistry**, v.20, n.11, p.3214-3219, 1981.

CHATER, K.F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B: Biological Sciences**, v.361, n.1469, p.761-798, 2006.

CHEN, J.P.; LEE, M.S. Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.1021–1027, 1995.

CHEN, Q.H.; HE, G.Q.; MOKHTAR, A.M.A. Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus* sp. EL31410 with response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.667–672, 2002.

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. **Biotechnology Letters**, 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. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.152–156, 2003.

CLARKE, K.G.; WILLIAMS, P.C.; SMIT, M.S.; HARRISON, S.T.L. Enhancement and repression of the volumetric oxygen transfer coefficient through hydrocarbon addition and its influence on oxygen transfer rate in stirred tank bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v.28, p.237–242, 2006.

CONVERTI, A.; DEL BORGHI, A.; GANDOLFI, R.; LODI, A.; MOLINARI, F.; PALAZZI E. Reactivity and stability of mycelium-bound carboxylesterase of *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.77, p.232–237, 2002.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMINGUEZ, J.M.; SILVA, S.S. Effect of temperature on the microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.339–345, 2001.

COSTA, S.A.; PESSOA Jr., A.; ROBERTO, I.C. Xylanase Recovery. Effect of extraction conditions on the aqueous two-phase system using experimental design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.629, p.70-72, 1998.

COSTA, S.A.; PESSOA Jr., A.; ROBERTO, I.C. Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.743, n.1/2, p.339-348, 2000.

COULTHURST, S.J.; BARNARD, A.M.L.; SALMOND, G.P.C. Regulation and biosynthesis of carbapenem antibiotics in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.295-306, 2005.

ÇALIK, P.; ÇALIK, G.T.; OZDAMAR, H. Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.69, p.301–311, 2000.

DEMAIN, A.L. The business of biotechnology. **Industrial Biotechnology**, v.3, p.269-283, 2007.

DEMAIN, A.L.; ELANDER, R.P. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.75, p.5–19, 1999.

DIAMOND, A.D.; HSU, J.T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.47, p.89-135, 1992.

DISSING, U.; MATTIASSON, B. Cultivation of *Lactococcus lactis* in a polyelectrolyte-neutral polymer aqueous two phase system. **Biotechnology Letters**, v.16, p.333, 1994.

DROUIN, C.M.; COOPER, D.G. Biosurfactants and aqueous two-phase fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, p.86, 1992.

EICKENBUSCH, H.; BRUNN, P.O.; SCHUMPE, A. Mass transfer into viscous pseudoplastic liquid in large-diameter bubble columns. **Chemical Engineering and Processing**, v.34, n.5, p.479–485, 1995.

ELANDER, R.P. Industrial production of β -lactam antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, p.385-392, 2003.

ELIBOL, M.; MAVITUNA, F. A remedy to oxygen limitation in antibiotic production: addition of perfluorocarbon. **Biochemical Engineering Journal**, v.3, p.1-7, 1999.

ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v.36, p.325–329, 2000.

ENGLISH, A.R.; RETSEMA, J.A.; GIRARD, A.E.; LYNCH, J.E.; BARTH, W.E. CP-45,899, a beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams: initial bacteriological characterization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.14, p.414-419, 1978.

EYRING, H.J. The activated complex in chemical reactions. **Journal of Chemical Physics**, v.3, p.107-115, 1935.

ESMANHOTO, E.; KILIKIAN, B.V. Extração do antibiótico retamicina em sistema de duas fases aquosas PEG/citrato de sódio. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOTECNOLOGIA, 1, São Paulo, 2001. **Anais**. São Paulo, 2001.pag. 1-6.

ESMANHOTO, E.; KILIKIAN, B.V. ATPS applied to extraction of small molecules – polycetides – and simultaneous clarification of culture media with filamentous microorganisms. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.807, n.1, p.139–144, 2004.

ESSACK, S.Y.; HALL, L.M.C.; PILLAY, D.G.; MCFADYEN, M.L.; LIVERMORE, D.M. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.88–95, 2001.

FERREIRA, L.F.P.; TAQUEDA, M.H.; VITOLO, M.; CONVERTI, A.; PESSOA A. Liquid-liquid extraction of commercial glucose oxidase by reversed micelles. **Journal of Biotechnology**, v.116, p.411-416, 2005.

FGUIRA, L.F.B.; FOTSO, S.; MEHDI, R.B.A.; MELLOULI L.; LAATSCH, H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. Strain US 80. **Research in Microbiology**, v.156, p.341-347, 2005.

FORCINITI, D. Studying the Influence of Salts on Partitioning of Proteins: Isoelectric Point Determination Preparation of Aqueous Two-Phase Systems. In: KAUL, R.H. **Aqueous two-phase systems: methods and protocols**. Totowa: Human Press, 2002. p.201-208. (Methods in biotechnology, v.11).

FORCINITI, D.; HALL, C.K. Influence of polymer molecular weight in temperature on phase composition in ATPS. **Fluid Phase Equilibria**, v.61, p.243-262, 1991.

FOULSTONE, M.; READING, C. Assay of amoxicillin and clavulanic acid, components of augmentin, in biological fluids with performance liquid chromatography. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.22, p.753-762, 1982.

GALACTION, A.I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; TURNEA, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v.20, p.85-94, 2004.

GAGNON, H.; LOUNES, M.; THIBAUT, J. Power consumption and mass transfer in agitated gas- liquid columns: a comparative study. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v.76, p.379-389, 1998.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Mass transfer coefficient in stirrer tank reactors for xanthan solutions. **Biochemical Engineering Journal**, v.1, p.1-10, 1998.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. **Chemical Engineering Science**, v.59, p.2489-2501, 2004.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnology Advances**, v.27, p.153-176, 2009.

GAVASANE, M.R.; GAIKAR, V.G. Aqueous two-phase affinity partitioning of Penicillin acylase from *E. coli* in presence of PEG-derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.665-675, 2003.

GARRITY, G.M.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 2001.

GIBBS, P.A.; SEVIOUR, R.J. Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.46, n.5/6, p.503-510, 1996.

GOGATE, P.R.; BEENACKERS, A.A.C.M.; PANDIT, A.B. Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review. **Biochemical Engineering Journal**, v.6, p.109-144, 2000.

GOUVEIA, E.R.; BAPTISTA-NETO, A.; AZEVEDO, A.M.; BADINO, A.C.; HOKKA, C.O. Improvement of CA production by *Streptomyces clavuligerus* in medium containing soybean derivatives. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.15, p.623–625, 1999.

GOUVEIA, E.R.; BAPTISTA-NETO, A.; BADINO Jr., A.C.; HOKKA, C.O. Optimisation of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnology Letters**, v.23, p.157–161, 2001.

GRANT, E.B.; GUIADEEN, D.; BAUM, E.Z.; FOLENO, B.D.; JIN, H.; MONTENEGRO, D.A.; NELSON, E.A.; BUSH, K.; HLASTA, D.J. The synthesis and SAR of rhodanines as novel class C β -lactamase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.10, p.2179–2182, 2000.

GÜNDÜZ, U.; KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in aqueous two-phase system: effect of pH and sodium chloride concentration. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.743, n.1/2, p.255-258, 2000.

HAE BOK, S.; DEMAINE, A.L. An improved colorimetric assay for polyols. **Analytical Biochemistry**, v.81, p.18–20, 1977.

HAGINAKA, J.; NAKAGAWA, T.; UNO, T. Stability of clavulanic acid in aqueous solution. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, p.3334–334, 1981.

HAALAND, P.D. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1989. 259p. (Statistics: Textbooks and Monographs, 105).

HASMANN, F.A.; CORTEZ, D.V.; GURPILHARES, D.B.; SANTOS, V.C.; ROBERTO, I.C.; PESSOA Jr., A. Continuous counter-current purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase using liquid-liquid extraction by reversed micelles. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, p.236-241, 2007.

HARVEY, A. Strategies for discovering drug from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v.5, p.294-300, 2000.

HENSING, M.C.M.; ROUWENHORST, R.J.; HEIJNEN, J.J.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous protein production with yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.67, n.3, p.261–279, 1995.

HIRATA, D.B.; BADINO, A.C.J.; HOKKA, C.O. Utilization of PEG-phosphate aqueous two-phase system for clavulanic acid extraction from fermentation broth. In: SIMPÓSIO

NACIONAL DE BIOPROCESSOS – SINAFERM, Florianópolis, 2003. **Anais.** Florianópolis, 2003. pag. 7.

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. **Separation and Purification Technology**, v.66, p.598-605, 2009.

HOPWOOD, D.A. ***Streptomyces in nature and medicine***: the antibiotic makers. New York, Oxford: Oxford University Press, 2007. 250p.

HOTHA, S.; BANIK, R.M. Production of alkaline protease by bacillus thuringiensis H14 in aqueous two-phase systems. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.69, p.5–10, 1997.

HU, W.S.; BRANA, A.F.; DEMAİN, A.L. Carbon source regulation of cephem antibiotic production by resting cell of *Streptomyces clavuligerus* and its reversal by protein synthesis inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, v.6, p.155–160, 1984.

ILIĆ, S.B.; KONSTANTINOVIĆ, S.S.; TODOROVIĆ, Z.B. UV/VIS analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates. **Facta Universitatis, Series: Medicine and Biology**, v.12, n.1, p.44-46, 2005. Disponível em: <http://facta.junis.ni.ac.rs/mab/mab200501/mab200501-09.pdf>. Acesso em: 30 de novembro de 2009.

IVES, P.R.; BUSHELL, M.E. Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. **Microbiology**, v.143, p.633–636, 1997.

JENSEN, S.E.; PARADKAR, A.S. Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.75, p.125–133, 1999.

JOHANSSON, H.; MAGALDI, F.M.; FEITOSA, E.; PESSOA Jr., A. Protein partitioning in poly(ethylene glycol)sodium polyacrylate aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography, A**, v.1178, p.145-153, 2008.

JOZALA, A.F.; LOPES, A.M.; MAZZOLA, P.G.; MAGALHAES, P.O.E.; PENNA, T.C.V.; PESSOA Jr., A. Liquid-liquid extraction of commercial and biosynthesized nisin by aqueous two-phase micellar systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.42, p.107-112, 2008.

KANNAN, R. **Studies on extractive fermentation of *Bacillus licheniformis* α - amylase using PEG-citrate aqueous two-phase system**. Varanasi, 1997. M.Tech. Thesis - School of Biochemical Engineering.

KAUL, R.H. **Aqueous two-phase systems: methods and protocols**. Totowa: Human Press, 2002. 440p. (Methods in biotechnology, v.11).

KAWASE, Y.; HALARD, B.; MOO-YOUNG, M. Liquid-phase mass transfer coefficients in bioreactors, **Biotechnology and Bioengineering**, v.39, p.1133–1140, 1992.

KENJI, I.; HUNG, T.V.; LEE, H.C.; LIOU, K.; SHIN, C.-H.; YOON, Y.J.; SOHNG, J.K. Degradation of clavulanic acid during the cultivation of *Streptomyces clavuligerus*; instability of clavulanic acid by metabolites and proteins from the strain. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.16, n.4, p.590–596, 2006.

KIM, H.J.; KIM, J.H.; OH, H.J.; SHIN, C.S. Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. **Process Biochemistry**, v.38, n.5, p.649–655, 2002.

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 Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.17, p.869–872, 2001.

KIM, Y.J.; WEIGAND, W.A. Experimental analysis of product inhibited fermentation in an aqueous two-phased system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.34/35, p.419, 1992.

KIM, S.H.; YOO, Y.J. Extractive purification of enzymes from animal tissue using aqueous two phase. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.71, p.373, 1991.

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

KOBAYASHI, Y.; OKAMOTO, A.; NISHINARI, K. Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights. **Biorheology**, v.31, p.235–244, 1994.

KONECNY, J.; FELBER, E.; GRUNER, J. Kinetics of the hydrolysis of cephalosporin C. **Journal of Antibiotics**, v.26, n.3, p.135–141, 1973.

KOUDA, T.; YANO, H.; YOSHINAGA, F. Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.38, p.371–376, 1997.

KUBOI, R.; MARUKI, T.; TANAKA, H.; KOMASAWA, I. Fermentation of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and production of subtilin in polyethylene glycol/phosphate aqueous two-phase systems. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.78, p.431, 1994.

KUBOI, R.; UMAKOSHI, H.; KOMASAWA, I. Extractive cultivation of *Escherichia coli* using poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase systems to produce intracellular beta-galactosidase. **Biotechnology Progress**, v.11, p.202, 1995.

KULA, M.R.; KRONER, K.H.; HUSTEDT, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. **Advances in Biochemical Engineering**, v.24, p.73-118, 1982.

KWON, Y.J.; KAUL, R.; MATTIASSON, B. Extractive bioconversion for lactic acid production in poly(ethyleneimine) based aqueous two-phase system. **Biotechnology and Bioengineering**, v.50, p.280, 1996.

LABUZA, T.P.; RIBOH, D. Theory and application of Arrhenius kinetics to the predication of nutrient losses in foods degradation, keeping, quality, temperature, quality controls, analysis, models. **Food Technology**, v.36, p.66-74, 1982.

LAMONT, J.C.; SCOTT, D.S. An eddy cell model of mass transfer into the surface of a turbulent liquid. **AIChE Journal**, v.16, p.513-519, 1970.

LAWRENCE, C.H. A method of isolating actinomycetes from scabby potato tissue and soil with minimal contamination. **Canadian Journal of Botany**, v.34, p.44-47, 1956.

LE DUY, A.; ZAJIC, J.E. A Geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.15, p.805-815, 1973.

LEE, Y.H.; CHANG, H.N. Production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in an aqueous two-phase system. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.69, p.89, 1990.

LEE, S.D.; PARK, S.W.; OH, K.K.; HONG, S.I.; KIM, S.W. Improvement for the production of clavulanic acid by mutant *Streptomyces clavuligerus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, n.5, p.370-375, 2002.

LEE, N.; YUEN, K.Y.; KUMANA, C.R. Clinical role of beta-lactam/ beta-lactamase inhibitor combinations. **Drugs**, v.63, p.1511-1524, 2003.

LI, C.; FAN, O.Y.; BAI, J.H. Extractive cultivation of *Lactococcus lactis* using a poly(ethylene glycol)/MgSO₄·7H₂O aqueous two-phase system to produce nisin. **Biotechnology Letters**, v.22, p.843, 2000.

LIAO, L.C.; CHESTER, S.H.; WU, W.T. Bioconversion with whole cell penicillin acylase in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v.34, p.417–420, 1999.

LIVERMORE, D.M. Determinants of the activity of β -lactamase inhibitor combinations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.31A, p.9–21, 1993.

LYNCH, H.C.; YANG, Y. Degradation products of clavulanic acid promote clavulanic acid production in cultures of *Streptomyces clavuligerus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.48–54, 2004.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8.ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1997. p.435, 442-445.

MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.M; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 11.ed. Upper Saddle River, London: Prentice Hall, 2005. 992p.

MARANESI, G.L.; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.509–514, 2005.

MAYER, A.F.E.; DECKWER, W.D. Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, p.41-46, 1996.

MAYERHOFF, Z.D.V.L.; ROBERTO, I.C.; FRANCO, T.T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal**, v.18, p.217-223, 2004.

MERCHUK, J.C.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: studies on phase inversion. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.711, n.1/2, p.285-293, 1998.

MICETICH, R.G.; MAITI, S.N.; SPEVAK, P.; HALL, T.W.; YAMABE, S.; ISHIDA, N.; TANAKA, M.; YAMAZAKI, T.; NAKAI, A.; OGAWA, K.J. Synthesis and 6-Lactamase inhibitory properties of 26-[(1,2,3-Triazol-1-yl)methyl]-2a-methylpenam-3a-carboxylic acid 1,1-Dioxide and related triazolyl derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.30, p.1469-1474, 1987.

MINCER, T.J.; JENSEN, P.R.; KAUFFMAN, C.A.; FENICAL, W. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.5005–5011, 2002.

MOKHTARANI, B.; KARIMZADEH, R.; AMINI, M.H.; MANESH, S.D. Partitioning of Ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, p.241–247, 2008.

MONTES, F.Y.; CATALAN, J.; GALAN, M. Prediction of k_{La} in yeast broths. **Process Biochemistry**, v.34, p.549-561, 1999.

MOO-YOUNG, M.; COONEY, CH.L.; HUMPHREY, A.E. **Comprehensive biotechnology: the principles, applications, and regulations of biotechnology in industry, agriculture, and medicine**. Oxford, New York: Pergamon Press, 1985. v.2, p.16.

MOREIRA, K.A.; ARZENHA, M.L.; TEIXEIRA, M.F.S.; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F. Partition behaviour and partial purification of alkaline protease from *Nocardia* sp. in poly (ethylene glycol) phosphate aqueous two-phase systems. **International Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v.1, n.1, p.22-23, 2005.

MOREIRA, K.A.; CHAVES, A.C.; MARQUES, E.A.; PRAZERES, D.M.; AZEVEDO, W.M.; PORTO, A.L.F.; LIMA-FILHO, J.L. Extraction of dengue 2 plasmid DNA vaccine (pD2) from cell lysates by aqueous two-phase systems. **Biotechnology**, v.6, p.520-526, 2007.

OLIVEIRA, G.G.G.; SILVA, D.P.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M.; PESSOA Jr., A. Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.2, p.176-187, 2001.

OLIVEIRA, P.M.S. **Seleção de *Streptomyces* spp produtores de inibidores de beta lactamases**. Pernambuco, 2004. 65p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de produtos Bioativos – Universidade Federal de Pernambuco.

ORTIZ, S.C.A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1071–1077, 2007.

OZBEK, B.; GAYIK, S. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v.36, p.729–741, 2001.

PAMBOUKIAN, C.R.D. **Produção do antitumoral rentamicina por *Streptomyces olindensis* em processos descontínuos**. São Paulo, 2003. 163p. Tese de Doutorado - Engenharia Química – Universidade de São Paulo.

PARADIKAR, A.S.; MOSHER, R.H.; ANDERS, C.; GRIFFIN, A.; GRIFFIN, J.; HUGHES, C.; GREAVES, P.; BARTON, B.; JENSEN, S.E. Applications of gene replacement technology to *Streptomyces clavuligerus* strain development for clavulanic acid production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2292-2297, 2001.

PEACOCK, L.; WARD, J.; RATLEDGE, C.; MARK DICKINSON, F.; ISON, A. How *Streptomyces lividans* uses oils and sugars as mixed substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.157-166, 2003.

PEREGO, P.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. **Bioresource Technology**, v.89, p.125-131, 2003.

PEREZ, J.F.; SANDALL, O.C. Gas absorption by non-Newtonian fluids in agitated vessels. **AIChE Journal**, v.20, p.770-775, 1974.

PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Production of b-glucosidase with *Aspergillus phoenicis* QM329 in aqueous two-phase systems. **Biotechnology Techniques**, v.3, n.4, p.265-270, 1989.

