

PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO POR *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064.

Fernando Passareli, Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo – sub-área 1.14 - Química Tecnológica - Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química - Instituto de Química – Campus de Araraquara.

A busca por agentes terapêuticos mais eficazes contra as infecções bacterianas tem resultado na geração de antibióticos semi-sintéticos mais potentes, derivados dos antibióticos naturais, e na descoberta de novos compostos, como nocardicina, tienamicina e ácido clavulânico (AC), com destaque para este último, pois embora não tenha atividade antibiótica significativa, é um potente inibidor de beta-lactamases. O efeito sinérgico do AC com penicilinas e cefalosporinas resulta no bloqueio do sítio ativo de beta-lactamases e, assim, na proteção daqueles antibióticos, conferindo-lhes um maior espectro de ação (Foulstone e Reading, 1982; Sutherland, 1991; Baggaley et al., 1997). Atualmente, o exemplo mais relevante da combinação de AC com antibióticos susceptíveis a beta-lactamases é o fármaco Augmentin™ (no Brasil, Clavulin™), da GlaxoSmithKline. Sua formulação consiste da penicilina semi-sintética amoxicilina e do AC na forma de sal potássio (clavulanato de potássio), na proporção 4:1.

A produção industrial de AC é normalmente realizada por linhagens de *Streptomyces clavuligerus* em cultivos em batelada, utilizando meios complexos, os quais são quimicamente indefinidos compostos geralmente por glicerol como fonte de carbono e energia e fontes de nitrogênio provenientes de matérias primas de baixo custo de origem vegetal. Além dos processos industriais utilizando-se meios de cultivos complexos, existem os meios sintéticos e os semi-sintéticos os quais são compostos por substâncias quimicamente definidas e algumas substâncias indefinidas, respectivamente. O processo de produção de AC, assim como o de outros metabólitos secundários, é caracterizado pela relativa dissociação entre as fases subsequentes de crescimento celular (trofofase) e de produção (idiofase). Desta forma a batelada alimentada é uma operação alternativa à batelada que possibilita, através da suplementação adequada de nutrientes, prolongar a idiofase e contornar efeitos de repressão e/ou inibição causados por altas concentrações do substrato limitante e controlar as velocidades de crescimento celular e de consumo de oxigênio, intimamente relacionadas no caso de microrganismos aeróbios como *S. clavuligerus* (Yamané e Shimizu, 1984).

Há poucos trabalhos relativos à produção de AC em batelada alimentada, cujos parâmetros de operação foram estabelecidos com base na descoberta de metabólitos intermediários chaves da rota biossintética do AC, ainda elucidada parcialmente (Kirk et al., 2000). De Laat et al. (2000) verificaram melhorias significativas na produção de AC em batelada alimentada mantendo-se baixas concentrações da fonte de nitrogênio durante o período de suplementação. Roubos et al. (2002) constataram que a degradação de AC é relativamente alta durante processos em batelada alimentada. Chen et al. (2002) obtiveram bons rendimentos de AC em processo em batelada alimentada suplementando o meio com glicerol e em trabalho posterior (Chen et al., 2003), verificaram que a utilização de ornitina resulta em maiores rendimentos que arginina.

O objetivo do presente trabalho foi adequar meios de cultura do processo em batelada alimentada para a batelada inicial da fermentação principal, na qual o crescimento celular deve ser mais significativo, e para a etapa de suplementação, período em que deve ocorrer uma produção de AC mais relevante, de forma a obter melhores rendimentos com relação ao processo convencional em batelada.

O microorganismo utilizado foi *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 na forma de micélios mantidos a -70°C em "vials" contendo ~3,5 mL de suspensão celular (3,0 g células/L em solução crioprotetora a 20% vol. glicerol/vol. suspensão micelial). Os micélios ativos eram obtidos através de cultivo submerso em meio de reativação (Tabela 1). Na Tabela 2 é descrito o meio de preparo do inóculo principal.

Tabela 1: Meio de reativação de células de *Streptomyces clavuligerus* indicado pela ATCC (ISP1), adicionado de extrato de malte (Kieser et al. 2000).

Componentes	Concentração (g/L)
Tryptona	5,0
Extrato de Levedura	3,0
Extrato de Malte	10,0
MOPS (tampão biológico)	21,0

A fermentação principal foi realizada em biorreator de bancada (Bioflo2000 da NBS, 5L de vol. útil), com controles de pH 6,8, temperatura 28°C, 1 vvm de ar e concentração de oxigênio dissolvido em ~50% do valor de saturação. O inóculo principal foi obtido através de duas pré culturas subseqüentes de 24 horas cada, em mesa rotativa (pH 6,8, 28°C, 250 rpm).

Tabela 2: Meio de preparo de inóculo principal, baseado em Butterworth (1984) e em quantidade de nitrogênio total de meio complexo contendo Samprosoy (suplemento protéico de soja da Bünge) descrito por Gouveia et al. (1999).

