

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

Avaliação da produção de toxina tetânica por *Clostridium tetani* cultivado  
por processos fermentativos descontínuo e descontínuo alimentado

Fernando Fratelli

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador:  
Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo  
2007

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

Avaliação da produção de toxina tetânica por *Clostridium tetani* cultivado por processos fermentativos descontínuo e descontínuo alimentado

Fernando Fratelli

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador:  
Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo  
2007

**Ficha Catalográfica**

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

F844a Fratelli, Fernando  
Avaliação da produção de toxina tetânica por *Clostridium tetani* cultivado por processos fermentativos descontínuo e descontínuo alimentado / Fernando Fratelli. -- São Paulo, 2007.

155p.

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

Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de

1. Fermentação : Tecnologia química 2. Bioquímica industrial 3. Biotecnologia 4. Vacina : Farmacologia I. T. II. Carvalho, João Carlos Monteiro de, orientador.

660.28449 CDD

Fernando Fratelli

Avaliação da produção de toxina tetânica por *Clostridium tetani* cultivado por processos fermentativos descontínuo e descontínuo alimentado

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho  
Orientador/presidente

Prof. Dr. Sunao Sato  
1º. examinador

Prof. Dr. José Abrahão Neto  
2º. examinador

Prof. Dr. Rosalvo Guidolin  
3º. examinador

Profa. Dra. Flávia Saldanha Kubrusly  
4º. examinador

São Paulo, 04 de maio de 2007.

A Deus por ter permitido a realização deste trabalho

A meu pai (in memoriam) e a minha mãe pela  
educação e formação de caráter a mim destinado

A minha esposa pelo carinho e incentivo,  
imprescindível na realização desta Tese

## AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, o nosso reconhecimento pela disposição em ser o orientador desta Tese, destacando sua cordialidade e amizade, proporcionando-nos grande aprendizagem.
- ❖ A Dra. Hisako Gondo Higashi, Diretora da Divisão Bioindustrial, pelo seu constante apoio e estímulo.
- ❖ Ao Prof. Dr. Rosalvo Guidolin pela sua colaboração na revisão desta Tese, assim como seu incentivo no decorrer dos trabalhos.
- ❖ A Sra. Tatiana Joly Siquini pela sua colaboração na realização dos diversos testes de controle realizados nos experimentos.
- ❖ Ao Sr. Marcelo Estima de Abreu pela colaboração no preparo dos Meios de Cultura.
- ❖ A Sra. Sonia Regina Pereira Carvalho pela colaboração no preparo dos Meios de Cultura e durante os ensaios, nas amostragens e preparo das amostras.
- ❖ A Sra. Rosangela Pinto de Oliveira pela sua colaboração na lavagem e preparo dos materiais utilizados nos ensaios.
- ❖ Ao Sr. Eleno José da Silva pela sua colaboração na esterilização dos Meios de Cultura e materiais utilizados nos experimentos.
- ❖ A Sra. Inacilma Rossato pela sua colaboração na confecção das etiquetas para identificação dos ensaios.
- ❖ A todos os funcionários da Seção de Vacinas Anaeróbicas que direta ou indiretamente colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.
- ❖ Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela dedicação a nós prestada.