PERSSON, I.; STALBRAND, H.; TJERNELD, F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Semicontinuous production of cellulolytic enzymes with *Trichoderma reesei* Rutgers C30 in an aqueous two-phase system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.27, p.27-36, 1991.

PITLOVANCIV, A.K. **Atividade antibiótica de extratos obtidos de culturas de *Chromobacterium violaceum***. Florianópolis, 2005. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia - Universidade Federal de Santa Catarina.

PRIDHAM, T.G.; ADERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L.A.; HESSELTINE, C.W.; BENEDICT, R.G. A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomyces. **Antibiotics Annual**, p.947-953, 1956/1957.

PORTO, T.S.; PORTO, C.S.; CAVALCANTI, M.T.H.; LIMA FILHO, J.L.; PEREGO, P.; PORTO, A.L.F. Kinetic and thermodynamic investigation on ascorbate oxidase activity and stability of a *Cucurbita maxima* extract. **Biotechnology Progress**, v.22, p.1637-1642, 2006.

PORTO, T.S.; PESSOA FILHO, P.A.; BARROS-NETO, B.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA Jr., A. Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate). **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.34, p.547-552, 2007.

PORTO, T.S.; SILVA, G.M.; PORTO, C.S.; SOARES, M.T.C.V.; BARROS-NETO, B.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA A. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v.47, p.716-721, 2008.

PRATT, R.F. β -Lactamase: inhibition. In: PAGE, M.I., ed. **The Chemistry of β -Lactams**. London: Blackie Academic & Professional, 1992. p.229-271.

PUTHLI, M.S.; RATHOD, V.K.; PANDIT, A.B. Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.23, p.25-30, 2005.

REED, M.D. Rational prescribing of extended-spectrum penicillin beta-lactamase inhibitor combinations: focus on ticarcillin/clavulanic acid. **Annals of Pharmacotherapy**, v.32, p.17-21, 1998.

READING, C.; COLE, M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting β -Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.11, p.852-857, 1977.

READING, C.; FARMER, T. The inhibition of β -lactamases from gram-negative bacteria by clavulanic acid. **Biochemistry Journal**, v.199, p.779-787, 1981.

RICHARDS, J.W. Studies in aeration and agitation. **Program in Industrial Microbiology**, v.3, p.143-172, 1961.

RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products: review. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.807, n.1, p.3-11, 2004.

RITO-PALOMARES, M.; CUETO, L. Effect of biological suspensions on the position of binodal curve in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.743, n.1/2, p.5-12, 2000.

ROELS, J.A. **Energetics and kinetics in biotechnology**. Amsterdam, New York: Elsevier Biomedical Press, 1983. 330p.

ROLINSON, G.N. Evolution of β -lactamase inhibitors. **Surgery, Gynecology & Obstetrics**, v.13, p.5727-5732, 1991.

ROLS, J.L.; CONDORET, J.S.; FONANDA, C.; GOMA, G. Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen vectors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.427–435, 1990.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTIN, J.F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 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*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.27, p.99–104, 2005.

ROUBOS, J.A.; KRABBEN, P.; DE LAAT, W.T.A.M.; BABUSKA, R.; HEIJNEN, J.J. Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations. **Biotechnology Progress**, v.18, p.451–457, 2002.

SAMPAIO, F.C.; MORAES, C.A.; DE FAVERI, D.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; PASSOS, F.M.L. Influence of temperature and pH on xylitol production from xylose by *Debaryomyces hansenii* UFV-170. **Process Biochemistry**, v.41, p.675–81, 2006.

SÁNCHEZ-LUNA, L.D.; BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Influence of pH, temperature, and urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: a kinetic and thermodynamic approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v.96, p.702–711, 2007.

SÁNCHEZ, S.; OLISON, B. Ecology and industrial microbiology: microbial diversity — the bright and promising future of microbial manufacturing. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.229–233, 2005.

SANDERS, C.C.; SANDERS Jr., W.E. Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin-inducible beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.15, n.6, p.792–797, 1979.

SANTOS, V.C.; BRANDÃO PEREIRA, J.F.; BRANDÃO HAGA, R.; RANGEL-YAGUI, C.O.; COUTO TEIXEIRA J.A.; CONVERTI, A.; PESSOA Jr., A. Stability of clavulanic acid under variable pH, ionic strength and temperature conditions: a new kinetic approach. **Biochemical Engineering Journal**, v.45, p.89–93, 2009.

SARUBBO, L.A. **Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos**. Campinas, 2000. Tese de Doutorado - Engenharia Química - Universidade de Campinas.

SAUDAGAR, P.S.; SINGHAL R.S. Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Bioresource Technology**, v.98 p.2010–2017, 2007.

SAUDAGAR, P.S.; SURVASE, S.A.; SINGHAL, R.S. Clavulanic acid: a review. **Biotechnology Advances**, v.26, p.335–351, 2008.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. Disponível em: <http://www.sciencephoto.com/>. Acesso em: 23 de setembro de 2009.

SHLAES, D.M.; PROJAN, S.J.; EDWARDS, J.E. Antibiotic discovery: state of the state. **ASM News**, v.70, n.6, p.275–281, 2004.

SIRCAR, A.; SRIDHAR, P.; DAS, P.K. Optimization of solid state medium for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. **Process Biochemistry**, v.33, p.283–289, 1998.

SCHMIDT, A.S.; VENTON, A.M.; ASENJO, J.A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase. **Enzyme and Microbial Technology**. v.16, p.131–142, 1994.

SCHÜGERL, K. Integrated processing of biotechnology products: research review paper. **Biotechnology Advances**, v.18, p.581–599, 2000.

SILVA, C.S.; BOVAROTTI, 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 and Biosystems Engineering**, v.32, p.625–632, 2009.

SINHA, J.; DEY, P.K.; PANDA, T. Extractive fermentation for improved production of endoglucanase by an intergeneric fusant of *Trichoderma reesei*/*Saccharomyces cerevisiae* using aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v.6, p.163–175, 2000.

SOARES, M.T.C.V.; PORTO, T.S.; BARROS-NETO, B.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F.; PESSOA JUNIOR, A. Purification of alfa-toxin from *Clostridium perfringens* type A in PEG-phosphate aqueous two-phase systems: a factorial study. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.83, p.158–162, 2008.

SOLISIO, C.; LODI, A.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Influence of temperature on cadmium removal by *Sphaerotilus natans* from acidic solutions. **Separation Science and Technology**, v.38, n.16, p.3951–3966, 2003.

SPRATT, B.G. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. **Science**, v.264, p.388-393, 1994.

SRINIVAS, N.D.; BARHATE, R.S.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of Ipomoea peroxidase. **Journal of Food Engineering**, v.54, p.1-6, 2002.

STREDANSKY, M.; SVORC, R.; STURDIK, E.; DERCOVA, K. Repeated batch α -amylase production in aqueous two-phase system with *Bacillus* strains. **Journal of Biotechnology**, v.27, p.181, 1993.

TADDEI, A.; RODRIGUEZ, M.J.; MARQUEZ-VILCHEZ, E.; CASTELLI, C. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: morphological and biochemical studies. **Microbiological Research**, v.161, p.222-231, 2005.

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

TOKALA, R.K.; STRAP, J.L.; JUNG, C.M.; CRAWFORD, D.L.; SALOVE, M.H.; DEOBALD, L.A.; BAILEY, J.F.; MORRA, M.J. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2161-2171, 2002.

TRINDADE, I.P.; DIOGO, M.M.; PRAZERES, D.M.F.; MARCOS, J.C. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.1082, p.176-184, 2005.

TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.799, n.2, p.293-301, 2004.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Faculdade de Tecnologia. Centro Superior de Educação Tecnológica. Disponível em: <http://www.ceset.unicamp.br/>. Acesso em: 25 de março de 2007.

VASCONCELOS, J.M.T.; ORVALHO, S.C.P.; RODRÍGUEZ, A.M.A.F.; ALVES, S.S. Effect of blade shape on the performance of six-bladed disk turbine impellers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.39, n.1, p.203-213, 2000.

VENÂNCIO, A.A.D. **Caracterização de novos sistemas para partição bifásica de biomoléculas**. Braga, 1996. p.154. Tese de Doutorado - Engenharia Biológica - Universidade do Minho.

VENKATESAN, A.M.; AGARWAL, A.; ABE, T.; USHIROGOCHI, H.; YAMAMURA, I.; KUMAGAI, T.; PETERSEN, P.J.; WEISS, W.J.; LENOY, E.; YANG, Y.; SHLAES, D.M.; RYAN, J.L.; MANSOUR, T.S. Novel imidazole substituted 6-methylidene-penems as broad-spectrum beta-lactamase inhibitors **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, n.22, p.5807–5817, 2004.

VIANA, D.A.; CARNEIRO-CUNHA, M.N.; ARAÚJO, J.M.; BARROS-NETO, B.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PESSOA Jr., A.; PORTO, A.L.F. Screening of variables influencing the clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2009. [No prelo].

VIANA MARQUES, D.A.; TORRES, B.R.; PORTO, A.L.F.; PESSOA Jr., A.; CONVERTI, A. Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v.47, p.122–126, 2009.

VIDEIRA, M.; AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. **Journal of Chromatography, A**, v.668, p.237-240, 1994.

WALKER, S.G.; DALE, C.J.; LYDDIATT, A. Aqueous two-phase partition of complex protein feedstocks derived from brain tissue homogenates. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.680, n1/2, p.91-96, 1996.

WALSH, C. **Antibiotics: actions, origins, resistance**. Washington: ASM Press, 2003. p.3, 4, 89, 108, 114.

WANG, Y.-H.; YANG, B.; REN, J.; DONG, M.-L.; LIANG, D.; XU, A.-L. Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. **Process Biochemistry**, v.40, n.3/4, p.1161–1166, 2005.

WATVE, M.G.; SHEJVAL, V.; SONAWANE, C.; MATAPURKAR, M.; SHOUCHE, Y.; PATOLE, M.; PHADNIS, N.; CHAMPHEKAR, A.; DAMLE, K.; KARANDIKAR, S.; KSHIRSAGAR, V.; JOG, M. The “K” selected oligophilic bacteria: a key to uncultured diversity? **Current Science**, v.78, p.1535-1542, 2000.

WATVE, M.G.; TICKOO, R.; JOG, M.M.; Bhole, B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of Microbiology**, v.176, p.386-390, 2001.

WESTERTERP, K.R.; VAN DIERENDONCK, L.L.; DE KRAA, J.A. Interfacial areas in agitated gas–liquid contactors. **Chemical Engineering Science**, v.18, p.157–168, 1963.

WILKE, M.S.; LOVERING, A.L.; STRYNADKA, NCJ. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, p.525-533, 2005.

WISEMAN, A., ed. **Topics in enzyme and fermentation biotechnology**. Chichester, New York: John Wiley, 1977. v.1.

WU, H. An issue on applications of a disk turbine for gas–liquid mass transfer. **Chemical Engineering Science**, v.50, p.2801–2811, 1995.

YANG, W.; CHU, I. Extraction of penicillin-g by aqueous two-phase partition. **Biotechnology Techniques**, v.4, n.3, p.191-19, 1990.

YANG, W.Y.; LIN, C.D.; CHU, I.M.; LEE, C. Separation of desacetyl cephalosporin C by aqueous two-phase partition. **Journal Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.439–445, 1994.

YANG, Y.; SHLAES, D.M.; RYAN, J.L.; MANSOUR, T.S. Novel imidazole substituted 6-methylidene-penems as broad-spectrum b-lactamase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, p.5807–5817, 2004.

YIXIN. G.; ZIQIANG, Z.; LEHE, M. Technical aspects of extractive purification of penicillin fermentation broth by aqueous two-phase partitioning. **Separation Science and Technology**, v.31, p.2589-2597, 1996.

YOSHIDA, F.; IKEDA, A.; IMAKAWA, S.; MIURA, Y. Oxygen absorption rates in stirred gas–liquid contactors. **Industrial and Engineering Chemistry**, v.58, p.32–40, 1960.

ZHANG, Z.; THOMAS, C.R. Eddy number distribution in isotropic turbulence and its application for estimating mass transfer coefficients. **Chemical Engineering Communications**, v.140, p.207–217, 1996.

Anexos

Artigos publicados e submetidos para periódicos internacionais:

Anexo 1 - *Screening of Variables Influencing the Clavulanic Acid Production by Streptomyces DAUFPE 3060 Strain*

Anexo 2 - *Optimization of clavulanic acid production by Streptomyces DAUFPE 3060 by response surface methodology*

Anexo 3 - *Kinetic and thermodynamic investigation on clavulanic acid formation and degradation during glycerol fermentation by Streptomyces DAUFPE 3060*

Anexo 4 - *Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems*

ANEXOS

Screening of Variables Influencing the Clavulanic Acid Production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 Strain

D. A. Viana · M. N. Carneiro-Cunha · J. M. Araújo ·
B. Barros-Neto · J. L. Lima-Filho · A. Converti ·
A. Pessoa-Júnior · A. L. F. Porto

Received: 10 March 2009 / Accepted: 13 May 2009
© Humana Press 2009

Abstract Clavulanic acid (CA) is a β -lactam antibiotic, which has a potent β -lactamase inhibiting activity. The influence of five variables, namely pH (6.0, 6.4, and 6.8), temperature (28°C, 30°C, and 32°C), agitation intensity (150, 200, and 250 rpm), glycerol concentration (5.0, 7.5, and 10 g/L) and soybean flour concentration (5.0, 12.5, and 20 g/L), on CA production by a new isolate of *Streptomyces* (DAUFPE 3060) was investigated in 250-mL Erlenmeyer flasks using a fractional factorial design. Temperature and soybean flour concentration were shown to be the two variables that exerted the most important effects on the production of CA at 95% confidence level. The highest CA concentration (494 mg/L) was obtained after 48 h at 150 rpm, 32°C, pH 6.0, 5.0 g/L glycerol, and 20 g/L soybean flour concentrations. Under these conditions, the yields of biomass and product on consumed substrate were 0.26 g_X/g_S and 64.3 mg_P/g_S, respectively. Fermentations

D. A. Viana · A. Pessoa-Júnior
Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 16, Cidade Universitária, 05508-000 São Paulo, São Paulo, Brazil

M. N. Carneiro-Cunha · J. L. Lima-Filho
LIKA, Federal University of Pernambuco, Campus Universitário, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

J. M. Araújo
Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Luis Freire, 0740-540 Recife, Pernambuco, Brazil

B. Barros-Neto
Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Luis Freire, 0740-540 Recife, Pernambuco, Brazil

A. Converti (✉)
Department of Chemical and Process Engineering, University of Genoa, Via Opera Pia 15, 16145 Genoa, Italy
e-mail: converti@unige.it

A. L. F. Porto
Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900 Dois Irmãos, Pernambuco, Brazil

performed in 3.0-L bench-scale fermenter allowed increasing the CA production by about 60%.

Keywords *Streptomyces* · Soybean flour · Glycerol · Clavulanic acid · Screening of variables · Fermentation

Introduction

Since the advent of the antibiotic era in the 1930s, medical science has witnessed the successful therapeutic application of numerous classes of antibiotics, including penicillins, cephalosporins, and tetracyclines [1]. Today, the β -lactam antibiotics, particularly penicillins and cephalosporins, represent the major biotechnology products with worldwide dosage sales at around 65% of the total market of antibiotics [2].

Clavulanic acid (CA) is a β -lactam antibiotic produced by *Streptomyces clavuligerus* having a powerful inhibitory activity against β -lactamases from a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria [3]. The treatment of bacterial resistance to the therapeutic efficacy of β -lactams and other antibiotics is nowadays more difficult than in the past. The discovery and application of CA demonstrate to be an effective approach to face antibiotic resistance that has been successfully applied in the clinic field [4]. CA is a potent antibiotic inhibitor of “serine” (or classes A, C, and D) β -lactamases, which is nowadays used as potassium salt in conjunction with amoxycillin and prescribed clinically as co-amoxiclav (Augmentin™) or with ticarcillin as Timentin™ [5].

Streptomyces is the largest antibiotic-producing genus in the discovered microbial world. Species belonging to this genus still remain an important source of antibiotics [6]. In recent years, screening of natural products, particularly microbial products, has fallen out. Nevertheless, it is becoming increasingly apparent that 99% of the diverse bacterial species is still unexplored [1, 2, 5]. Thus, the discovery of new *Streptomyces* species is a challenge for the improvement of CA production.

The productivity of microbial metabolites is, in general, closely related to the fermentation process. The types of nutrients, their concentrations, and the operating conditions have different effects on the accumulation of metabolites, which is controlled by intracellular effectors [7–9]. Selection of the most suited culture medium composition is of primary importance to increase the productivity of any bioprocess. Besides, the culture medium should provide nutrients easily available in the market and, if possible, of low cost [10].

Statistical design of experiments is a widely used tool for process optimization and control. The multivariate design of experiments is a very efficient method for studying the influence of a certain number of variables on a given response of interest. By a fractional factorial design, the significant factors and their effects can be studied using only a few experiments, thus reducing the operating costs [11]. Most of previous studies were devoted to the improvement of CA production by *S. clavuligerus* [6], by selection of the optimum operating conditions, namely pH [12], temperature [13], agitation [14], concentrations of glycerol as a carbon source [8], and of soybean flour as a nitrogen source [15].

However, there are only a few works that deal with high CA producing mutants of this species or other *Streptomyces* species [16, 17] as well as the influence of process variables on CA production by statistical design [18].

On the basis of this ground, a 2^{5-2} fractional two-level factorial design was used in this work to study the influence of pH, temperature, agitation intensity, glycerol concentration, and soybean flour concentration on CA production by the new isolate *Streptomyces* DAUFPE

3060, selecting the CA and biomass concentrations as the responses. In fact, these variables were shown to be the most influencing CA production by other strains [8, 12–15]. Although such an isolate was not yet characterized, its high performance in CA production with respect to common *S. clavuligerus* strains constitutes the main novelty of this study.

Materials and Methods

Reagents

Potassium clavulanate from *S. clavuligerus* was used for the calibration curve needed to determine the concentration of CA. The imidazole used in the CA determination was provided by Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil). The salts, glycerol, bacto-peptone, malt extract, and yeast extract used to prepare the media were analytical grade reagents.

Microorganism

The *Streptomyces* spp. DAUFPE 3060 strain was kindly provided by the Microorganism Collection of the Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil. This strain was isolated directly from soil samples. For each collected sample, 3 g of soil were diluted in 100 mL of saline solution (0.85% NaCl) and allowed to stand for 15 min. Three different dilutions (1:10, 1:100 and 1:1,000) were prepared using sterile saline solutions in a total volume of 10 mL. According to Lawrence [19], aliquots of 0.1 mL of each dilution were plated using glucose–asparagine–agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) at pH 6.5 as selective medium. Plates were incubated at 28°C and monitored after 48, 72, and 96 h. Representative colonies were selected and streaked on new plates of this medium. The isolated *Streptomyces* species were preserved on yeast malt extract plates at 4°C until further use. Preliminary characterization was carried out by optical microscopy in order to determine the morphology of the spore chains, the colony color, and the release of pigments in the cultivation medium. The microorganism, which is still at the stage of molecular characterization, was stored in cryotubes (glycerol 10%, v/v) at –70°C and used throughout the present work.