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	15,0
Soytone (extrato protéico de soja)	15,0
Extrato de Levedura	1,0
Extrato de Malte	10,0
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75
MOPS	21,0

Todos os meios foram inoculados com 10% v/v em volume de inóculo por volume de meio. O meio da fermentação principal está descrito na Tabela 3. O glicerol foi determinado por método espectrofotométrico descrito por Lambert e Neish (1950), após reação com ácido periódico. Nesta reação, o glicerol é oxidado quantitativamente a formaldeído, determinado em comprimento de onda de 570 nm. A concentração celular foi determinada através de massa seca, a 105°C por cerca de 18 horas em membranas de porosidade 0,45 µm previamente pesadas. O AC por espectrofotometria UV a 312 nm, baseado em Bird et al. (1982), após reação com imidazol., que é utilizado para sais de clavulanato de potássio.

Tabela 3: Composição dos meios da fermentação principal dos Experimentos F1 e F2 em batelada e batelada alimentada respectivamente.

Componentes	Experimento		Meio suplementar
	F1*	F2**	F2
	Concentração (g/L)		
Glicerol	15,0	15,0	66,0
Extrato de malte	10,0	10,0	—
Extrato de levedura	1,0	1,0	—
Soytone	15,0	15,0	—
Arginina	2,62	2,62	5,88
Solução de Sais***	1 mL	1 mL	—
KH ₂ PO ₄	0,63	0,63	2,07
K ₂ HPO ₄	—	—	1,27
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75	0,75	—

*Experimento F1: batelada; **Experimento F2: batelada alimentada;

***Solução de sais (g/L): MnCl₂·4H₂O, 1,0; FeSO₄·7H₂O, 1,0; Zn SO₄·7H₂O, 1,0

O Experimento F1 foi realizado em batelada, enquanto que as condições do Experimento F2, em batelada alimentada, foram estabelecidas com base nos dados de consumo de glicerol, produção de biomassa e de AC obtidos no Experimento F1. A alimentação foi iniciada após 36 horas de processo, instante próximo à exaustão de glicerol, e durou 72 horas. Após 108 horas de processo, prolongou-se a fermentação por mais 24 horas sem suplementação.

A combinação de condições favoráveis, como a obtenção de uma boa concentração celular e um bom fornecimento de oxigênio ao meio de cultivo proporcionado pelo fermentador, contribuiu para uma ótima produção de AC no Experimento F1. A concentração de glicerol do meio suplementar do Experimento F2 foi calculada com base no consumo observado no Experimento F1, de forma a se manter a concentração celular constante, que se manteve em torno de 9,5 g/L durante a alimentação do meio. Os resultados destes experimentos estão representados nas Figuras 1 e 2.

A produção de AC no Experimento F2 foi bem satisfatória e apresentou-se linearmente crescente até o final da suplementação.

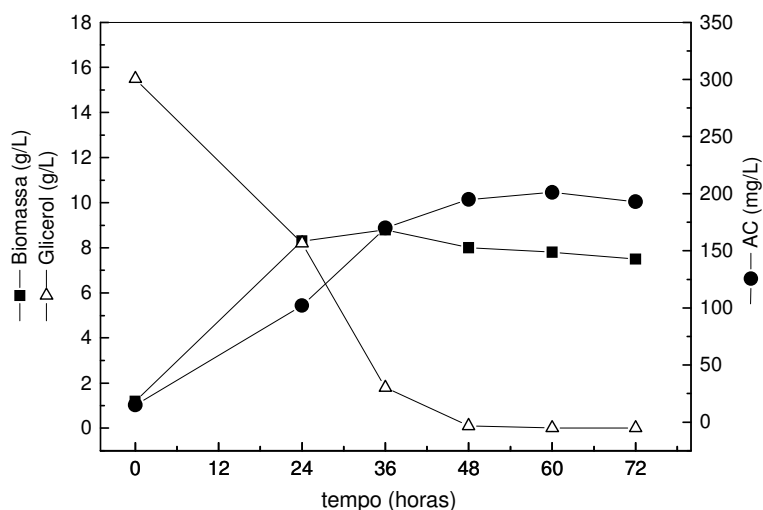


Figura 1: Resultados do Experimento F1, em meio semi-sintético contendo Soytone e arginina como fontes de nitrogênio (total de 2 g/L de nitrogênio); pH $6,8 \pm 0,1$, aeração 1 vvm, 28°C, manutenção de OD em torno de 50% relativo à saturação.