**Confiai no Senhor perpetuamente, porque  
o Senhor Deus é uma rocha eterna ( Isaiás 26:4 )**

## RESUMO

A toxina tetânica é uma proteína sintetizada pelo bacilo *Clostridium tetani* que após destoxificação através da ação do formol, continua apresentando propriedades antigênicas e imunogênicas, obtendo a denominação toxóide tetânico. A síntese dessa proteína ocorre quando esse bacilo encontra-se na sua forma vegetativa e em meio de cultura específico relativamente complexo contendo glicose e peptonas. O efeito simultâneo de diferentes níveis de glicose ( $G_o$ ) e *N-Z Case TT*<sup>®</sup> ( $NZ_o$ ) como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, na produção de toxina tetânica foi investigada nesta primeira parte do trabalho em cultivo estático por meio de planejamento fatorial em estrela com cinco níveis e avaliado por metodologia de superfície de resposta, com a finalidade de otimização do processo. O valor mais alto de toxina tetânica encontrado, correspondente a  $G_o = 9,7$  g/L e  $NZ_o = 43,5$  g/L, foi 79% maior que aqueles obtidos em condições padrões de cultivo ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Também foram realizados cultivos de *C. tetani* utilizando o processo descontínuo alimentado com diferentes protocolos para a correção da concentração de glicose no meio de cultivo ao longo do tempo em diferentes concentrações iniciais de *N-Z Case TT*<sup>®</sup>. Dois grupos de ensaios foram executados: a) experimentos realizados com a correção da concentração de glicose para 3,0 g/L nos instantes 16, 56 e 88 h e b) experimentos com correção inicial da concentração de glicose para 3,0 g/L e após esta cair para 1-1,5 g/L. O primeiro protocolo de correção da concentração de glicose e  $NZ_o = 50,0$  g/L foram as melhores condições para obtenção de toxina tetânica. Nestas condições, o título de toxina tetânica foi 300% maior que aqueles obtidos em cultivos padrão.

Palavras-chave: *Clostridium tetani*; processo descontínuo; processo descontínuo alimentado; toxina tetânica.



## SUMMARY

The tetanus toxin is a neurotoxin synthesized by the bacillus *Clostridium tetani* that, after detoxification with formaldehyde, still exhibits antigenic and immunologic properties, hence its denomination of tetanus toxoid. Such a neurotoxin is produced by cultivations of the microorganism in vegetative form on a relatively complex specific medium containing glucose and peptone. The simultaneous effects of the starting levels of glucose ( $G_o$ ) and *N-Z Case TT*<sup>®</sup> ( $NZ_o$ ) as carbon and nitrogen sources, respectively, on the production of tetanus toxin, have been investigated in this work in static cultivations by means of a five-levels star-shaped experimental design and evaluated by Response Surface Methodology (RSM) for optimization purposes. The highest final average yield of tetanus toxin, achieved at  $G_o = 9.7$  g/L and  $NZ_o = 43.5$  g/L, was 79% higher than that obtained with standard cultivations ( $G_o = 8.0$  g/L and  $NZ_o = 25.0$  g/L).

Also, there were carried out cultivations of *C. tetani* using fed-batch process at different protocols to correct the glucose concentration in the cultivation medium along the time at different initial *N-Z Case TT*<sup>®</sup> concentrations ( $NZ_o$ ). Two series of runs were performed: a) experiments with the correction of the glucose concentration to 3.0 g/L in the times 16, 56 and 88 hours and b) experiments with initial correction of the glucose concentration to 3.0 g/L and after it to drop to 1-1,5 g/L. The former protocol to correct the glucose concentration and  $NZ_o = 50.0$  g/L were the best condition to obtain tetanus toxin. In these conditions, the yield of tetanus toxin was 300% higher than that obtained with standard cultivations.

Key words: *Clostridium tetani*; batch process; fed-batch process; tetanus toxin.

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD1 ( $G_o = 4,0$ g/L e $NZ_o = 12,5$ g/L).	45
Figura 2: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD2 ( $G_o = 12,0$ g/L e $NZ_o = 12,5$ g/L).	47
Figura 3: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD3 ( $G_o = 4,0$ g/L e $NZ_o = 37,5$ g/L).	49
Figura 4: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD4 ( $G_o = 12,0$ g/L e $NZ_o = 37,5$ g/L).	51
Figura 5: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD5 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 7,3$ g/L).	53
Figura 6: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD6 ( $G_o = 2,3$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	55
Figura 7: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD7 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 42,7$ g/L).	57
Figura 8: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD8 ( $G_o = 13,7$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	59
Figura 9: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD9 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	61
Figura 10: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD10 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	63
Figura 11: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD11 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	65
Figura 12: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD12 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	67
Figura 13: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD13 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	69
Figura 14: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD14 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	71
Figura 15: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD15 ( $G_o = 4,0$ g/L e $NZ_o = 50,0$ g/L).	73