Culture Media

The seed medium had the following composition (in g/L distilled water): glycerol, 15; bacto-peptone, 10; malt extract, 10; yeast extract, 1.0; K₂HPO₄, 2.5; MgSO₄·7H₂O, 0.75; MnCl₂·4H₂O, 0.001; FeSO₄·7H₂O, 0.001; and ZnSO₄·7H₂O, 0.001. The pH of the medium was adjusted to 6.8 with NaOH 5.0 M before autoclaving at 121°C for 15 min. The inoculum medium used in the cultivations, based on that proposed by Maranesi et al. [20], had the following composition (in g/L distilled water): glycerol, 10; soybean flour (SF), 20; K₂HPO₄, 1.2; MnCl₂·4H₂O, 0.001; FeSO₄·7H₂O, 0.001; and ZnSO₄·7H₂O, 0.001, pH 6.8. The composition of the production medium was similar to that used for the inoculum, except for the concentrations of SF and glycerol that were varied according to the selected experimental design.

Fermentation Conditions

The seed culture was prepared by adding the spore suspension (6.6 g/L dry weight) contained in a cryotube (3.0 mL) to 25 mL of seed medium in 250-mL Erlenmeyer flasks and incubated in

an orbital shaker at 28°C and 200 rpm for 24 h. Afterward, 250-mL Erlenmeyer flasks containing 45 mL of inoculum medium were inoculated with 5.0 mL of seed culture and incubated in an orbital shaker at 28°C and 200 rpm for 24 h. Then, 5.0-mL aliquots of this medium were transferred to 250-mL Erlenmeyer flasks containing 45 mL of production medium. The production runs, which lasted 168 h, were performed in an orbital shaker under different conditions according to the experimental design described later (Table 1). One flask was drawn every 24 h and utilized to determine cell concentration, pH, and CA concentration.

All the experiments were performed once according to the selected experimental design, but run 3 ensured the highest CA production, and then was carried out in triplicate. For comparison, an additional fermentation was carried out in triplicate in a 3.0-L fermenter, model Z61103CT04 (Applikon, Schiedam, The Netherlands). An electronic device, model ADI1030 (Applikon), allowed performing the fermentation under the best conditions determined in shaken flasks (32°C, pH 6.0±0.1, 5 g/L glycerol, and 20 g/L soybean flour). According to Ortiz et al. [10], the rotational speed and the aeration were set at 800 rpm and 0.5 vvm, respectively. Dissolved oxygen concentration was monitored by a sterilized galvanic electrode, InPro6000 Series (Mettler-Toledo, Novate Milanese, Italy).

Analytical Methods

The fermentation broth was centrifuged at 5,500×g for 20 min at 4°C, and the cell pellet was washed twice with distilled water and dried to constant weight at 80°C. The spectrophotometric assay by reaction with imidazole, selected in this study, was described in detail by Bird et al. [21] and utilized by most of the researchers working in this field [10, 13, 20]. According to this method, the CA concentration in the fermented broth was determined by measuring the increase in the optical density at 311 nm due to the release of the product [1-(8-hydroxy-6-oxo-4-azooct-2-enol)-imidazole] of the reaction between CA and imidazole. Glycerol concentration was determined according to Hae Bok and Demain [22]. All the analyses were performed in duplicate.

Experimental Procedure

Batch fermentations were carried out according to a 2^{5-2} fractional factorial design, which is a one-fourth fraction of the full two-level factorial design [11]. It was used to evaluate the relative influence of several variables on the production of CA. In such a fraction, the effects are confounded in groups of four, which is why the calculated results are called “contrasts,” to distinguish them from the effects themselves. The experimental design was composed of eight runs and four repetitions in the central point, needed to calculate the pure

Table 1 CA production by *Streptomyces* spp. DAUFPE 3060 under different conditions.

Levels Coded values	Lower −1	Central 0	Higher +1
(1) Temperature (°C)	28	30	32
(2) Agitation (rpm)	150	200	250
(3) pH	6.0	6.4	6.8
(4) Glycerol concentration (g/L)	5	7.5	10
(5) Soybean flour concentration (g/L)	5	12.5	20

error. We selected, as the two response variables, biomass and CA concentrations after 48 h, i.e., the time at which the highest CA concentration was obtained. A statistical evaluation of the results was carried out by the Statistica 6.0 statistical program package.

Results and Discussion

Soybean Flour and Glycerol as Nitrogen and Carbon Sources

The main results obtained by *Streptomyces* DAUFPE 3060 fermentations according to the fractional factorial design are listed in Table 2.

The effect of different combinations of the concentrations of the nitrogen source (SF) and the carbon source (glycerol) at different pH values on CA production after 48 h are summarized in Fig. 1. It is noteworthy that the two highest values of CA concentration (494 and 129 mg/L) are located on the top face of the diagram, which corresponds to pH 6.0, to opposite level combinations (−1 and +1) for glycerol concentration (5.0 and 10 g/L, respectively), and to 20 g/L SF concentration.

A study of the influence of the type of soybean derivatives as nitrogen sources on CA production by *S. clavuligerus* was already performed by Ortiz et al. [10], who utilized two different media, the one containing SF (20 g/L) as nitrogen source and soybean oil (23 g/L) and glycerol (10 g/L) as carbon sources and the other containing soy protein isolate (SPI) (20 g/L) instead of SF. These authors found that cell growth and CA production were higher in the former medium, which contained more soluble nutrients. According to Chen et al. [8], soybean derivatives, such as soy meal flour and soybean protein hydrolyzates, are excellent components of media for CA production because they contain arginine, the precursor of CA. Teodoro et al. [23], who have recently investigated CA production by *S. clavuligerus* using three different nitrogen sources, specifically 1% of malt extract, 1% of yeast extract, and 2% of commercial soybean derivative (Samprosoy 90NB), observed that

Table 2 Influence of the independent variables on biomass and clavulanic acid production.

Run	Agitation (rpm)	Temperature (°C)	pH	Glycerol (g/L)	Soybean flour (g/L)	Clavulanic acid (mg/L) ^a	Biomass (g/L)
2	250	28	6.0	5.0	5.0	23	1.6
4	250	32	6.0	10	5.0	95	2.2
7	150	32	6.8	5.0	5.0	121	1.9
5	150	28	6.8	10	5.0	39	1.1
12 (C) ^a	200	30	6.4	7.5	12.5	62	2.3
6	250	28	6.8	5.0	20.0	73	5.3
9 (C)	200	30	6.4	7.5	12.5	62	2.4
1	150	28	6.0	10	20.0	129	4.1
8	250	32	6.8	10	20.0	104	7.6
3	150	32	6.0	5.0	20.0	494	2.8
10 (C)	200	30	6.4	7.5	12.5	63	2.3
11 (C)	200	30	6.4	7.5	12.5	61	2.3

^a Pure error estimated from the replicate runs at the central point (C) was ± 0.54 . All values were statistically significant at 95% confidence level

Fig. 1 Cubic plot of the average concentration of clavulanic acid at different levels of pH, soybean flour concentration, and glycerol concentration according to the fractional factorial design of Table 1

cell growth was favored by the large nitrogen source availability to the detriment of CA production.

The results obtained in the present work demonstrate that the use of SF (20 g/L) as nitrogen source in mixture with 5.0 g/L glycerol as the only carbon source, i.e. a carbon source level quite lower than that used by Ortiz et al. [10], was enough to guarantee satisfactory production of CA. The main potential of these results arises from the fact that SF is a raw material about five times cheaper (US\$ 0.43 kg⁻¹) than the SPI (US\$ 2.15 kg⁻¹) (rates of 2006) [10]. Even taking into account that the nitrogen content of SF is about half that of SPI, the use of SF is technically and economically preferable for CA production under these fermentation conditions.

Influence of the Independent Variables on the Clavulanic Acid Fermentation

The contrast values calculated for all the five variables by the selected fractional factorial design are given in Table 3. All the contrasts were statistically significant at the 95% confidence level. The main effects of temperature (1) and SF concentration (5) as well as their interaction (1–5) were significant and positive, thereby indicating that the increment of anyone of them resulted in a corresponding increase in the CA concentration. On the contrary, the effects of the others variables and the interaction 1–3 were all significant and negative, the most important being that shown by the agitation (2).

As shown in Fig. 2, the run 3, performed at 150 rpm, 32°C, pH 6.0, 5.0 g/L glycerol, and 20 g/L SF, exhibited by far the highest production of CA (494 mg/L) with respect to the other conditions, whereas the highest biomass growth (7.6 g/L) was observed with run 8 performed at highest levels of agitation (250 rpm) and glycerol concentration (10 g/L).

On the basis of these results, we focused in study on the simultaneous effects exerted by temperature and agitation because of their well-known importance in the scale-up of bench-scale results to the industrial scale. To this purpose, we considered together all the runs carried out under the same conditions of temperature (32°C) and agitation (150 rpm), which yielded an average maximum CA concentration of 308 mg/L. Most of the studies reported in the literature did not take into consideration this interaction, simply investigating separately the effects of temperature

Table 3 Contrast values calculated according to the 2^{5-2} fractional design for the concentration of clavulanic acid by *Streptomyces* DAUFPE 3060 fermentation.

Variables and interactions	Contrasts ^a
(1) Temperature (°C)	249
(2) Agitation (rpm)	-211
(3) pH	-164
(4) Glycerol concentration (g/L)	-150
(5) Soybean flour concentration (g/L)	220
Interaction 1–3	-134
Interaction 1–5	95

^a Pure error estimated from the replicate runs at the central point (C) was ± 0.54 . All values were statistically significant at 95% confidence level.

and agitation in the ranges 28–30°C and 200–250 rpm [7–10, 20, 23, 24], respectively. The values of temperature and agitation that ensured the highest production of CA in this study were out of these ranges, hence confirming the importance of a combined investigation of these two variables by a factorial design rather than through a step-by-step variation protocol.

Regression analysis of the fractional factorial design in Table 4 shows that both temperature and soybean flour concentration were significant at the probability levels of 95% and 97% for CA production, respectively, and that they were the most important independent variables. This table also shows the values of the regression coefficients, which were calculated by the following first-order equation:

$$CA = 106.71 + 65.05x_1 - 55.21x_2 - 42.78x_3 - 39.10x_4 + 57.57x_5$$

where CA is the CA concentration and x_i are the variable terms. The model explained 90% of the variability data ($R^2=0.90$), and its statistical significance was also confirmed by the

Fig. 2 Representation of the relationship between biomass and CA concentrations obtained after 48 h of *Streptomyces* DAUFPE 3060 fermentations carried out according to the fractional factorial design of Table 1

Table 4 Fractional factorial design regression results for clavulanic acid production.

Term	Intercept	Independent variables				
		Temperature (°C)	Agitation (rpm)	pH	Glycerol concentration (g/L)	SF concentration (g/L)
Coefficient	106.71	65.05	−55.21	−42.78	−39.10	57.57
t value	5.54	2.75	−2.34	−1.81	−1.66	2.44
p value	0.001	0.032	0.060	0.112	0.148	0.050

$$R^2 = 0.90; F = 11.55 > F_{5,6} = 5.01$$

quite high F value (11.55). The model was found to be adequate to fit the data at a probability level of 95%. These results confirm that temperature and soybean flour concentration are the important independent variables governing the CA production by *Streptomyces* DAUFPE 3060.

Fermentations under the Best Conditions

Figure 3 shows the time behavior of the best run (3) performed at 150 rpm, 32°C, pH 6.0, 20 g/L SF, and 5.0 g/L glycerol. The CA production fermentation was shown to be dependent on the fermentation time. In fact, the maximum CA concentration (494 mg/L) was obtained after 48 h, likely due to conditions of low carbon source availability (5 g/L glycerol) at the beginning of fermentation. Because of the lack of carbon source, after this period the microorganism grew utilizing soybean proteins, thus releasing mainly amino acids and other compounds [25, 26]. The consequent release of NH_3 and other byproducts progressively increased the pH (results not shown) and was likely responsible for CA degradation. Resuming, according to this behavior, too long fermentation times should be avoided in an industrial process to get satisfactory performance.

Fig. 3 Time course of the concentrations of biomass (empty square), glycerol (open triangle), and clavulanic acid (filled circle) during run 3 in shake flasks

These results agree with those of Mayer and Deckwer [27], who observed that growth and production occurred simultaneously in the trophophase when a soluble nitrogen source was utilized. The CA production associated to cell growth was also observed by Lynch and Yang [25] and Kenji et al. [28] both utilizing soybean derivatives as nitrogen sources. On the other hand, Teodoro et al. [23] observed that CA synthesis occurred during the trophophase but the highest CA concentration was obtained during the stationary phase. Moreover, they demonstrated that the concentration of the nitrogen source has dramatic influence on the production of CA because, at high nitrogen levels, it is inhibited by the ammonia released due to the catabolism of amino acids [29].

The maximum CA production (494 mg/L after 48 h) obtained in shake flasks with *Streptomyces* DAUFPE 3060 (Fig. 3) was higher than that obtained in the same medium containing SPI instead of SF (338 mg/L after 108 h) [10] or soluble starch instead of glycerol (458 mg/L of CA after 96 h) [21]. However, it was lower than that observed by Ortiz et al. [10] and Maranesi et al. [20] using *S. clavuligerus* in mixtures of SF, soybean oil, and glycerol (698–753 mg/L) after a much longer time (130–132 h). The main difference between these results was likely due to the different carbon sources employed. The use in this work only of glycerol as a carbon source made the growth and the CA production very quick, whereas the very slow β -oxidation of fatty acids was likely to be the main metabolic route after the complete glycerol uptake in the work of those authors.

Higher CA production (672 mg/L) after 72 h was reported for *S. clavuligerus* under optimum conditions using soy meal powder, glycerol, and ornithine [18]. However, this medium is much more expensive than the soybean flour and likely would be unsuitable for the scale-up to industrial purposes.

Glycerol exhaustion occurred between 24 and 48 h, but never was it complete, and the biomass reached its maximum value (4.7 g/L) after 96 h. The yield of cell mass on consumed substrate ($Y_{x/s}$) was 0.26 g/g and that of the product ($Y_{p/s}$) was 64.3 mg/g, which means that, under the conditions adopted in this work, the yield of CA on produced biomass ($Y_{p/x}=247$ mg/g) was about two orders of magnitude higher than that determined by Lynch and Yang [25].

These promising results suggested performing a triplicate fermentation in stirred tank reactor under conditions as much as possible similar to the best ones in shake flasks. As expected, the results of these fermentations (Fig. 4) were quite better than those obtained in

Fig. 4 Time course of the concentrations of biomass (empty square), glycerol (open triangle) and clavulanic acid (filled circle) during fermentation in stirred tank reactor

flasks, likely because of better oxygen transfer in the fermenter. In fact, the maximum CA concentration (790 mg/L) after 48 h was about 60% higher and the maximum cell concentration about 2.5-fold that obtained in flasks. Finally, glycerol was completely consumed after only 120 h.

Conclusions

The influence of some process variables, specifically temperature, pH, agitation, and soybean flour and glycerol concentrations, on the CA production by the new strain *Streptomyces* DAUFPE 3060 has been investigated using a 2^{5-2} fractional factorial design. The results collected in this study demonstrated that soybean flour concentration and temperature were the variables that most influenced the CA concentration. This strain exhibited, in the cheap medium selected for this work (20 g/L of soybean flour and 5.0 g/L of glycerol), a promising and particularly fast CA production (494 mg/L after 48 h) with respect to *S. clavuligerus*, the species commonly used for this purpose. When the fermentation was carried out under the best conditions in a fermenter, the maximum CA concentration (790 mg/L) after 48 h was about 60% higher and the maximum cell concentration about 2.5-fold that obtained in flasks. Further work on additional variables is needed to optimize this process and scaling up it for industrial purposes.

Acknowledgement The authors gratefully acknowledge the financial support of the Brazilian Research Funding Institution FAPESP (process no. 05/60158-0).

References

1. Sánchez, S., & Olison, B. (2005). *Current Opinion in Microbiology*, 8, 229–233. doi:10.1016/j.mib.2005.04.016.
2. Elander, R. P. (2003). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 385–392.
3. Haginaka, J., Nakagawa, T., & Uno, T. (1981). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 29, 3334–3341.
4. Baggaley, K. H., Brown, A. G., & Schofield, C. J. (1997). *Natural Product Reports*, 14, 309–333. doi:10.1039/np9971400309.
5. Watve, M. G., Shejval, V., Sonawane, C., Rahalkar, M., Matapurkar, M., Shouche, Y., et al. (2000). *Current Science*, 78, 1535–1542.
6. Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., & Bhole, B. D. (2001). *Archives of Microbiology*, 176, 386–390. doi:10.1007/s002030100345.
7. Gouveia, E. R., Baptista-Neto, A., Badino-Jr, A. C., & Hooka, C. O. (2001). *Biotechnology Letters*, 23, 157–161. doi:10.1023/A:1010356231673.
8. Chen, K. C., Lin, Y. H., Tsai, C. M., Hsieh, C. H., & Houn, J. Y. (2002). *Biotechnology Letters*, 24, 455–458. doi:10.1023/A:1014553109425.
9. Kirk, S., Avignone-Rossa, C. A., & Bushell, M. E. (2000). *Biotechnology Letters*, 22, 1803–1809. doi:10.1023/A:1005670603596.
10. Ortiz, S. C. A., Hokka, C. O., & Badino-Jr, A. C. (2007). *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1071–1077. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.08.009.
11. Bruns, R. E., Scarminio, I. S., & Barros-Neto, B. (2006). *Statistical design—Chemometrics*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
12. Saudagar, P. S., & Singhal, R. S. (2007). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136, 345–359. doi:10.1007/s12010-007-9030-x.
13. Bersanetti, P. A., Almeida, R. M. R. G., Barboza, M. M. L., Araújo, G. C., & Hokka, C. O. (2005). *Biochemical Engineering Journal*, 23, 31–36. doi:10.1016/j.bej.2004.10.007.
14. Rosa, J. C., Neto, A. B., Hokka, C. O., & Badino, A. C. (2005). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 27, 99–104. doi:10.1007/s00449-004-0386-9.
15. Sircar, A., Sridhar, P., & Das, P. K. (1998). *Process Biochemistry*, 33, 283–289. doi:10.1016/S0032-9592(97)00058-7.