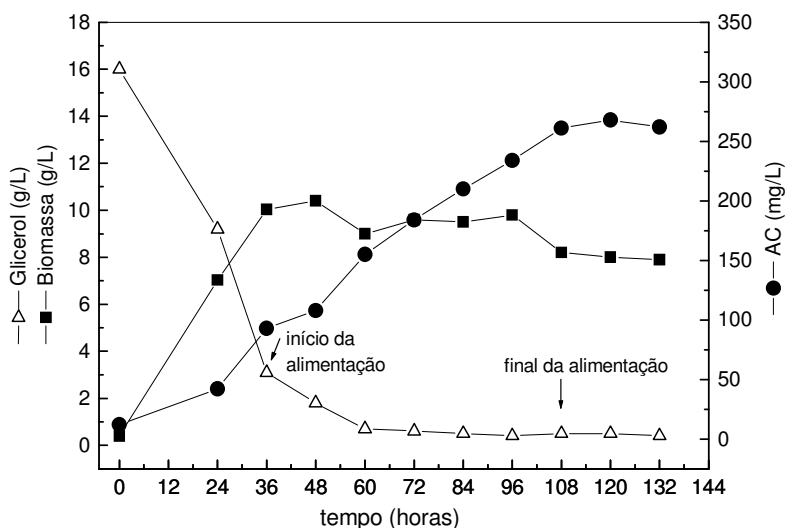


Figura 2: Resultados do Experimento F2, em meio semi-sintético contendo Soytone e arginina como fontes de N; volume inicial 3,0 L, volume final 4,5 L, pH $6,8 \pm 0,1$, aeração 1 vvm, 28°C, manutenção de OD em torno de 50% relativo à saturação.

O meio semi-sintético contendo Soytone e arginina como fontes de nitrogênio utilizado na batelada mostrou-se bastante adequado, gerando boa concentração celular (9 a 11 g células/L) e produção bem satisfatória (~ 175 mg/L em 60 h). A composição do meio suplementar estabelecida para o Experimento F2, contendo glicerol, arginina e fosfato a partir de 36 h de processo foi eficiente na manutenção da atividade celular e resultou em velocidade crescente de produção de AC, que atingiu cerca de 280 mg/L em 108 h.

Assim, os meios de cultivo utilizados, aliados às condições operacionais, estabelecidas para o fermentador, como o instante inicial de suplementação e a vazão de alimentação, tornaram este processo em batelada alimentada potencialmente viável e passível de melhorias. Tais melhorias podem ser obtidas através de planejamento de experimentos variando-se condições de operação como vazão de alimentação e concentração dos componentes do meio suplementar. É também importante desenvolver estratégias para contornar a degradação de AC no meio de cultivo que, segundo Roubos et al. (2002), comporta-se como uma reação de primeira. Esta degradação traduz-se em um sério problema em fermentações de longa duração, como é o caso do processo em batelada alimentada.

Referências Bibliográficas

- BAGGALEY, K.H.; BROWN, A.G.; SCHOFIELD, C.J. (1997), Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. *Natural Products Reports*, v.14, n.4, p.309-333.
- BIRD, A. E.; BELLIS, J.M.; GASSON, B.C. (1985) Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole, *Analyst*, v.107, p1241-1245.
- BUTTERWORTH, D. (1984) Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, ed. E.J.Vandamme, NY, M. Dekker, Inc., p.3-31.
- CHEN, K-C.; LIN, Y-H.; TSAI, C-M.; HSIEH, C-H.; HOUNG, J-Y. (2002) Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with glycerol feeding. *Biotechnol. Lett.*, v.24, p.455-458.
- CHEN, K.C.; LIN, Y.H.; WU, J.Y.; HWANG, S.J. (2003), Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding, *Enzyme and Microbial Technology*, v.32, p.152-156.
- DE LAAT, W. & KRABBEN P. (2000) Fermentation process to produce clavulanic acid at low concentration of free amino acids. DSM Patents & Trademarks, Delft, NL, PCT, WO 00/01840
- FOULSTONE, M. & READING, C. (1982) Assay of amoxillin and clavulanic acid, the components of augmentin, in biological fluids with high-performance liquid chromatography. *Antimicrob. Agents Ch.*, v.22, p.753-762.
- GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA-NETO, A.; AZEVEDO, A. G.; BADINO, A. C.; HOKKA, C. O. Improvement of clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in medium containing soybean derivatives. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 15, p. 623-627, 1999.
- KIESER, T.; CHATER, K.F.; BIBB, M.J.; BUTTNER, M.J. e HOPWOOD, D.A. (2000), *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation, 613p.
- KIRK, S.; AVIGNONE-ROSSA, C.A.; BUSHELL, M.E. (2000), Growth limiting substrate affects antibiotic production and associated metabolic fluxes in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology Letters*, v.22, p.1803-1809.
- LAMBERT, M. & NEISH, A.C. (1950) Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions, *Can. J. Research*, v.28, n.3, p. 83-89.
- ROUBOS, J.A.; KRABBEN, P.; DE LAAT, W.T.A.M.; BABUŠKA, R.; HEIJNEN, J.J. (2002), Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations. *Biotechnology Progress*, v.18, p.451-457.
- SUTHERLAND, R. (1991) β -lactamase inhibitors and reversal of antibiotic resistance. *TiPS*, v.12, p.227-232.
- YAMANÉ, T. e SHIMIZU, S. (1984), Fed-batch techniques in microbial processes. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, v.30, p.147- 194.