- Figura 16: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD16 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 50,0$  g/L). 75
- Figura 17: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD17 ( $G_o = 12,0$  g/L e  $NZ_o = 50,0$  g/L). 77
- Figura 18: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD18 ( $G_o = 12,0$  g/L e  $NZ_o = 42,7$  g/L). 79
- Figura 19: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD19 ( $G_o = 4,0$  g/L e  $NZ_o = 42,7$  g/L). 81
- Figura 20: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD20 ( $G_o = 4,0$  g/L e  $NZ_o = 75,0$  g/L). 83
- Figura 21: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD21 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 75,0$  g/L). 85
- Figura 22: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD22 ( $G_o = 12,0$  g/L e  $NZ_o = 75,0$  g/L). 87
- Figura 23: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD23 ( $G_o = 9,7$  g/L e  $NZ_o = 43,5$  g/L). 89
- Figura 24: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD24 ( $G_o = 9,7$  g/L e  $NZ_o = 43,5$  g/L). 91
- Figura 25: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD25 ( $G_o = 9,7$  g/L e  $NZ_o = 43,5$  g/L). 93
- Figura 26: Valores experimentais de título de toxina (Lf/mL) em relação a diferentes níveis codificados de concentrações iniciais de glicose ( $X_1$ ) e NZ Case ( $X_2$ ). ( $\blacksquare$ ) planejamento experimental inicial (Tabela 27, parte A); ( $\square$ ) expansão do planejamento experimental (Tabela 27, parte B). 101
- Figura 27: Gráfico de contorno relacionando título de toxina em função dos níveis codificados de concentrações iniciais de glicose ( $X_1$ ) e NZ Case ( $X_2$ ). 102
- Figura 28: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA1A ( $NZ_o = 25,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas. 105

- Figura 29: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA1B ( $NZ_o = 25,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas. 107
- Figura 30: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA2A ( $NZ_o = 37,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas. 109
- Figura 31: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA2B ( $NZ_o = 37,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas. 111
- Figura 32: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA3A ( $NZ_o = 50,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas. 113
- Figura 33: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA3B ( $NZ_o = 50,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas. 115
- Figura 34: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA4A ( $NZ_o = 62,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas. 117
- Figura 35: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA4B ( $NZ_o = 62,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas. 119
- Figura 36: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA5A ( $NZ_o = 25,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L). 121
- Figura 37: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA5B ( $NZ_o = 25,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L). 123
- Figura 38: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA6A ( $NZ_o = 37,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L). 125

Figura 39: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA6B ( $NZ_o = 37,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L). 127

Figura 40: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA7A ( $NZ_o = 50,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L). 129

Figura 41 Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA7B ( $NZ_o = 50,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L). 131

Figura 42 Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA8A ( $NZ_o = 62,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 80$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L). 133

Figura 43 Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA8B ( $NZ_o = 62,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 80$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L). 135

Figura 44 Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento Padrão I (cultivo descontínuo;  $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L). 137

Figura 45: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento Padrão II (cultivo descontínuo;  $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L). 139

Figura 46: Título de toxina tetânica médio final em função da concentração inicial de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> ( $NZ_o$ ): ( $\blacksquare$ ) experimentos realizados com a correção pré-determinada da concentração de glicose para 3,0 g/L nos instantes 16, 56 e 88 h; ( $\circ$ ) experimentos com correção inicial da concentração de glicose para 3,0 g/L e após esta cair para 1-1,5 g/L. 145