16. Lee, S. D., Park, S. W., Oh, K. K., Hong, S. I., & Kim, S. W. (2002). *Letters in Applied Microbiology*, 34, 370–375. doi:[10.1046/j.1472-765X.2002.01102.x](https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01102.x).
17. Kim, I. C., Kim, C. H., Hong, S. I., & Kim, S. W. (2001). *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17, 869–872. doi:[10.1023/A:1013895617923](https://doi.org/10.1023/A:1013895617923).
18. Wang, Y. H., Yang, B., Ren, J., Dong, M. L., Liang, D., & Xu, A. L. (2005). *Process Biochemistry*, 40, 1161–1166. doi:[10.1016/j.procbio.2004.04.010](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.010).
19. Lawrence, C. H. (1956). *Canadian Journal of Botany*, 34, 44–47. doi:[10.1139/b56-005](https://doi.org/10.1139/b56-005).
20. Maranesi, G. L., Baptista-Neto, A., Hokka, C. O., & Badino-Jr, A. C. (2005). *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 509–514. doi:[10.1007/s11274-004-2393-z](https://doi.org/10.1007/s11274-004-2393-z).
21. Bird, A. E., Bellis, J. M., & Gasson, B. C. (1982). *Analyst (London)*, 107, 1241–1245. doi:[10.1039/an9820701241](https://doi.org/10.1039/an9820701241).
22. Hae Bok, S., & Demain, A. L. (1977). *Analytical Biochemistry*, 81, 18–20. doi:[10.1016/0003-2697\(77\)90593-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90593-0).
23. Teodoro, J. C., Baptista-Neto, A., Cruz-Hernández, I. L., Hokka, C. O., & Badino-Jr, A. C. (2006). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 450–455. doi:[10.1007/s00253-005-0273-6](https://doi.org/10.1007/s00253-005-0273-6).
24. Bushell, M. E., Kirk, S., Zhao, H. J., & Avignone-Rossa, C. A. (2006). *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 149–157. doi:[10.1016/j.enzmtec.2006.01.017](https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2006.01.017).
25. Lynch, H. C., & Yang, Y. (2004). *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 48–54. doi:[10.1016/j.enzmtec.2003.08.003](https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2003.08.003).
26. Roubos, J. A., Krabben, P., de Wtarn, L., Babuska, R., & Heijnen, J. J. (2002). *Biotechnology Progress*, 18, 451–457. doi:[10.1021/bp020294n](https://doi.org/10.1021/bp020294n).
27. Mayer, A. F., & Deckwer, W. D. (1996). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 41–46. doi:[10.1007/s002530050646](https://doi.org/10.1007/s002530050646).
28. Kenji, I., Viet Hung, T., Chan Lee, H., Liou, K., Shin, C. H., Yoon, Y. J., et al. (2006). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 590–596.
29. Romero, J., Liras, P., & Martin, J. F. (1984). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20, 318–325. doi:[10.1007/BF00270593](https://doi.org/10.1007/BF00270593).

Optimization of clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 by response surface methodology

Journal:	<i>Engineering in Life Science</i>
Manuscript ID:	elsc.200900104
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	17-Nov-2009
Complete List of Authors:	Viana Marques, Daniela; University of São Paulo, Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology Cunha, Márcia C.; Federal University of Pernambuco, Laboratory of Biotechnology, LIKA Araújo, Janete; Federal University of Pernambuco, Department of Antibiotics Lima-Filho, José; Federal University of Pernambuco, Laboratory of Biotechnology, LIKA Converti, A.; University of Genoa, Chemical and Process Engineering Pessoa-Júnior, Adalberto; University of São Paulo, Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology Porto, Ana Lúcia F; Federal Rural University of Pernambuco, Department of Animal Morphology and Physiology
Keywords:	Clavulanic acid , Response Surface Methodology , Production optimization, <i>Streptomyces</i> sp.

Optimization of clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 by response surface methodology

Daniela Viana Marques¹, Márcia Carneiro Cunha², Janete Araújo³, José Lima-Filho²,
Attilio Converti⁴, Adalberto Pessoa-Júnior¹ and Ana Lúcia Figueiredo Porto⁵

¹Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, University of São Paulo, Av.
Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 16, Cidade Universitária, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

²Laboratory of Biotechnology, LIKA, Federal University of Pernambuco, Campus
Universitário, 50670-901 Recife, PE, Brazil

³Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Campus Universitário, 50670-
901 Recife, PE, Brazil

⁴Correspondence: Department of Chemical and Process Engineering, University of Genoa,
Via Opera Pia 15, 16145 Genoa, GE, Italy. Tel.: +39 010 3532584; fax: +39 010 3532586.
E-mail adress: converti@unige.it.

⁵Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of
Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900 Dois Irmãos, PE, Brazil

Keywords: Clavulanic acid /Response Surface Methodology /Production optimization /
Streptomyces sp.

Running title: Optimization of clavulanic acid production.

Abstract

Clavulanic acid is a β -lactam antibiotic which has a potent β -lactamase inhibiting activity. In order to optimize its production by the new isolate *Streptomyces* DAUFPE 3060, the influence of two independent variables, temperature and soybean flour concentration, on clavulanic acid and biomass concentrations was investigated in 250 mL-Erlenmeyers according to a 2^2 central composite design. To this purpose, temperature and soybean flour (SF) concentration were varied in the ranges 26-34°C and 10-50 g/L, respectively, and the results evaluated utilizing the Response Surface Methodology. The experimental maximum production of clavulanic acid (629 mg/L) was obtained at 32°C and 40 g/L SF after 48 h, while the maximum biomass concentration (3.9 g/L) at 30°C and 50 g/L soybean flour, respectively. These values are satisfactorily close to those (640 mg/L and 3.75 g/L, respectively) predicted by the model, thereby demonstrating the validity of the mathematical approach adopted in this study.

1 **Introduction**

Clavulanic acid (CA) is a β -lactamase inhibitor which is administered in combination with penicillin group antibiotics to overcome certain types of antibiotic resistance. Despite sharing the β -lactam ring typical of penicillins, CA has low intrinsic antimicrobial activity. However, the similarity in chemical structure allows it to act as a competitive inhibitor of β -lactamases secreted by certain bacteria to confer resistance to β -lactam antibiotics [1]. The combined action as β -lactamase inhibitor and antibacterial agent makes clavulanic acid very important both clinically and economically [2].

The pharmacokinetic characteristics of CA supported the development of combined therapy regimens with amoxicillin and ticarcillin, and the therapeutic success of these combination drugs is well recognized. CA formulations have been used widely and effectively in the treatment of a broad range of clinical infections for nearly 20 years [3].

Nowadays, the β -lactam antibiotics, particularly penicillins and cephalosporins, represent the world's major biotechnology products with worldwide dosage sales at around 65 % of the total world market of antibiotics [4]. Since the first amoxicillin/CA generics entered the US market in 2002, Augmentin's US sales plummeted from a peak of \$1.6 billion in 2001 to only \$107 million in 2004, representing 93 % sales erosion in only three years [5].

Streptomyces is the largest antibiotic-producing genus in the discovered microbial world. Species belonging to this genus still remain an important source of antibiotics. In recent years, screening of natural products, particularly microbial products, has fallen out. Nevertheless, it is becoming increasingly apparent that 99 % of the diverse bacterial species is still unexplored

[4,6,7]. Thus, the discovery of new *Streptomyces* species is a challenge for the improvement of CA production.

However, closer inspection of metabolite production patterns among other producers of CA, clavams, and cephamycin C suggests that a strong selective pressure, rather than mere chance, has created actinomycetes that coproduce CA and a β -lactam antibiotic such as cephamycin C. Among these, several strains of *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces jumonjinensis*, *Streptomyces katsurahamanus*, and an unclassified *Streptomyces* sp. are reported to produce CA [8].

The productivity of microbial metabolites is, in general, closely related to the fermentation process [9-11]. In order to reduce the costs of a bioprocess, it is necessary to develop strains with increased productivity, use inexpensive raw materials, improve filtration properties, perform the process under favorable conditions [1], thus requiring its optimization. Most of previous studies on CA were devoted to the improvement of its production by *S. clavuligerus* [5]. However, there are only a few works that deal with high CA producing mutants of this species or other *Streptomyces* species [12,13] as well as process optimization by statistical design [14].

Statistical design of experiments is a widely used tool for process optimization and control. By a factorial design, the significant factors and their effects can be studied using only a few experiments, thus saving time and reducing the operating costs [15]. Response surface methodology (RSM), originally described by Box and Wilson [16], enables evaluation of the effects of many factors and their interactions on response variables. The main advantage of RSM is the reduced number of experimental runs needed to provide sufficient

information for statistically acceptable results [17]. Therefore, it is less laborious and time-consuming compared to full-factorial experimentation [18].

In a previous study, the influence of the most important process variables on CA production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 was screened using a 2^{5-2} fractional factorial design, and temperature and soybean flour concentration resulted to be the most significant ones [19]. Although the new isolate was not yet characterized, its high performance in CA production with respect to common *S. clavuligerus* strains constituted the main novelty of that study. On the basis of this ground, a 2^2 central composite design combined with RSM was used in this work to select the best values of these two variables able to optimize CA production by the same strain.

2 Materials and methods

2.1 Reagents

Potassium clavulanate from *Streptomyces clavuligerus* was used to obtain the calibration curve needed to determine CA concentration. The imidazole used in the CA determination was provided by Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil). The salts, glycerol, bacto-peptone, malt extract, and yeast extract used to prepare the media were analytical grade reagents.

2.2 Microorganism

The *Streptomyces* spp. DAUFPE 3060 strain was kindly provided by the Microorganism Collection of the Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil. This strain was isolated directly from soil samples. For each collected sample, 3.0 g of soil were diluted in 100 mL of saline solution (0.85 % NaCl) and allowed to stand for 15 min. Three different dilutions (1:10, 1:100 and 1:1000) were prepared using sterile saline solutions in a total volume of 10 mL. According to Lawrence [20], aliquots of 0.1 mL of each dilution were plated using glucose-asparagine-agar (Difco Laboratories, Detroit, MI) at pH 6.5 as selective medium. Plates were incubated at 28 °C and monitored after 48, 72, and 96 h. Representative colonies were selected and streaked on new plates containing this medium. The *Streptomyces* spp. isolate was maintained on malt/yeast extract plates at 4 °C until further use. Preliminary characterization was carried out by optical microscopy by evaluating the morphology of the spore chains, the colony color and the release of pigments in the cultivation medium. The microorganism, which is still at the stage of molecular characterization, was stored in cryotubes (glycerol 10 %, v/v) at -70 °C and used throughout the present work.

2.3 Culture media

The seed medium had the following composition (in g/L distilled water): glycerol, 15; bacto-peptone, 10; malt extract, 10; yeast extract, 1.0; K₂HPO₄, 2.5; MgSO₄·7H₂O, 0.75; MnCl₂·4H₂O, 0.001; FeSO₄·7H₂O, 0.001; and ZnSO₄·7H₂O, 0.001. The pH of the medium was adjusted to 6.8 with NaOH 5.0 M before autoclaving at 121 °C for 15 min. The inoculum medium used in the cultivations, based on that proposed by Maranesi *et al.* [21], had the

following composition (in g/L distilled water): glycerol, 10; soybean flour (SF), 20; K_2HPO_4 , 1.2; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.001; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001, pH 6.8. The composition of the production medium was similar to that used for the inoculum, except for the concentration of glycerol (5.0 g/L) and the SF concentration that was varied according to the selected experimental design.

2.4 Fermentation conditions

Spores of *Streptomyces* spp. DAUFPE 3060 were obtained from colonies grown on solid culture medium in Petri plates. These colonies were withdrawn and grown in liquid culture medium for 96 h. After determination of biomass concentration by dry weight, the spores were lyophilized and stored in glycerol 10 % v/v. The seed culture was prepared by adding the spore suspension (6.6 g/L dry weight) contained in a cryotube (3.0 mL) to 25 mL of seed medium in 250 mL-Erlenmeyer flasks that were incubated in an orbital shaker at 28 °C and 200 rpm for 24 h. Afterward, 250 mL-Erlenmeyer flasks containing 45 mL of inoculum medium were inoculated with 5.0 mL of the seed culture and incubated in an orbital shaker under the same conditions. Then, 5.0 mL aliquots of this suspension with cells at the exponential growth phase (24 h) were transferred to 14 250 mL-Erlenmeyer flasks containing 45 mL of the production medium. The exponential phase was obtained after 24 h. The production runs, which lasted 168 h, were performed in an orbital shaker at 150 rpm at different temperatures, according to the experimental design described later.

2.5 Analytical methods

The fermentation broth was centrifuged at 5500 x g for 20 min at 4 °C, and the cell pellet was washed twice with distilled water and dried to constant weight at 80 °C. The CA concentration in the fermented broth was determined spectrophotometrically by its reaction with imidazole [22]. For this purpose, the increase in the optical density at 311 nm consequent to the formation of the product [1-(8-hydroxy-6-oxo-4-azooct-2-enol)-imidazole] was determined using a spectrophotometer Ultrospec 3000 pro UV/Visible (GE Healthcare, Life Sciences, Uppsala, Sweden). Glycerol concentration was determined according to Hae Bok and Demain [23]. All the analyses were performed in triplicate.

2.6 Experimental design and data analysis

In order to quantify the influence of the selected independent variables, specifically soybean flour concentration (1) and temperature (2), on the responses (concentrations of CA and biomass), a 2^2 central composite design with three-coded levels leading to 14 experiments was used, which contained an imbedded factorial or fractional factorial matrix with center points and star points to allow estimation of the curvature [24]. For the two factors, this design was made up of a full 2^2 factorial design with its four cube points, augmented with six replicates of the central point (all factors at zero level) and four star points, i.e., points with one factor having an axial distance from the center equal to $\pm\alpha$, whereas the other factor at zero level. Being the factorial of the full type, α was equal to $2k^{1/4}$, where k is the number of

factors. Since two factors were adopted in the selected experimental design ($k = 2$), α was chosen to be 1.414 to make this design orthogonal.

For statistical elaboration, the actual values of the independent variables (X_i) were coded according to the equation:

$$x_i = \frac{X_i - X_o}{\Delta X_i} \tag{1}$$

where x_i represents the corresponding coded values, X_o the actual values at the central point, and ΔX_i the step change value.

The range and levels of the variables investigated in this study are given in Tab. 1. Six tests in the central point were performed to estimate the pure error needed for the analysis of variance, to examine the presence of curvature in the response surface, and to investigate the suitability of the proposed models.

Table 1

The concentrations of CA and biomass, taken as dependent variables, were evaluated after 48 h, because previous experiments demonstrated that after this time CA degradation begun. The quadratic model to predict the optimal point was expressed by the equation:

$$\hat{y}_i = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \tag{2}$$

where $\hat{y}_i$ represents the predicted value of the response variable “i”, b_0 is the intercept coefficient, b_i are the linear coefficients, b_{ii} are the quadratic coefficients, b_{ij} are the interaction ones.

The ‘Statistica’ Version 6.0 software (Statsoft, Tulsa, OK) was used for regression and graphical analyses of data. The statistical significance of the regression coefficients was determined by Student’s *t*-test, the second-order model equation was determined by Fischer’s test, and the extent of variance explained by each model was given by the determination coefficient, R^2 . The experimental and predicted values were compared in order to determine the validity of the models. The effects of unexplained variability in the observed response due to extraneous factors were minimized by randomizing the order of experiments [25].

Optimum conditions for the CA production in terms of soybean flour concentration and temperature were identified using the predictive equations (Eq. 2) in the Response Surface Methodology (RSM).

3 Results and discussion

3.1 Experimental design and optimization by RSM

The results of a first attempt to point out the main variables influencing the CA production by *Streptomyces* spp. DAUFPE 3060 were already discussed in previous work [19]. For this purpose, the effects of temperature, agitation intensity, pH, glycerol and soybean flour (SF) concentrations were investigated using a 2^{5-2} fractional factorial design. The regression

analysis showed that both SF concentration and temperature were significant for CA production at probability levels of 95 and 97%, respectively, thereby proving the mostly influencing independent variables. However, the simultaneous variations of five variables in that effort did not enable us to predict the optimum levels of them, but only suggested ranges of temperature and SF concentration within which subsequent optimization should be performed. This is the objective of the present optimization work.

The main results obtained by *Streptomyces* DAUFPE 3060 fermentations according to the 2^2 central composite design selected for this study are listed in Tab. 2. Experiments were planned so as to obtain quadratic models able to describe the clavulanic acid and biomass concentrations as simultaneous functions of temperature and SF levels.

Table 2

The maximum CA production (629 mg/L) was achieved at 32 °C and SF = 40 g/L (run 4). Similarly, the maximum biomass concentration (3.9 g/L) was observed at SF = 50 g/L and 30 °C (run 6).

The experimental data of Table 2 were then used to make regression analyses to fit both responses. The following equations, where the variables take their coded values, express the best models for CA and biomass concentrations, respectively:

$$\hat{y}_1 = 566.67 + 127.32 x_1 - 84.15 x_1^2 + 33.87 x_2 - 10.89 x_2^2 - 1.00 x_1 x_2 \quad (3)$$

$$\hat{y}_2 = 3.30 + 0.75 x_1 - 0.31 x_1^2 + 0.21 x_2 - 0.41 x_2^2 - 0.10 x_1 x_2 \quad (4)$$

where $\hat{y}_1, \hat{y}_2$ and x_1 are CA, biomass and SF concentrations, while x_2 is temperature.

The simultaneous effects of temperature and SF concentration and their interactions on the CA and biomass productions are better visualized in three-dimensional (3-D) graph projections (Figs. 1 and 2) using the Response Surface Methodology (RSM).

Figs. 1 and 2

Although the statistical analysis revealed positive main linear effects of both independent variables (significant at 95% confidence level) either on CA or biomass concentrations, the effect of SF level was the stronger. However, this behavior was not linear, since the quadratic effects of these variables were also significant. This means that the values of both responses were increased up to a certain level when both variables were increased. As a result, there are two regions of temperature (30-34 °C) and SF concentration (35-45 g/L) where both responses reach maximum values. Although the interaction term (x_1x_2) was not significant, it was kept in the model to minimize the error determination. Simultaneous regression by Eqs. (3) and (4) provided maximum predicted values of CA concentration (640 mg/L) at 33.0 °C and SF = 37.5 g/L, and of biomass concentration (3.75 g/L) at 30.2 °C and SF = 41.8 g/L, respectively. These predicted values are only 1.7 % higher and 3.8% lower than the experimental ones, thus demonstrating the validity of the models employed.

The statistical significance of second-order model equations was confirmed by the F-test analysis of variance (ANOVA) and multiple regression (Tabs. 3 and 4). In fact, the computed F-values (27.08 for $\hat{y}_2$ and 3499 for $\hat{y}_1$) were much greater than the tabulated ones [$F_{(2,11)} =$

11.63 and 14.54, respectively]. Whereas the lack of fit was insignificant for $\hat{y}_2$ [$F = 3.04 < F_{(2,11)}$], that for $\hat{y}_1$, although significant ($F = 25.7$), showed a very low pure error (1.1). In addition, the high values of the determination coefficients ($R^2 = 0.97$ and 0.99 for biomass and CA concentrations, respectively) indicate that the models explained 97-99% of the variability data, and both regressions were statistically significant ($p < 0.0001$) at 95% confidence level.

Tables 3 and 4

3.2 Relationship between CA production and biomass growth

As expected by the above trends, an almost linear relationship should exist between CA and biomass levels (Fig. 3), which demonstrates that this strain is able to produce CA only during its growth. These results agree with those of Mayer and Deckwer [26], who observed that growth and production occurred simultaneously in the trophophase. The CA production associated to cell growth was already detected utilizing soybean derivatives as nitrogen sources [2,27]. On the other hand, other authors observed that CA synthesis occurred during the trophophase, but the highest CA concentration was obtained during the stationary one [28,29].

Figure 3

These results are of particular concern, when compared with those of Neves *et al.* [30], who utilized as industrial inoculum cells at the exponential growth phase after the same time (24 h) and obtained a maximum CA production of about 100 mg/L after a significantly longer time (about 70 h). CA production comparable to that of the present study (672-681 mg/L) was observed with *S. clavuligerus* using 38 g/L soy meal powder, 0.39 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 1.18 g/L ornithine [14].

As suggested by Butterworth [31], soybean proteins are important nutrients for CA production. The effectiveness of SF as a nitrogen source is in accordance with the results of Ortiz *et al.* [32], who observed CA productions in Erlenmeyer flasks increasing from 338 to 698 mg/L when 20 g/L SF substituted 10.9 g/L soybean protein isolate as a nitrogen source. Higher CA levels (up to 1384 mg/L) were obtained in medium containing glycerol and sucrose as carbon sources supplemented with amino acids [33], and in a glycerol-based medium with protein extract of soybean (1178 mg/L) [9].

As far as the effect of temperature is concerned, it is well known that an increase in this parameter stimulates CA production [19], even if it is very difficult to evaluate it, because of the simultaneous occurrence of temperature-dependent CA degradation. In fact, it has recently been demonstrated, in experiments with commercial CA, that an increase in temperature from 15 to 45 °C leads to a corresponding increase in the first-order degradation constant from 0.005 to 0.012 h⁻¹ [34].

3.3 Fermentation under the best conditions

Fig. 4 shows the time behavior of CA production, biomass growth and glycerol consumption during the fermentation that provided the best results (run 4). It should be noticed that the highest cell concentration (5.06 g/L) and CA production (629 mg/L) were both obtained before the complete consumption of glycerol, although after different times (72 and 48 h, respectively). But the most evident result is that the CA concentration rapidly fell after 48 h, as the likely result of higher degradation rate when compared to its production.

Figure 4

Similar CA production simultaneous to growth, achievement of maximum CA concentration and subsequent quick degradation were observed by several authors [26,35,36]. In agreement with these findings, Lynch and Yang observed that the rate of CA degradation during fermentation was comparable to that of its production and that the degradation products could be used by the microorganism for further production of the antibiotic [2]. It was proposed that such degradation could be the result of the action of metabolites or enzymes produced by the strain [27], of compounds in the culture medium such as amino acids and other inorganic materials [37] or of the autolysis resulting from the rising pH, microbial decomposition, and re-metabolization [38].

4 Conclusions

These results on the whole suggest that a rigorous control of the residence time would be a fundamental requisite in scaling-up an industrial process for continuous CA production by the

new isolate *Streptomyces* DAUFPE 3060. The next effort in this direction will deal with the attempt to carry out this process in a bench-scale fermenter.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Brazilian Research Funding Institution FAPESP (process n. 05/60158-0).

References

- [1] P. S. Saudagar, S.A. Survase, R.S. Singhal, Clavulanic Acid: A Review, *Biotechnol Adv* **2008**, 26, 335–335.
DOI:10.1016/j.biotechadv.2008.03.002.
- [2] H.C. Lynch, Y. Yang, Degradation Products of Clavulanic Acid Promote Clavulanic Acid Production in Cultures of *Streptomyces clavuligerus*, *Enzyme Microb Technol* **2004**, 34, 48–54.
DOI:10.1016/j.enzmictec.2003.08.003.
- [3] J. Finlay, L. Miller, J.A. Poupard, A Review of the Antimicrobial Activity of Clavulanate, *J Antimicrob Chemother* **2003**, 52, 18-23.
DOI: 10.1093/jac/dkg286.
- [4] R. P. Elander, Industrial Production of β -lactam Antibiotics, *Appl Microbiol Biotechnol* **2003**, 61, 385-392.
DOI: 10.1007/s00253-003-1274-y.
- [5] M.G. Watve, R. Tickoo, M. M. Jog, B. D. Bhole, How Many Antibiotics are Produced by the Genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* **2001**, 176, 386-390.
DOI:10.1007/s002030100345.

- [6] S. Sánchez, B. Olson, Microbial Diversity - the Bright and Promising Future of Microbial Manufacturing, *Curr Opin Microbiol* **2005**, 8, 229-233.
DOI:10.1016/j.mib.2005.04.016.
- [7] M.G. Watve, V. Shejval, C. Sonawane, M. Rahalkar, M. Matapurkar, Y. Shouche, M. Patole, N. Phadnis, A. Champhekar, K. Damle, S. Karandikar, V. Kshirsagar, M. Jog, The 'K' Selected Oligophilic Bacteria: a Key to Uncultured Diversity? *Curr Sci* **2000**, 78, 1535–1542.
DOI: 10.1007/s002030100345.
- [8] S.E. Jensen, A.S. Paradkar, Biosynthesis and Molecular Genetics of Clavulanic Acid, *Antonie van Leeuwenhoek* **1999**, 75, 125–133.
DOI: 10.1023/A:1001755724055.
- [9] E. R.Gouveia, A. Baptista-Neto, A. C. Badino-Jr, C. O. Hooka, Optimisation of Medium Composition for Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus*, *Biotechnol Lett* **2001**, 23, 157–161.
DOI:10.1023/A:1010356231673.
- [10] K.C. Chen, Y. H. Lin, C. M.Tsai, C. H. Hsieh, J. Y. Houng, Optimization of Glycerol Feeding for Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus* with Glycerol Feeding, *Biotechnol Lett* **2002**, 24, 455–458.
DOI:10.1023/A:1014553109425.
- [11] S. Kirk, C. A. Avogmpme-Rossa, M. E. Bushell, Growth Limiting Substrate Affects Antibiotic Production and Associated Metabolic Flues in *Streptomyces clavuligerus*, *Biotechnol Lett* **2000**, 22, 1803–1809.
DOI:10.1023/A:1005670603596.

- [12] S. D. Lee, S. W. Park, K. K. Oh, S. I. Hong, S. W. Kim, Improvement for the Production of Clavulanic Acid by Mutant *Streptomyces clavuligerus*, *Lett Appl Microbiol* **2002**, 34, 370–375.
DOI:10.1046/j.1472-765X.2002.01102.x.
- [13] I. C. Kim, C. H. Kim, S. I. Hong, S. W. Kim, Fed-batch Cultivation for the Production of Clavulanic Acid by an Immobilized *Streptomyces clavuligerus* Mutant, *World J Microbiol Biotechnol* **2001**, 17, 869–872.
DOI:10.1023/A:1013895617923.
- [14] Y. H. Wang, B. Yang, J. Ren, M. L. Donga, D. Liang, A. L. Xu, Optimization of Medium Composition for the Production of Clavulanic Acid by *Streptomyces clavuligerus*, *Proc Biochem* **2005**, 40, 1161–166.
DOI:10.1016/j.procbio.2004.04.010.
- [15] R. E. Bruns, I. S. Scarminio, B. B. Neto, *Statistical Design – Chemometrics*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, **2006**.
- [16] G. E. P. Box, K. B. Wilson, On the Experimental Attainment of Optimum Conditions, *J Roy Statist Soc B* **1951**, 13, 1–45.
- [17] B. S. Chu, S. Y. Quek, B. S. Baharin, Optimization of Enzymatic Hydrolysis for Concentration of Vitamin E in Palm Fatty Acid Distillate, *Food Chem* **2003**, 80, 295–302.
DOI:10.1016/S0308-8146(02)00178-4.
- [18] C. H. Tan, H. M. Ghazali, A. Kuntom, C. P. Tan, A. A. Ariffin, Extraction and Physicochemical Properties of Low Free Fatty Acid Crude Palm Oil, *Food Chem* **2009**, 113, 645–650.
DOI:10.1016/j.foodchem.2008.07.052.

- [19] D.A. Viana, M.N. Carneiro-Cunha, J.M. Araújo, B. Barros-Neto, J.L. Lima-Filho, A. Converti, A. Pessoa-Júnior, A.L.F. Porto, Screening of Variables Influencing the Clavulanic Acid Production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 Strain, *Appl Biochem Biotechnol* **2009**, online available.
DOI: 10.1007/s12010-009-8671-3.
- [20] C. H. Lawrence, A Method of Isolating Actinomycetes from Scabby Potato Tissue and Soil with Minimal Contamination, *Can J Bot* **1956**, 34, 44-47.
DOI:10.1139/b56-005.
- [21] G. L. Maranesi, A. Baptista-Neto, C. O. Hokka, A. C. Badino-Jr, Utilization of Vegetable Oil in the Production of Clavulanic Acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, *World J Microb Biotechnol* **2005**, 21, 509–514.
DOI:10.1007/s11274-004-2393-z.
- [22] A. E. Bird, J. M. Bellis, B. C. Gasson, Spectrophotometric Assay of Clavulanic Acid by Reaction with Imidazole, *Analyst* **1982**, 107, 1241–1245.
DOI:10.1039/an9820701241.
- [23] S. Hae Bok, A. L. Demain, An Improved Colorimetric Assay for Polyols, *Anal Biochem* **1977**, 81, 18-20.
DOI:10.1016/0003-2697(77)90593-0.
- [24] Q. H. Chen, G. Q. He, A. M. A. Mokhtar, Optimization of Medium Composition for the Production of Elastase by *Bacillus* sp. EL31410 with Response Surface Methodology, *Enzyme Microb Technol* **2002**, 30, 667-672.
DOI:10.1016/S0141-0229(02)00028-5.

- [25] C. Liyana-Pathirana, F. Shahidi, Optimization of Extraction of Phenolic Compounds from Wheat using Response Surface Methodology, *Food Chem* **2005**, 93, 47–56.
DOI:10.1016/j.foodchem.2004.08.050.
- [26] A. F. Mayer, W. D. Deckwer, Simultaneous Production and Decomposition of Clavulanic Acid during *Streptomyces clavuligerus* Cultivation, *Appl Microbiol Biotechnol* **1996**, 45, 41–46.
DOI:10.1007/s002530050646.
- [27] I. Kenji, T. V. Hung, H. C. Lee, K. Liou, C. H. Shin, Y. J. Yoon, J. K. Sohng, Degradation of Clavulanic Acid during the Cultivation of *Streptomyces clavuligerus*; Instability of Clavulanic Acid by Metabolites and Proteins from the Strain, *J Microbiol Biotechnol* **2006**, 16, 590–596.
- [28] J. C. Teodoro, A. Baptista-Neto, I. L. Cruz-Hernández, C. O. Hokka, A. C. Badino-Jr, Influence of Feeding Conditions on Clavulanic Acid Production in Fed-Batch Cultivation with Medium Containing Glycerol, *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, 72, 450–455.
DOI:10.1007/s00253-005-0273-6.
- [29] A. Baptista Neto, D. B. Hirata, L. C. M. Cassiano Filho, C. Bellão, A. C. Badino Jr, C. O. Hokka, A Study on Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus* in Batch, Fed-Batch and Continuous Processes, *Braz J Chem Eng* **2005**, 22, 557–563.
DOI: 10.1590/S0104-66322005000400008.
- [30] A. A. Neves, L. M. Vieira, J. C. Menezes, Effect of Preculture Variability on Clavulanic Acid Fermentation, *Biotechnol Bioeng* **2001**, 72, 628–633.
DOI: 10.1002/1097-0290(20010320)72:6<628::AID-BIT1028>3.0.CO;2-L.

- [31] D. Butterworth, Clavulanic Acid: Properties Biosynthesis, and Fermentation, in *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, ed by Vandamme EJ. Marcel Dekker, New York, pp 225–235, **1984**.
- [32] S. C. A. Ortiz, C. O. Hokka, A. C. Badino-Jr, Utilization of Soybean Derivatives on Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus*, *Enzyme Microb Technol* **2007**, 40, 1071–1077.
DOI:10.1016/j.enzmictec.2006.08.009.
- [33] P. S. Saudagar, R. S. Singhal, A Statistical Approach using L25 Orthogonal Array Method to Study Fermentative Production of Clavulanic Acid by *Streptomyces clavuligerus* MTCC 1142, *Appl Biochem Biotechnol* **2007**, 136, 345–359.
DOI:10.1007/s12010-007-9030-x.
- [34] V. C. Santos, J. F. Brandão Pereira, R. Brandão Haga, C. O. Rangel-Yagui, J. A. Couto Teixeira, A. Converti, A. Pessoa Jr, Stability of Clavulanic Acid under Variable pH, Ionic Strength and Temperature Conditions. A New Kinetic Approach, *Biochem Eng J* **2009**, 45, 89–93.
DOI: 10.1016/j.bej.2009.02.013.
- [35] K. C. Chen, Y. H. Lin, J. Y. Wu, S. C. J. Hwang, Enhancement of Clavulanic Acid Production in *Streptomyces clavuligerus* with Ornithine Feeding, *Enzyme Microb Technol* **2003**, 32, 152–156.
DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00280-6.
- [36] J. Romero, P. Liras, J. F. Martin, Dissociation of Cephamycin and Clavulanic Acid Biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*, *Appl Microbiol Biotechnol* **1984**, 20, 318–325.
DOI:10.1007/BF00270593.

- [37] J. A. Roubos, P. Krabben, W. T. A. M.de Laat, R. Babuska, J. J. Heijnen, Clavulanic Acid Degradation in *Streptomyces clavuligerus* Fed-Batch Cultivations, *Biotechnol. Prog* **2002**, 18, 451–457.
DOI:10.1021/bp020294n.
- [38] W. S. Hu, A. F. Brana, A. L. Demain, Carbon Source Regulation of Cephem Antibiotic Production by Resting Cell of *Streptomyces clavuligerus* and its Reversal by Protein Synthesis Inhibitors, *Enzyme Microb Technol* **1984**, 6, 155–160.
DOI: 10.1016/0141-0229(84)90023-1.

Captions of figures

Figure 1. Three-dimensional response surface contour plot indicating the simultaneous effects of soybean flour concentration and temperature on CA concentration

Figure 2. Three-dimensional response surface contour plot indicating the simultaneous effects of soybean flour concentration and temperature on biomass concentration

Figure 3. Relationship between biomass and CA concentrations obtained after 48 h of *Streptomyces* DAUFPE 3060 fermentations carried out according to the 2² central composite design of Table 1

Figure 4. Time course of the concentrations of biomass (□), glycerol (△) and clavulanic acid (●) in shaken flasks. Temperature: 32 °C; Soybean flour concentration: 40 g/L; Glycerol concentration: 5.0 g/L; 150 rpm; pH 6.0

Table 1. Level combinations of the two independent variables (temperature and SF concentration) used in the 2^2 central composite design and results of the selected responses (clavulanic acid and biomass concentrations).

Run	Independent variables		*Responses	
	Temperature (°C)	SF (g/L)	Clavulanic acid (mg/L)	Biomass (g/L)
14 (C)	30	30	567	3.4
7	26	30	501	2.4
12 (C)	30	30	566	3.3
10 (C)	30	30	567	3.1
5	30	10	221	1.8
6	30	50	582	3.9
2	32	20	377	2.0
13 (C)	30	30	567	3.5
11 (C)	30	30	568	3.4
4	32	40	629	3.3
9 (C)	30	30	565	3.1
8	34	30	595	2.9
3	28	40	562	3.0
1	28	20	306	1.3

*All values were statistically significant at 95% confidence level.

Table 2. Level combinations of the two independent variables (temperature and SF concentration) used in the 2² central composite design and results of the selected responses (clavulanic acid and biomass concentrations).

Independent variables			*Responses	
Run	Temperature (°C)	SF (g/L)	Clavulanic acid (mg/L)	Biomass (g/L)
14 (C)	30	30	567	3.4
7	26	30	501	2.4
12 (C)	30	30	566	3.3
10 (C)	30	30	567	3.1
5	30	10	221	1.8
6	30	50	582	3.9
2	32	20	377	2.0
13 (C)	30	30	567	3.5
11 (C)	30	30	568	3.4
4	32	40	629	3.3
9 (C)	30	30	565	3.1
8	34	30	595	2.9
3	28	40	562	3.0
1	28	20	306	1.3

*All values were statistically significant at 95% confidence level.

Table 3. Analysis of variance applied to the regression model used for the CA concentration ($R^2 = 0.99$).

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean of square	F-value	Prob>F	Remarks
Model	191287.8	5	38257.55	3499.715	0.000000	Significant
$^+b_1$	129675.7	1	129675.7	121571.0	0.000000	Significant
b_{11}	52286.9	1	52286.9	49019.0	0.000000	Significant
$^{\#}b_2$	9175.8	1	9175.8	8602.3	0.000000	Significant
b_{22}	876.7	1	876.7	821.9	0.000001	Significant
b_{12}	4.0	1	4.0	3.7	0.110567	Not Significant
Residual	87.45297	8	10.93162			
Lack of fit	82.1	3	27.4	25.7	0.001830	Not significant
Pure error	5.3	5	1.1			
Total	191375.2	13				

Independent variables: a1 = SF concentration; $^{\#}2$ = Temperature.

Table 4. Analysis of variance applied to the regression model used for the biomass concentration ($R^2 = 0.97$).

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean of square	F-value	Prob>F	Remarks
Model	6.701311	5	1.340262	27.08752	0.000082	Significant
$^+b_1$	4.454886	1	4.454886	159.1031	0.000056	Significant
b_{11}	0.721154	1	0.721154	25.7555	0.003851	Significant
$^{\#}b_2$	0.364277	1	0.364277	13.0099	0.015430	Significant
b_{22}	1.256539	1	1.256539	44.8764	0.001121	Significant
b_{12}	0.040000	1	0.040000	1.4286	0.285591	Not Significant
Residual	0.395832	8	0.049479			
Lack of fit	0.255832	3	0.085277	3.0456	0.130860	Not Significant
Pure error	0.140000	5	0.028000			
Total	7.097143	13				

Independent variables: $^+1$ = Soybean flour concentration; $^{\#}2$ = Temperature.

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Kinetic and thermodynamic investigation on clavulanic acid formation and degradation during glycerol fermentation by *Streptomyces* DAUFPE 3060

Daniela A. Viana Marques^a, Ricardo P.S. Oliveira^a, Patrizia Perego^b, Ana L.F. Porto^c, Adalberto Pessoa Jr.^a, Attilio Converti^{b,*}

^a Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 16, Cidade Universitária, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Chemical and Process Engineering, University of Genoa, Via Opera Pia 15, 16145 Genoa, GE, Italy

^c Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900 Dois Irmãos, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2009

Received in revised form 5 March 2009

Accepted 6 March 2009

Keywords:

Clavulanic acid

Streptomyces sp.

Thermodynamic parameters

Kinetic parameters

Degradation

Fermentation

ABSTRACT

Clavulanic acid (CA) is a potent inhibitor of β -lactamases, produced by some resistant pathogenic microorganisms, which allows efficient treatment of infectious diseases. The kinetic and thermodynamic parameters of CA production by a new isolate of *Streptomyces* DAUFPE 3060 and its degradation were evaluated. The effect of temperature on the system was investigated in the range 24–40 °C adopting an overall model accounting for (a) the Arrhenius-type formation of CA by fermentation, (b) the hypothetical reversible unfolding of the enzyme limiting the overall metabolism, and (c) the irreversible first-order degradation of CA. The higher rates of CA formation ($k_{CA} = 0.107 \text{ h}^{-1}$) and degradation ($k_d = 0.062 \text{ h}^{-1}$) were observed at 32 and 40 °C, respectively. The main thermodynamic parameters of the three above-hypothesized events were estimated. In particular, the activation parameters of degradation (activation energy = 39.0 kJ/mol; $\Delta H_d^* = 36.5 \text{ kJ/mol}$; $\Delta S_d^* = -219.7 \text{ J/(mol K)}$; $\Delta G_d^* = 103.5 \text{ kJ/mol}$) compare reasonably well with those reported in the literature for similar system without taking into account the other two events.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

β -Lactamase activity in bacteria is responsible for the inactivation of β -lactam antibiotics, and thus for a form of antibiotic resistance in a number of bacteria. Clavulanic acid (CA) inhibits β -lactamase activity in bacteria by inserting its fused bicyclic β -lactam ring into the active site of β -lactamase and rendering it inactive [1]. The reaction of CA with the enzyme is irreversible as the products of the reaction keep attached to the enzyme [2]. Its application in conjunction with penicillin has proven to be successful in the solution of the problem of bacterial resistance to β -lactam antibiotics and makes CA very important both clinically and economically. However, it is known that CA in its crude form is chemically unstable like other β -lactam compounds; therefore, it is degraded during the bacterial cultivation [3,4]. Loss of product during the cultivation process through decomposition is a significant problem for the pharmaceutical industry. Establishment of the destination of the decomposed products of the antibiotic may provide an indication of ways to prevent the losses and thus to reduce costs [2].

To date, only a few studies have been performed on CA degradation, with particular concern to the effect of temperature, which is the main factor modulating this phenomenon [5,6]. Some authors investigated the stability of CA in buffered aqueous solutions at various pHs and temperatures [4–6]; however, only one systematic study dealt with the thermodynamic parameters of CA thermostability [4].

On the contrary, no information is available on the simultaneous formation and degradation kinetics during CA fermentation, with particular concern to the mechanism of degradation and the related kinetic and thermodynamic parameters, which is the objective of this study. To this purpose a new kinetic model is proposed here that takes into account (a) the Arrhenius-type formation of CA, (b) the reversible unfolding of the enzyme limiting the metabolism, and (c) the irreversible first-order degradation of CA.

2. Theory

2.1. Phenomenological model

The model proposed in this study to describe the influence of temperature on the kinetics of clavulanic acid (CA) formation and degradation is based on the hypothesis that the formation of CA from glycerol (G) by *Streptomyces* DAUFPE 3060 fermentation may

* Corresponding author. Tel.: +39 010 3532584; fax: +39 010 3532586.
E-mail address: converti@unige.it (A. Converti).

be modulated by the activity of one enzyme limiting the overall metabolism, which can be subject to a reversible unfolding:

where E and EI are the active and the unfolded, inactive form of the enzyme, respectively, and k_1 and k_2 (h^{-1}) are the kinetic constants of direct and reverse reactions of this equilibrium, respectively.

Such a general hypothesis was previously proposed with success for completely different biosystems [7–9]. Because the rate of a reaction catalyzed by one enzyme is modulated by both concentrations of the active enzyme and substrate, the rate of CA formation directly depends on this equilibrium. As stressed in previous studies made on different biological systems [7,8,10–13], the so-called “thermodynamic approach” proposes that the rate increase with temperature of every biosystem would be contrasted by the “reversible unfolding” described by Eq. (1), which is responsible for a net decrease of activity. The above kinetic constants can be estimated by semi-log plots of $\ln(\text{CA}/\text{CA}_0)$ versus time, under conditions where direct and reverse reactions do not interfere or interfere as less as possible each other, being CA and CA_0 the CA concentrations after a certain time and at the beginning, respectively.

Once CA has been formed by fermentation, it is subject to irreversible degradation to a generic product (DP) as a consequence of CA instability, according to the temperature-dependent first-order reaction:

where k_d (h^{-1}) is the rate constant of CA degradation.

2.2. Kinetic modeling of CA formation

The above phenomenological model for CA formation can be kinetically described by a combination of the Arrhenius and Eyring equations (see Section 3.7), so as to estimate all the thermodynamic parameters of the system.

At temperature lower than the optimum ($T < T_{\text{opt}}$), it is reasonable to assume that the unfolding of the limiting enzyme is negligible; therefore, the rate constant of CA formation (k_{CA}) coincides with k_1 , whose dependence on temperature can be described by the typical Arrhenius relationship [14]:

$$k_1 = Ae^{-E^*/RT} \quad (3)$$

where E^* is the activation energy of the enzyme unfolding (kJ/mol), A the frequency factor or Arrhenius constant (h^{-1}), R the ideal gas constant (8.3145 J/(mol K)) and T is the absolute temperature (K).

The inactivation equilibrium responsible for the transformation of the active form of the limiting enzyme (E) to its unfolded form becomes predominant at $T > T_{\text{opt}}$, and can be described by the equation:

$$E = \frac{E_0}{1 + K_i} \quad (4)$$

where E_0 is the initial concentration of the enzyme and K_i is the unfolding equilibrium constant.

Applying the Gibb's equation to this equilibrium, we obtain

$$K_i = Be^{-\Delta H_i^\circ/RT} \quad (5)$$

where ΔH_i° is the standard enthalpy variation of the unfolding equilibrium and

$$B = e^{\Delta S_i^\circ/R} \quad (6)$$

an additional pre-exponential factor depending on the standard entropy variation of the same equilibrium (ΔS_i°).

Combining Eqs. (3) and (4)–(6) with the Michaelis–Menten equation adapted to enzyme unfolding, we obtain

$$k_1 = \frac{Ae^{-E^*/RT}}{1 + Be^{-\Delta H_i^\circ/RT}} \quad (7)$$

At low temperature, the second addend at the denominator of this equation becomes negligible, the denominator approaches unit, and Eq. (7) simplifies to the Arrhenius equation. On the contrary, at high temperatures, the contribution of the inactivated form of the enzyme becomes predominant owing to K_i increase, so the unit becomes negligible with respect to the second addend, and Eq. (7) simplifies to:

$$k_1 = \frac{A}{B} e^{(\Delta H_i^\circ - E^*)/RT} \quad (8)$$

2.3. Kinetic modeling of CA degradation

In contrast to CA formation, the kinetics of degradation of CA and similar compounds has widely been explored by several authors [2,5,6,15,16]. Parameters of the kinetic model for CA degradation owing to the irreversible reaction (Eq. (2)), include the reaction rate constant (k_d) and the related activation energy (E_d^*). According to other authors [4–6,16–18], the rate of CA degradation can be modeled as a first-order equation:

$$\frac{d \text{CA}}{dt} = -k_d \text{CA} \quad (9)$$

where t is the time (h).

On the hypothesis that, after maximum CA production, the progressive decrease of its concentration is the result of its degradation without any further formation, a linear regression analysis can be performed on the integrated semi-log form of this equation, utilizing only the experimental data collected after this occurrence:

$$\ln \frac{\text{CA}}{\text{CA}_0} = -k_d t \quad (10)$$

Likewise the direct reaction of the unfolding equilibrium described by Eq. (1), the temperature dependence of k_d can be modeled through the Arrhenius equation as follows:

$$k_d = A_d e^{-E_d^*/RT} \quad (11)$$

3. Materials and methods

3.1. Reagents

Potassium clavulanate from *Streptomyces clavuligerus* was used for the calibration curve needed to determinate the concentration of clavulanic acid (CA). The imidazole used in the CA determination was provided by Sigma–Aldrich (São Paulo, Brazil). The salts, glycerol, bacto-peptone, malt extract, and yeast extract used to prepare the media were analytical grade reagents.

3.2. Microorganism

The *Streptomyces* spp. DAUFPE 3060 strain, which is still under characterization, was kindly provided by the Microorganism Collection of the Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil. The method suggested by Lawrence [19] was used to isolate this strain directly from soil samples. Spores obtained in Petri plates from colonies grown on solid culture medium were collected and grown in liquid culture medium for 96 h. After this cultivation, biomass was determined by dry weight (around 6–7 g/L), lyophilized and stored in cryotubes (glycerol 10%, v/v) at -70°C and used throughout the present work.

3.3. Culture media

The seed medium had the following composition (in g/L distilled water): glycerol, 15; bacto-peptone, 10; malt extract, 10; yeast extract, 1.0; K_2HPO_4 , 2.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.75; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001. After adjusting the pH at 6.8 with NaOH 5.0 M, the medium was autoclaved at 121°C for 15 min.

To prepare the inoculum, we used the medium proposed by Maranesi et al. [20] that had the following composition (in g/L distilled water): glycerol, 10; soybean

flour (SF), 20; K_2HPO_4 , 1.2; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.001; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001, pH 6.8.

The fermentation medium was similar to that used for the inoculum, except for the concentration of SF (40 g/L).

3.4. Fermentation conditions

The seed culture was prepared by adding 3.0 mL of a thick spore suspension (6.0–7.0 g/L dry weight) contained in a cryotube to 100 mL of seed medium in 500-mL Erlenmeyer flasks. After incubation in an orbital shaker at 28 °C and 200 rpm for 24 h, 90 mL of inoculum medium contained in 500-mL Erlenmeyer flasks was inoculated with 10.0 mL of seed culture and incubated in an orbital shaker under the same conditions. This culture (100 mL) was used to inoculate 900 mL of fermentation medium contained in a 3.0-L fermentor, model Z61103CT04 (Applikon, Schiedam, The Netherlands) provided with an electronic device, model ADI1030 (Applikon). All cultivations were carried out at different temperatures (24, 28, 32, 36, and 40 °C), 800 rpm rotational speed and 2.0 vvm aeration, and the pH was automatically controlled at 6.8 ± 0.1 by adding 2.0 M HCl or 2.0 M NaOH solutions. Dissolved oxygen concentration was monitored by a sterilized galvanic electrode, InPro6000 Series (Mettler-Toledo, Novate Milanese, Italy). Two 15-mL samples were daily drawn to determine cell, glycerol and CA concentrations.

3.5. Analytical methods

The fermentation broth was centrifuged at $5500 \times g$ for 20 min at 4 °C, and the cell pellets were washed twice with distilled water and dried to constant weight at 105 °C. To determinate the CA concentration, the spectrophotometric assay described by Bird et al. [21] was used. To this purpose, it was followed at 311 nm the optical density increase due to the release of 1-(8-hydroxy-6-oxo-4-azooct-2-enol)-imidazole from the reaction between CA and imidazole. A Hewlett Packard high-performance liquid chromatographic system was used to analyze glycerol. The system consisted of an HP-1050 Intelligent Auto Sampler, an HP-1047A Refractive Index detector, and an HP-1050 pump. Separation was achieved using a Supelcogel H59304-U column (Sigma-Aldrich Corp., Bellefonte, PA) and eluted with 0.005 M H_2SO_4 at a flow rate of 0.5 mL/min at 50 °C. The calibration curve with 1.0 g/L glycerol concentration was utilized.

3.6. Statistical analysis

All the analyses and experiments were performed in duplicate, and the results expressed as mean values. The errors of experimental data from the mean values were expressed as standard deviation using the Microsoft Excel 2000 program (MapInfo Corporation, Troy, NY, USA) and illustrated as error bars.

3.7. Estimation of thermodynamic parameters

The activation energy of the enzyme unfolding was estimated in this study by regression analysis from the slope of the straight line obtained by plotting $\ln k_1$ versus $1/T$ exclusively under the $T < T_{opt}$ conditions. The other thermodynamic parameters, namely the enthalpy ($\Delta H^\ddagger$) and the entropy ($\Delta S^\ddagger$) of activation, have been estimated by regression analysis of $\ln(k_1/T)$ versus $1/T$ [22] according to the equation of Eyring [23] derived from the transition state theory:

$$\ln \frac{k_1}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (12)$$

where k_B is the Boltzmann constant (1.380658×10^{-23} J/K) and h is the Planck's constant ($6.6260755 \times 10^{-34}$ Js).

On the other hand, plotting according to Arrhenius the values of k_1 collected at $T > T_{opt}$, a new straight line was obtained from whose slope and intercept we estimated by Eq. (8) the values of $\Delta H_i^\ddagger$ and B , and by Eq. (6) that of $\Delta S_i^\ddagger$.

Similarly to the enzyme unfolding, also the activation energy of CA degradation was estimated by regression analysis from the slope of the straight line obtained by plotting $\ln k_d$ versus $1/T$, while $\Delta H_d^\ddagger$ and $\Delta S_d^\ddagger$ were estimated using an equation similar to Eq. (12).

Both the free energies of activation ($\Delta G^\ddagger$ and $\Delta G_i^\ddagger$) and the standard free energy variation of the unfolding equilibrium ($\Delta G_f^\ddagger$) were finally estimated from the corresponding values of enthalpy and entropy by the general equation:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (13)$$

4. Results and discussion

4.1. Fermentation and degradation kinetics

The production clavulanic acid (CA) through glycerol fermentation by *Streptomyces* DAUFPE 3060 has been investigated at temperature varying in the range 24–40 °C so as to estimate the kinetic and thermodynamic parameters of both CA formation and degradation.

Fig. 1. Time course of the concentrations of biomass (▲), glycerol (●) and clavulanic acid (□) by *Streptomyces* DAUFPE 3060 fermentation carried out at 32 °C.

Fig. 1 shows, as an example, the time behaviors of CA production, glycerol consumption and biomass production along the fermentation at 32 °C, which ensured by far the best results. It should be noticed that CA progressively increased up to a maximum value (539 mg/L) after 54 h, corresponding to a volumetric productivity of 10.0 mg/(L h), and then sharply decreased up to its almost complete disappearance after 120 h. This value is close to those reported for batch CA production by *S. clavuligerus* by Ortiz et al. [24] in the same medium supplemented with different levels of the nitrogen source (SF) and soybean oil (9.5–10.8 mg/(L h)) and by Baptista Neto et al. [25] for a medium containing Samprosoy, yeast extract and glycerol (11.7 mg/(L h)). Higher values were obtained in continuous fermentation without (18.3 mg/(L h)) and with cell recycle (221.1 mg/(L h)) [25].

At the same time, glycerol continued to be consumed throughout the whole fermentation, while biomass stopped growing after only 24 h. Several authors reported that the sharp decrease in CA concentration would be the consequence of its instability that becomes stronger as temperature increases [4–6,16,17]. However, no systematic kinetic study has been done, as far as we are aware, on this degradation occurring simultaneously with CA formation by fermentation, which is the main objective of this investigation.

The experimental data of $\ln(CA/CA_0)$ of the fermentation carried out at 32 °C, selected as an example, are plotted versus time in Fig. 2. One should recognize two different phases, the former phase up to 54 h, where CA formation was the main event (straight line on the left), and the latter after 54 h, where CA degradation prevailed (straight line on the right). The slopes of these straight lines referred to all the fermentations allowed estimation, by the models proposed in Section 2, the k_{CA} and k_d values listed in Table 1. A

Fig. 2. Semi-log plots of clavulanic acid formation (■) and degradation (□) during glycerol fermentation by *Streptomyces* DAUFPE 3060 at 32 °C.

Table 1

Main kinetic parameters of glycerol-to-clavulanic acid fermentations by *Streptomyces* DAUFPE 3060 carried out at different temperatures.

	<i>T</i> (°C)				
	24	28	32	36	40
k_{CA} (h ⁻¹) ^a	0.038	0.074	0.107	0.054	0.038
r^2	0.958	0.949	0.981	0.988	0.991
k_d (h ⁻¹) ^b	0.028	0.036	0.043	0.056	0.062
r^2	0.945	0.942	0.961	0.978	0.971
$t_{1/2}$ (h) ^c	24	19	16	12	11

^a Rate constant of clavulanic acid formation. $k_{CA} = k_1$ for $T \leq 32$ °C; $k_{CA} = k_i$ for $T \geq 32$ °C.

^b Rate constant of clavulanic acid degradation.

^c Clavulanic acid half-life.

good correlation was obtained in both cases ($r^2 = 0.9807$ for k_{CA} and $r^2 = 0.9609$ for k_d , respectively).

According to the proposed mechanism, the progressive increase in k_{CA} with temperature, up to a maximum value of 0.107 h^{-1} at $T = 32$ °C, is in accordance with the Arrhenius theory, being the result of the negligible thermal inactivation ($k_2 \ll$) of the enzyme limiting the CA formation with respect to its activity ($k_{CA} \cong k_1$). Beyond 32 °C, on the contrary, k_{CA} progressively decreased as the consequence of the fact that the temperature rise made the kinetic contribution of thermal inactivation predominant ($k_{AC} \cong k_i$). As expected, the kinetic constant of CA degradation (k_d) progressively increased with temperature without interruption from 0.028 h^{-1} at 24 °C to 0.062 h^{-1} at 40 °C, which corresponds to a progressive decrease in the half-life from 24 to 11 h. In other words, after a certain time of the fermentation, CA formation became negligible and its degradation became the predominant phenomenon.

No comparison is possible for k_{CA} , k_1 and k_i constants with literature because of the novelty of the present kinetic approach. Nevertheless, Kenji et al. [15] calculated, for CA degradation in a fermented complex medium containing peptone, trypticase, soy broth and glycerol, a value of k_d at 28 °C and pH 6.5 (0.022 h^{-1}) about 40% lower than that obtained in this study at the same temperature, likely due to CA sensitivity to chemicals such as amino acids and other inorganic materials. A 30% increase was observed when the same medium was submitted three times to heat sterilization. Similarly to our results, Bersanetti et al. [4] observed at pH 7.0 that k_d progressively increased with temperature in a similar fermented medium, and reached values at 30 °C (0.041 h^{-1}) and 40 °C (0.055 h^{-1}) comparable to those of this study. Haginaka et al. [5] observed in aqueous solution at pH 6.7 a practically coincident value of k_d at 35 °C (0.057 h^{-1}) but significantly higher values when temperature was increased.

As far as the possible reasons of CA degradation are concerned, a lot of different hypothesis have been formulated. It was proposed that it would be the result (a) of the action of metabolites or enzymes produced by the strain [15] or compounds in the culture medium such as amino acids and other inorganic materials [16], (b) of the autolysis resulting from the rising pH, microbial decomposition, and re-metabolization [2,6,26], or even (c) of the ability of CA to catalyze its own decomposition, like it occurs with all antibiotics sensitive to general acid–base catalysis and containing amino or hydroxyl groups [17].

4.2. Thermodynamic parameters of CA formation and degradation

As explained in Section 2, the estimation of the thermodynamic parameters of the system required the elaboration of the Arrhenius-type and Eyring-type plots is illustrated in Figs. 3 and 4, respectively. In particular, according to Eqs. (3) and (12), the Arrhenius plots of Fig. 3 allowed us to estimate the activation energies of CA formation and degradation, as well as the standard enthalpy variation

Fig. 3. Semi-log Arrhenius-type plots of CA formation (○), enzyme unfolding (●), and CA degradation (▲) during *Streptomyces* DAUFPE 3060 fermentations of glycerol at different temperatures.

Fig. 4. Semi-log Eyring-type plots of CA formation (○) and degradation (▲) during *Streptomyces* DAUFPE 3060 fermentations of glycerol at different temperatures.

of the enzyme unfolding equilibrium, while Fig. 4 the activation enthalpies and entropies of both CA formation and degradation.

Table 2 lists the thermodynamic parameters of the three above-supposed phenomena. Although the activation enthalpy of CA degradation ($\Delta H_d^* = 36.5 \text{ kJ/mol}$) is much lower than that of CA formation ($\Delta H^* = 95.1 \text{ kJ/mol}$), its entropic contribution is much larger in absolute value ($\Delta S_d^* = -219.7 \text{ J/(mol K)}$; $\Delta S^* = -19.7 \text{ J/(mol K)}$), thus leading to comparable values of the activation free energies ($\Delta G_d^* = 103.5 \text{ kJ/mol}$; $\Delta G^* = 101.1 \text{ kJ/mol}$). Unfortunately, this means that carrying out the fermentation at thermal level only slightly higher than the optimum would make the irreversible degradation of CA practically unavoidable. It is interesting to observe that both ΔH^* values are positive, thereby confirming that either the production or the degradation of CA are endothermic processes. Moreover, both ΔS^* values are negative as expected by the formation, in both cases, of transition states with more rigid structures compared to the separate reactants. This result would

Table 2

Thermodynamic parameters of CA formation and degradation as well as of the unfolding equilibrium of the enzyme limiting CA synthesis.

Parameter	CA formation ^a	CA degradation ^a	Enzyme unfolding ^b
<i>E</i> (kJ/mol)	97.6	39.0	–
ΔH (kJ/mol)	95.1	36.5	183.7
ΔS (J/(mol K))	–19.7	–219.7	603
ΔG (kJ/mol)	101.1	103.5	–254.4

^a Activation parameters.

^b Standard variations of equilibrium parameters. Reference temperature: 32 °C.

be consistent in the former case with the formation of a complex between the enzyme limiting the formation of CA and its substrate, whereas it is hardly understandable in the latter. A possible explication is that the degradation of CA could not be, on the reality, a pure thermal phenomenon, but it is possible the occurrence of some interaction with other substances either initially present in the medium [16] or produced by the microorganism [15]. This explication would also be consistent with the observation in aqueous solutions of activation energy (66 kJ/mol) more than twice that obtained in fermented medium (24 kJ/mol) [4]. Although this last value is lower than that observed in this work ($E^* = 39$ kJ/mol), the pre-exponential factor of our system is higher, thus counterbalancing these effects and leading to comparable k_d values (see above).

Finally, the very large and positive value of the standard entropy variation of the enzyme inactivation ($\Delta S_i^\circ = 603$ J/(mol K)) is consistent with the well-known increase in the number of freedom degrees consequent to any enzyme unfolding responsible for the rupture of its three-dimensional structure. Also the very high value of the related enthalpy variation ($\Delta H_i^\circ = 183.7$ J/mol) is consistent with the endothermic nature of the enzyme thermo-inactivation. On the contrary, the high and negative value of the standard free energy variation ($\Delta G_i^\circ = 183.7$ J/mol) could induce us to believe that this unfolding would lead to a denatured form of the enzyme even more stable than the active one. Although this phenomenon would be possible in the case of interaction with some substance present in the medium, this does not mean that such an event may occur at a perceptible rate, which anyhow is well known to depend on the activation energy. However, under the hypotheses formulated in this study this parameter could not be estimated.

5. Conclusions

The kinetics and thermodynamics of CA production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 fermentation was well represented by a model taking into account three different events: (a) Arrhenius-type formation of CA, (b) reversible unfolding of a hypothetical limiting enzyme, and (c) irreversible first-order degradation of CA. The literature does not contain reports on studies on the simultaneous formation and degradation kinetics during CA fermentation. In this work, the temperature showed its more significant effect on the degradation constant (k_d), which progressively increased with temperature (up to 40 °C), while the CA formation constant (k_{CA}) increased up to 32 °C and then declined. All the thermodynamic parameters of the above-hypothesized three events were estimated taking this last temperature as a reference. The values of the standard entropy, enthalpy and free energy variations of the enzyme reversible unfolding were 603 J/(mol K), 183.7 kJ/mol and –254.4 kJ/mol, respectively. The corresponding activation parameters of CA formation were –19.7 J/(mol K), 95.1 kJ/mol and 101.1 kJ/mol, and those referred to CA degradation –219.7 J/(mol K), 36.5 kJ/mol and 103.5 kJ/mol, respectively.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Brazilian Research Funding Institution FAPESP (process no. 05/60158-0).

References

- [1] Reading C, Cole M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1977;11:852–7.
- [2] Lynch HC, Yang Y. Degradation products of clavulanic acid promote clavulanic acid production in cultures of *Streptomyces clavuligerus*. *Enzyme Microb Technol* 2004;34:48–54.
- [3] Baggaley KH, Brown AG, Schofield CJ. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. *Nat Prod Rep* 1997;14:309–33.
- [4] Bersanetti PA, Almeida RMRG, Barboza M, Araújo MLGC, Hokka CO. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. *Biochem Eng J* 2005;23:31–6.
- [5] Haginaka J, Nakagawa T, Uno T. Stability of clavulanic acid in aqueous solution. *Chem Pharm Bull* 1981;29:3334–41.
- [6] Mayer AF, Deckwer WD. Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol* 1996;45:41–6.
- [7] Converti A, Del Borghi A, Gandolfi R, Lodi A, Molinari F, Palazzi E. Reactivity and stability of mycelium-bound carboxylesterase of *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol Bioeng* 2002;77:232–7.
- [8] Sánchez-Luna LD, Bezerra RP, Matsudo MC, Sato S, Converti A, Carvalho JCM. Influence of pH, temperature, and urea molar flowrate on *Arthrosira platenis* fed-batch cultivation: a kinetic and thermodynamic approach. *Biotechnol Bioeng* 2007;96:702–11.
- [9] Solísio C, Lodi A, Converti A, Del Borghi M. Influence of temperature on cadmium removal by *Sphaerotilus natans* from acidic solutions. *Sep Sci Technol* 2003;38:3951–66.
- [10] Converti A, Perego P, Domínguez JM, Silva SS. Effect of temperature on the microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb Technol* 2001;28:339–45.
- [11] Perego P, Converti A, Del Borghi M. Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. *Bioresour Technol* 2003;89:125–31.
- [12] Porto TS, Porto CS, Cavalcanti MTH, Lima Filho JL, Perego P, Porto ALF, et al. Kinetic and thermodynamic investigation on ascorbate oxidase activity and stability of a *Cucurbita maxima* extract. *Biotechnol Progr* 2006;22:1637–42.
- [13] Sampaio FC, Moraes CA, De Faveri D, Perego P, Converti A, Passos FML. Influence of temperature and pH on xylitol production from xylose by *Debaryomyces hansenii* UFV-170. *Process Biochem* 2006;41:675–81.
- [14] Roels JA. *Energetics and kinetics in biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press; 1983.
- [15] Kenji I, Hung TV, Lee HC, Liou K, Shin CH, Yoon YJ, et al. Degradation of clavulanic acid during the cultivation of *Streptomyces clavuligerus*, instability of clavulanic acid by metabolites and proteins from the strain. *J Microbiol Biotechnol* 2006;16:590–6.
- [16] Roubois JA, Krabben P, De Laat WTAM, Babuska R, Heijnen JJ. Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations. *Biotechnol Prog* 2002;18:451–7.
- [17] Brethauer S, Held M, Panke S. Clavulanic acid decomposition is catalyzed by the compound itself and by its decomposition products. *J Pharm Sci* 2008;97:3451–5.
- [18] Labuza TP, Riboh D. Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods degradation, keeping, quality, temperature, quality controls, analysis, models. *Food Technol* 1982;36:66–74.
- [19] Lawrence CH. A method of isolating actinomycetes from scabby potato tissue and soil with minimal contamination. *Can J Bot* 1956;34:44–7.
- [20] Maranesi GL, Baptista-Neto A, Hokka CO, Badino-Jr AC. Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. *World J Microb Biotechnol* 2005;21:509–14.
- [21] Bird AE, Bellis JM, Gasson BC. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. *Analyst* 1982;107:1241–5.
- [22] Arianu CC, Ogunsua AO. Thermal degradation kinetics of thiamine in prewinkled based formulated low acidity foods. *Int J Food Sci Technol* 2000;35:315–21.
- [23] Eyring HJ. The activated complex in chemical reactions. *J Chem Phys* 1935;3:107–15.
- [24] Ortiz SCA, Hokka CO, Badino-Jr AC. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Enzyme Microb Technol* 2007;40:1071–7.
- [25] Baptista Neto A, Hirata DB, Cassiano Filho LCM, Bellão C, Badino Jr AC, Hokka CO. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous processes. *Braz J Chem Eng* 2005;22:557–63.
- [26] Hu WS, Brana AF, Demain AL. Carbon source regulation of cephem antibiotic production by resting cell of *Streptomyces clavuligerus* and its reversal by protein synthesis inhibitors. *Enzyme Microb Technol* 1984;6:155–60.

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bej

Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems

Daniela de Araújo Viana Marques^a, Beatriz Rivas Torres^b, Ana Lúcia Figueiredo Porto^c, Adalberto Pessoa-Júnior^a, Attilio Converti^{b,*}

^a Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 16, Cidade Universitária, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Chemical and Process Engineering, University of Genoa, Via Opera Pia 15, 16145 Genoa, Italy

^c Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900 Dois Irmãos, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2009

Received in revised form 10 July 2009

Accepted 22 July 2009

Keywords:

Fermentation medium

Extractive fermentation medium

k_La

Oxygen transfer coefficient

Agitation

Aeration

ABSTRACT

Aeration and agitation are important variables to ensure effective oxygen transfer rate during aerobic bioprocesses; therefore, the knowledge of the volumetric mass transfer coefficient (k_La) is required. In view of selecting the optimum oxygen requirements for extractive fermentation in aqueous two-phase system (ATPS), the k_La values in a typical ATPS medium were compared in this work with those in distilled water and in a simple fermentation medium, in the absence of biomass. Aeration and agitation were selected as the independent variables using a 2^2 full factorial design. Both variables showed statistically significant effects on k_La , and the highest values of this parameter in both media for simple fermentation (241 s^{-1}) and extractive fermentation with ATPS (70.3 s^{-1}) were observed at the highest levels of aeration (5 vvm) and agitation (1200 rpm). The k_La values were then used to establish mathematical correlations of this response as a function of the process variables. The exponents of the power number ($N^3 D^2$) and superficial gas velocity (V_s) determined in distilled water ($\alpha = 0.39$ and $\beta = 0.47$, respectively) were in reasonable agreement with the ones reported in the literature for several aqueous systems and close to those determined for a simple fermentation medium ($\alpha = 0.38$ and $\beta = 0.41$). On the other hand, as expected by the increased viscosity in the presence of polyethylene glycol, their values were remarkably higher in a typical medium for extractive fermentation ($\alpha = 0.50$ and $\beta = 1.0$). A reasonable agreement was found between the experimental data of k_La for the three selected systems and the values predicted by the theoretical models, under a wide range of operational conditions.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The extractive fermentation can represent a technological solution for the in situ product recovery to overcome product inhibition and low-volumetric productivity, which often occur in many batch bioprocesses. As its name suggests, the concept implies a fermentation stage integrated with extraction as the first step of downstream processing for product recovery [1].

Aqueous two-phase systems (ATPSs) are an alternative and efficient method to concentrate and partially purify biomolecules by partitioning them between two liquid phases. They make use of two immiscible phases, consisting either of two polymers in water or of a polymer solution and a salt solution, usually contain about 80–90% of water and hence provide an excellent environment for cells, cell organelles and biologically active substances [2].

In extractive fermentation using ATPS, cells are considered to be immobilized in one of the two phases, and the desired product is allowed to partition into the other phase by proper handling of the system. Polymer/salt systems are usually preferred in large-scale operations because of their relatively low cost, short separation time, high selectivity and stabilization of the biomolecule structure by the polymers [1,3].

The dissolved oxygen (DO) level and the effect of shear on biomass are important factors that influence bioprocesses using polyethylene glycol (PEG) as a polymeric phase and salts solutions. A decrease in the oxygen transfer rate occurs in a medium when solute concentration increases, and PEG can reduce markedly oxygen diffusion and solubility. However, although oxygen diffusion is often the limiting factor in extractive fermentation [3], to the best of our knowledge no study has been performed to date on this subject.

Efficiency of aeration depends on the extent of oxygen solubilization, diffusion rate in the broth, and bioreactor capacity to satisfy the oxygen demand by microbial population. In particular, the DO in the broth depends on either the oxygen uptake rate (OUR)

* Corresponding author. Tel.: +39 010 3532593; fax: +39 010 3532586.
E-mail address: converti@unige.it (A. Converti).

by the cell or the oxygen transfer rate (OTR). Since the OTR, in turn, is depending on the air flow rate, it can play an important role and often affects the overall volumetric mass transfer coefficient (k_La) and, then, the productivity [4].

The k_La , which is the major parameter implied in the design and operation of mixing–sparging equipments of bioreactors, depends on a lot of factors, such as geometrical and operational characteristics of the vessels, medium composition, viscosity, superficial tension, concentration, etc., on the microorganism morphology, and mainly on the superficial area of the air bubbles (linked to stirrer speed, mixing, etc.); therefore, it plays an important role in the scale-up and cost analysis of the process [5]. The k_La in stirred tank reactors can be estimated by a large number of equations, most of which being empirical [6,7] and others having a theoretical basis [8,9]. With particular concern to the polymeric systems, k_La is limited by their high viscosity [10–12].

To determine the best conditions of oxygen transfer in an extractive fermentation system, the k_La values in a typical ATPS medium were compared in this work with those in distilled water and in a simple fermentation medium, in the absence of biomass and under different conditions of aeration and agitation.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Ultra-pure polyethylene glycol with molar mass of 8000 g/mol (PEG 8000) (catalog no. P-2139) and analytical grade soybean flour (SF) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). All other chemicals used to prepare the media, specifically salts, glycerol, bacto-peptone, malt extract, and yeast extract, were analytical grade reagents from Fluka (Buchs, Switzerland) or Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Simple fermentation medium

We used as a simple fermentation medium the one proposed by Maranesi et al. [13] having the following composition (in g/L of distilled water): glycerol, 10; SF, 40; K_2HPO_4 , 1.2; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.001; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001; pH 6.5.

2.3. Medium for extractive fermentation by ATPS

One liter of a 25.0% (w/w) phosphate salts solution was prepared by mixing 479 mL of a 27.3% (w/w) NaH_2PO_4 solution and 521 mL of a 22.9% (w/w) K_2HPO_4 solution (pH 6.5). This salts solution was mixed with a 25.0% (w/w) PEG 8000 solution and a culture medium containing 40 g/L of SF and 10 g/L of glycerol. After adjusting again the pH to 6.5, it was autoclaved at 121 °C for 20 min.

2.4. Fermentor

All the experiments were carried out at 28 ± 1 °C in a 3.0L-fermentor, model Z61103CT04 (Applikon, Schiedam, The Netherlands), provided with an electronic device, model ADI1030 (Applikon), according to a 2^2 full factorial design at the levels of agitation and aeration listed in Table 1. Dissolved oxygen concentration was measured by a sterilized galvanic electrode, InPro6000 Series (Mettler-Toledo, Novate Milanese, Italy).

2.5. Experimental procedure

A 2^2 full factorial design was utilized to investigate the influence of the two independent variables (agitation intensity and aeration) on k_La in water, in a simple fermentation medium and in an extractive fermentation one. The experimental design was composed of

Table 1

Levels of factors used in the 2^2 experimental design employed to investigate the influence of agitation and aeration on k_La in water, in a simple fermentation medium and an extractive fermentation medium.

Levels Coded values	Low −1	Central 0	High +1
1 – Agitation (rpm)	700	950	1200
2 – Aeration (vvm)	2.0	3.5	5.0

seven runs and three repetitions of the central point, needed to calculate the pure error. A linear regression model was employed to predict the response (Y):

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

where b_0 is the interception coefficient, b_i are the linear coefficients, b_{ij} are the interaction coefficients and x_i and x_j are the coded values of the independent variables.

The goodness of fit of the model was evaluated by the determination coefficient (R^2) and the analysis of variance (ANOVA); the first-order model equation was determined by the Fischer's test. The experimental and predicted values were compared by the Statistic 6.0 statistical program package in order to determine the validity of the developed model.

2.6. Determination of k_La

To experimentally determine the k_La values, we used the static method [14,15], which has the advantages that it can be applied to different media and does not require any chemical reaction; however, it is suitable for non-respiring systems only. According to this method, nitrogen gas was passed up to an oxygen concentration close to zero, then air was used instead of nitrogen, and the rate of DO concentration increase in the broth was measured. According to the literature [14,15], the mass balance for the dissolved oxygen in well-mixed liquid phase can be described as:

$$\frac{dC}{dt} = k_La(C^* - C) \quad (2)$$

where dC/dt is the rate of O_2 accumulation in the liquid phase and C^* the oxygen saturation concentration in the broth.

2.7. Correlation among k_La and operating variables

Predictions of the absorption rate of a gaseous compound in a stirred tank are usually based on correlations among k_La , the mechanical agitation power per unit volume (P/V_L) and the gas sparging rate expressed as the superficial velocity (V_s) ($m s^{-1}$) [14]:

$$k_La = A \left[\frac{P}{V_L} \right]^\alpha [V_s]^\beta \quad (3)$$

where P is the mechanical agitation power in the gas liquid dispersion (W), V_L is the liquid volume (m^3), A is a constant and α and β are empirical exponents, to be determined experimentally for each system.

However, as explained by Ozbek and Gayik [14], since the accurate measurement of the actual power input into the system may be quite cumbersome, an equation like the following one can be usually adapted:

$$k_La = AND^{\alpha_1} N^{\alpha_2} [V_s]^\beta \quad (4)$$

where D is the impeller diameter (m) and N (s^{-1}) is the impeller rotational speed.

Therefore, as suggested in the literature [16,17], we chose to use the power number, i.e. $N^3 D^2$, to represent the power input per unit

Fig. 1. Response surface contour plot showing the simultaneous effects of agitation and aeration on k_{La} in a simple fermentation medium, according to the 2^2 full factorial design of Table 1.

volume:

$$k_{La} = A(N^3 D^2)^\alpha [V_s]^\beta \quad (5)$$

Following the same approach of other researchers [18,19], the k_{La} values calculated from the experimental data under the conditions listed in Table 1 were plotted on a log–log basis against $N^3 D^2$ and V_s , and the exponents α and β were estimated by least squares technique for the three selected systems.

The main bench-scale design details were as follows: operating volume, 1.0 L; internal diameter, 13 cm; height, 20 cm; number of baffles, 3; baffle height, 13.5 cm; baffle width, 1.5 cm; number of impellers, 2; location of the impeller from the top plate, 14 cm; location of the impeller from the bottom plate, 5 cm; type of impeller, Rushton disc turbine; impeller diameter of disc, 3.0 cm; impeller blade width, 1.4 cm; impeller blade length, 1.9 cm; number of blades, 6.

3. Results and discussion

3.1. Relationship between k_{La} and C^* in simple fermentation and extractive fermentation systems

According to previous reports on different fermentation systems [20–22], k_{La} of both simple (k_{La_f}) and extractive fermentation ($k_{La_{ef}}$) systems achieved maximum values at the highest levels of aeration (5 vvm) and agitation (1200 rpm) (Figs. 1 and 2). k_{La_f} was three times higher than $k_{La_{ef}}$, which suggests that the oxygen transfer could have been affected by the high viscosity of the PEG solution (140 mPa s), a polymeric component often used in extractive fermentations [23,24]. Moreover, the high salt content necessary to promote the spontaneous separation of phases could have played a significant role as well [25,26]. Under apparently similar conditions, Clarke et al. [27], investigating the effects of hydrocarbon addition on k_{La} and OTR in stirred tank bioreactors, observed a k_{La} decrease as the likely result of increased viscosity, stagnant zones and resistance to oxygen transfer. Similar behavior was observed in the presence of emulsified oxygen vectors [28].

As expected, the DO concentration at equilibrium $C^* = 9.15 \pm 0.54 \text{ mgO}_2/\text{L}$ calculated in this study by Eq. (2) for the simple fermentation medium was close to that in water ($C^* = 8.50 \pm 0.50 \text{ mgO}_2/\text{L}$). However, it was significantly higher than the one obtained in the extractive fermentation medium ($5.99 \pm 0.28 \text{ mgO}_2/\text{L}$), likely because of the decrease in the solution polarity induced by PEG [29].

Fig. 2. Response surface contour plot showing the simultaneous effects of agitation and aeration on k_{La} in an extractive fermentation medium, according to the 2^2 full factorial design of Table 1.

The slow oxygen diffusion in a system containing PEG does not necessarily affect the production yield, which depends on the bioprocess under consideration. An example is provided by the production of α -amylase by *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* that increased using PEG/dextran ATPS at high PEG level due to a 25% longer phase of high metabolic activity [30]. In the production of subtilin by *B. subtilis*, 20% PEG 6000 was found to have no significant inhibitory effect [31], while Hotha and Banik [32] observed a maximum production of alkaline protease in a 13.6% (w/w) PEG 4000/13.75% (w/w) potassium phosphate ATPS, which was 2.8-fold that obtained in regular medium without phase-forming polymers. The DO level can in fact be influenced by phase-forming polymers in different ways [33]: the interfacial area exposed to air (a) becomes larger as the surface tension decreases, whereas the transfer coefficient (k_L) decreases, leading to a more rigid interface, because of the high water binding capacity of PEG [34].

3.2. Analysis of the experimental design

The main experimental results of k_{La} obtained for the selected two systems of fermentation are listed in Table 2. Experiments were planned according to the 2^2 full factorial design so as to obtain linear models describing the simultaneous dependence of k_{La} of both simple fermentation (k_{La_f}) and extractive fermentation ($k_{La_{ef}}$) systems on agitation and aeration. These results show that the highest k_{La} value in the simple system (241 s^{-1}), achieved at 28°C , pH 6.8, 1200 rpm and 5 vvm (run 4), was about 3-fold that obtained in the extractive fermentation one (70.3 s^{-1}) under the same conditions.

Table 2

Level combinations of the two independent variables (agitation and aeration) used in the 2^2 full factorial design and related values of responses^a.

Run	Agitation (rpm)	Aeration (vvm)	$k_{La_f} (\text{s}^{-1})^b$	$k_{La_{ef}} (\text{s}^{-1})^c$
6 (C) ^a	950	3.5	200	47.9
2	1200	2.0	167	27.9
7 (C) ^a	950	3.5	193	49.0
3	700	5.0	131	31.0
4	1200	5.0	241	70.3
5 (C) ^a	950	3.5	184	46.9
1	700	2.0	89.9	11.7

^a Pure error estimated from the replicate runs at the central point (C) was ± 1.2 . All values were statistically significant at 95% confidence level.

^b k_{La_f} : oxygen mass transfer coefficient in a simple fermentation system.

^c $k_{La_{ef}}$: oxygen mass transfer coefficient in an extractive fermentation system.

Fig. 3. Experimental and predictive data of volumetric mass transfer coefficient as a function of aeration (V_s) and agitation (N^3D^2), according to the 2^2 full factorial design of Table 1. Distilled water (○); simple fermentation medium (□); extractive fermentation medium (▲).

The experimental data of Table 2 were then used to make regression analyses. The following equations, where the variables take their coded values, express the best models for k_La in either system:

$$k_{La_f} = 168.22 + 35.54x_1 + 24.20x_2 \quad (6)$$

$$k_{La_{ef}} = 47.92 + 13.87x_1 + 15.41x_2 + 5.76x_1x_2 \quad (7)$$

The term expressing the interaction between the two variables (x_1x_2) in the simple fermentation system was not significant, therefore it was omitted. Although the statistical analysis revealed positive main linear effects of both independent variables (significant at 95% confidence level), the effect of agitation on k_{La_f} resulted to be stronger than that of aeration, whereas the contrary took place for $k_{La_{ef}}$, likely because the oxygen diffusion could have been limited by the high viscosity and coalescing characteristics of PEG. Nevertheless, the positive correlation coefficient between k_{La_f} and $k_{La_{ef}}$ (data not shown) means that both independent variables exerted qualitatively similar effects on k_La .

Simultaneous regression of Eqs. (6) and (7) provided maximum predicted values of k_{La_f} (228 s^{-1}) and $k_{La_{ef}}$ (83 s^{-1}) only 5% lower and 18% higher than their respective experimental values, thus demonstrating the validity of the models. The statistical significance of these first-order model equations was confirmed by the F -test analysis of variance and multiple regression. The computed F -values (61 for k_{La_f} and 559 for $k_{La_{ef}}$) were in fact higher than the tabulated ones [$F_{(2,3)} = 6.4$ and $F_{(3,3)} = 2.3$, respectively], whereas the lack of fit was insignificant for both k_{La_f} [$F = 61 > F_{(2,3)}$] and $k_{La_{ef}}$ [$F = 559 > F_{(3,3)}$], and the pure error was only 1.2. In addition, the values of the determination coefficient ($R^2 = 0.76$ and 0.87 , respectively) indicate that the models explained 76% and 87% of the variability data, and both regressions were statistically significant ($p < 0.00010$) at 95% confidence level.

3.3. Dimensionless correlations for k_La prediction

The values of the exponents α and β of Eq. (5), estimated for k_La correlation with the power number (N^3D^2) and the superficial gas velocity (V_s), are appreciably different from those reported by many authors, likely due to marked differences in the tank configuration, in the liquid properties and the operating conditions explored [35,36].

Fig. 3 shows the log–log plot of the values of k_La predicted by Eq. (5) versus those obtained experimentally for the three systems according to the 2^2 full experimental design. It should be noticed the excellent correlation between experimental and theoretical values.

As expected, the values of α (0.39) and β (0.47) (Table 3), which represent the slopes of the straight lines correlating $\ln k_La$

Table 3

Correlation coefficients α and β estimated for water, simple fermentation system and extractive fermentation system by linear regression of Eq. (5).

System	A	α	β	R^2	ESD ^a
Water	3.9×10^{-4}	0.39	0.47	0.993	1.5×10^{-4}
Simple fermentation system	3.7×10^{-4}	0.38	0.41	0.889	1.0×10^{-4}
Extractive fermentation system	2.1×10^{-5}	0.52	1.0	0.924	1.3×10^{-4}

^a ESD: error standard deviation calculated as the difference between the estimate and the true value.

in water to $\ln N^3D^2$ and $\ln V_s$, respectively, are within the very wide ranges of values reported in the literature ($0.1 \leq \alpha \leq 0.7$ and $0.3 \leq \beta \leq 0.8$) for water and different aqueous solutions in vessels with different geometry, under quite different operative conditions [12,14,16–18,24,29,36–39].

According to Ozbek and Gayik [14] the relationship between the agitation and k_La can be interestingly explored in two regions. In the first region, below 300 rpm, the slope is much lower, whereas in the second one, above that threshold, k_La increases linearly with the agitation. Westerterp et al. [40] as well as Perez and Sandall [7] observed similar results, suggested the existence of a critical agitation (N_c) above which k_La is a linear function of agitation, and found that this parameter ranged from 200 to 650 rpm depending on the geometry. As expected, in the present study, which was performed at relatively intense agitation (>650 rpm), only a linear relationship was observed.

For the simple fermentation system, the exponent α (0.38) was almost the same as that obtained in distilled water (0.39), while the exponent β was appreciably lower (0.41 instead of 0.47) (Table 3). This result was likely due to the presence of solutes in the liquid phase, which are known to affect the mass transfer by changing its physicochemical properties, disturbing the bubble coalescing behavior and the bubble size [41].

For the extractive fermentation system the exponents ($\alpha = 0.52$ and $\beta = 1.0$) were significantly higher, and all the k_La values always remarkably lower than in the others two systems (Table 3), which can be explained again by the high viscosity of PEG, requiring high levels of both aeration and agitation, with particular concern to the former. Accordingly, the constant A was for this system about one order of magnitude lower than for the other two systems.

According to Kouda et al. [22], an increased rate of aeration as oxygen source should only reduce the oxygen retention time, thereby increasing the gas velocity in the medium. On the other hand, the agitation is well known to influence both air bubble distribution and mixing; in particular, insufficient agitation results in poor oxygen transfer, especially in highly viscous media.

4. Conclusions

In this work we compared the k_La values in distilled water, in a simple fermentation medium and in a typical medium to be used for extractive fermentation, in the absence of biomass and under different conditions of aeration and agitation. A 2^2 full factorial design was used to get insights into the influence of two independent variables, specifically agitation and aeration, on the k_La selected as a response. Such information is very important because it allows accurately understanding the differences among these systems as well as correctly designing an ATPS for extractive fermentation. Correlations among k_La , power number and superficial velocity combined to ANOVA revealed that both variables exerted statistically significant effects. For the medium to be used for extractive fermentation, all the k_La values were always remarkably lower than in the others two systems, which can be explained with the high viscosity of PEG, requiring particularly high levels of both aeration and agitation. A reasonable agreement was found between the

experimental data of k_La for the three selected systems and the values predicted by the theoretical models, under a wide range of operational conditions, thus confirming the validity of the proposed approach.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Brazilian Research Funding Institution FAPESP (process no. 05/60158-0) and CAPES (process no. 3802-08-6)

References

- [1] R. Kannan, Studies on extractive fermentation of *Bacillus licheniformis* α -amylase using PEG-citrate aqueous two-phase system, M.Tech. Thesis, School of Biochemical Engineering, IT, BHU, Varanasi, India, 1997.
- [2] M.R. Kula, K.H. Kroner, T.H. Husted, Purification of enzymes by liquid-liquid extraction, *Adv. Biochem. Eng.* 24 (1982) 73–118.
- [3] R.M. Banik, A. Santhiagu, B. Kanari, C. Sabarinath, S.N. Upadhyay, Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19 (2003) 337–348.
- [4] F.J. Montes, J. Catalan, M.A. Galan, Prediction of k_La in yeast broths, *Process Biochem.* 34 (1998) 549–555.
- [5] A.I. Galaction, D. Cascaval, C. Oniscu, M. Turnea, Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths, *Biochem. Eng. J.* 20 (2004) 85–94.
- [6] P.H. Calderbank, M.B. Moo-Young, The power characteristic of agitators for the mixing of Newtonian and non-Newtonian fluids, *Trans. Inst. Chem. Eng.* 39 (1961) 337–347.
- [7] J.F. Perez, O.C. Sandall, Gas absorption by non-Newtonian fluids in agitated vessels, *AIChE J.* 20 (1974) 770–775.
- [8] Y. Kawase, B. Halard, M. Moo-Young, Liquid-phase mass transfer coefficients in bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* 39 (1992) 1133–1140.
- [9] Z. Zhang, C.R. Thomas, Eddy number distribution in isotropic turbulence and its application for estimating mass transfer coefficients, *Chem. Eng. Commun.* 140 (1996) 207–217.
- [10] H. Eickenbusch, P.O. Brunn, A. Schumpe, Mass transfer into viscous pseudo-plastic liquid in large-diameter bubble columns, *Chem. Eng. Process.* 34 (1995) 479–485.
- [11] Y. Kobayashi, A. Okamoto, K. Nishinari, Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights, *Biorheology* 31 (1994) 235–244.
- [12] G.S. Kwon, S.H. Moon, S.D. Hong, H.M. Lee, T.I. Mheen, H.M. Oh, Rheological properties of extracellular polysaccharide, *Pestan*, produced by *Pestalotiopsis* sp., *Biotechnol. Lett.* 18 (1996) 1465–1470.
- [13] G.L. Maranesi, A. Baptista-Neto, C.O. Hokka, A.C. Badino-Jr, Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21 (2005) 509–514.
- [14] B. Ozbek, S. Gayik, The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor, *Process Biochem.* 36 (2001) 729–741.
- [15] M. Moo-Young, Ch.L. Cooney, A.E. Humphrey, *Comprehensive Biotechnology*, vol. 2, Pergamon Press, Oxford, 1985, p. 16.
- [16] F. Yoshida, A. Ikeda, S. Imakawa, Y. Miura, Oxygen absorption rates in stirred gas–liquid contactors, *Ind. Eng. Chem.* 58 (1960) 32–40.
- [17] J.W. Richards, Studies in aeration and agitation, *Prog. Ind. Microbiol.* 3 (1961) 143–172.
- [18] H. Wu, An issue on applications of a disk turbine for gas–liquid mass transfer, *Chem. Eng. Sci.* 50 (1995) 2801–2811.
- [19] A. Wiseman, *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, John Wiley & Sons, New York, 1977.
- [20] C. Bandaiphet, P. Prasertsan, Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, k_La in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7, *Carbohydr. Polym.* 66 (2006) 216–228.
- [21] H.J. Kim, J.H. Kim, H.J. Oh, C.S. Shin, Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation, *Process Biochem.* 38 (2002) 649–655.
- [22] T. Kouda, H. Yano, F. Yoshinaga, Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture, *J. Ferment. Bioeng.* 38 (1997) 371–376.
- [23] F.Y. Montes, J. Catalan, M. Galan, Prediction of k_La in yeast broths, *Process Biochem.* 34 (1999) 549–561.
- [24] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, Mass transfer coefficient in stirrer tank reactors for xanthan solutions, *Biochem. Eng. J.* 1 (1998) 1–10.
- [25] A.C. Badino Jr., M.C.R. Facciotti, W. Schmidell, Volumetric oxygen transfer coefficients (k_La) in batch cultivations involving non-Newtonian broths, *Biochem. Eng. J.* 8 (2001) 111–119.
- [26] G. Tubio, B. Nerli, G. Picó, Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran, *J. Chromatogr. B* 799 (2004) 293–301.
- [27] K.G. Clarke, P.C. Williams, M.S. Smit, S.T.L. Harrison, Enhancement and repression of the volumetric oxygen transfer coefficient through hydrocarbon addition and its influence on oxygen transfer rate in stirred tank bioreactors, *Biochem. Eng. J.* 28 (2006) 237–242.
- [28] J.L. Rols, J.S. Condoret, C. Fonanda, G. Goma, Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen vectors, *Biotechnol. Bioeng.* 35 (1990) 427–435.
- [29] H. Gagnon, M. Lounes, J. Thibault, Power consumption and mass transfer in agitated gas–liquid columns: a comparative study, *Can. J. Chem. Eng.* 76 (1998) 379–389.
- [30] E. Andersson, A.C. Johansson, B. Hahn-Hägerdal, α -Amylase production in aqueous two-phase systems with *Bacillus subtilis*, *Enzyme Microb. Technol.* 7 (1985) 333–338.
- [31] R. Kuboi, T. Maruki, H. Tanaka, I. Komasa, Fermentation of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and production of subtilin in polyethylene glycol/phosphate aqueous two-phase systems, *J. Ferment. Bioeng.* 78 (1994) 431–436.
- [32] S. Hotha, R.M. Banik, Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H14 in aqueous two-phase systems, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69 (1997) 5–10.
- [33] A.M.J. Blow, G.M. Botham, D. Fisher, A.H. Goodall, C.P.S. Tilcock, J.A. Lucy, Water and calcium ions in cell fusion induced by poly(ethylene glycol), *FEBS Lett.* 94 (1978) 305–310.
- [34] K. Arnold, A. Herrmann, L. Pratsch, K. Gawrisch, The dielectric properties of aqueous solutions of poly(ethylene glycol) and their influence on membrane structure, *Biochim. Biophys. Acta* 815 (1985) 515–518.
- [35] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, Theoretical prediction of gas–liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks, *Chem. Eng. Sci.* 59 (2004) 2489–2501.
- [36] P.R. Gogate, A.A.C.M. Beenackers, A.B. Pandit, Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review, *Biochem. Eng. J.* 6 (2000) 109–144.
- [37] K. Chandrasekharan, P.H. Calderbank, Further observations on the scale-up of aerated mixing vessels, *Chem. Eng. Sci.* 36 (1981) 819–823.
- [38] J.M.T. Vasconcelos, S.C.P. Orvalho, A.M. Rodríguez, S.S. Alves, Effect of blade shape on the performance of six blade disk turbine impellers, *Ind. Eng. Chem. Res.* 39 (2000) 203–208.
- [39] M.S. Puthli, V.K. Rathod, A.B. Pandit, Gas–liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor, *Biochem. Eng. J.* 23 (2005) 25–30.
- [40] K.R. Westerterp, L.L. Van Dierendonck, J.A. De Kraa, Interfacial areas in agitated gas–liquid contactors, *Chem. Eng. Sci.* 18 (1963) 157–168.
- [41] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 153–176.