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Experimentos realizados com processo descontínuo.	40
Tabela 2. Experimentos realizados com processo descontínuo alimentado.	41
Tabela 3: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD1 ( $G_o = 4,0$ g/L e $NZ_o = 12,5$ g/L).	44
Tabela 4: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD2 ( $G_o = 12,0$ g/L e $NZ_o = 12,5$ g/L).	46
Tabela 5: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD3 ( $G_o = 4,0$ g/L e $NZ_o = 37,5$ g/L).	48
Tabela 6: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD4 ( $G_o = 12,0$ g/L e $NZ_o = 37,5$ g/L).	50
Tabela 7: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD5 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 7,3$ g/L).	52
Tabela 8: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD6 ( $G_o = 2,3$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	54
Tabela 9: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD7 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 42,7$ g/L).	56
Tabela 10: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD8 ( $G_o = 13,7$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	58
Tabela 11: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD9 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	60
Tabela 12: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD10 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	62
Tabela 13: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD11 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	64
Tabela 14: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD12 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	66

Tabela 15: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD13 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	68
Tabela 16: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD14 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	70
Tabela 17: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD15 ( $G_o = 4,0$ g/L e $NZ_o = 50,0$ g/L).	72
Tabela 18: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD16 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 50,0$ g/L).	74
Tabela 19: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD17 ( $G_o = 12,0$ g/L e $NZ_o = 50,0$ g/L).	76
Tabela 20: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD18 ( $G_o = 12,0$ g/L e $NZ_o = 42,7$ g/L).	78
Tabela 21: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD19 ( $G_o = 4,0$ g/L e $NZ_o = 42,7$ g/L).	80
Tabela 22: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD20 ( $G_o = 4,0$ g/L e $NZ_o = 75,0$ g/L).	82
Tabela 23: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD21 ( $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 75,0$ g/L).	84
Tabela 24: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD22 ( $G_o = 12,0$ g/L e $NZ_o = 75,0$ g/L).	86
Tabela 25: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD23 ( $G_o = 9,7$ g/L e $NZ_o = 43,5$ g/L).	88
Tabela 26: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD24 ( $G_o = 9,7$ g/L e $NZ_o = 43,5$ g/L).	90
Tabela 27: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD25 ( $G_o = 9,7$ g/L e $NZ_o = 43,5$ g/L).	92
Tabela 28 . Resultados de cultivos de <i>C. tetani</i> obtidos em diferentes concentrações iniciais de glicose ( $G_o$ ) e NZ Case TT <sup>®</sup> ( $NZ_o$ ).	94

Tabela 29: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA1A ( $NZ_o = 25,0$ g/L).	104
Tabela 30: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA1B ( $NZ_o = 25,0$ g/L).	106
Tabela 31: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA2A ( $NZ_o = 37,5$ g/L).	108
Tabela 32: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA2B ( $NZ_o = 37,5$ g/L).	110
Tabela 33: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA3A ( $NZ_o = 50,0$ g/L).	112
Tabela 34: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA3B ( $NZ_o = 50,0$ g/L).	114
Tabela 35: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA4A ( $NZ_o = 62,5$ g/L).	116
Tabela 36: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA4B ( $NZ_o = 62,5$ g/L).	118
Tabela 37: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA5A ( $NZ_o = 25,0$ g/L).	120
Tabela 38: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA5B ( $NZ_o = 25,0$ g/L).	122
Tabela 39: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA6A ( $NZ_o = 37,5$ g/L).	124
Tabela 40: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA6B ( $NZ_o = 37,5$ g/L).	126
Tabela 41: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA7A ( $NZ_o = 50,0$ g/L).	128
Tabela 42: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA7B ( $NZ_o = 50,0$ g/L).	130



Tabela 43: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA8A ( $NZ_o = 62,5$ g/L).	132
Tabela 44: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA8B ( $NZ_o = 62,5$ g/L).	134
Tabela 45: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento Padrão I (cultivo descontínuo; $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	136
Tabela 46: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento Padrão II (cultivo descontínuo; $G_o = 8,0$ g/L e $NZ_o = 25,0$ g/L).	138
Tabela 47: Resultados de cultivos de <i>Clostridium tetani</i> obtidos em diferentes condições de cultivo.	142
Tabela 48: Título final médio de toxina tetânica ( $TT_{fm}$ ) em função da concentração inicial de <i>N-Z Case TT<sup>®</sup></i> ( $NZ_o$ ) obtidos nos experimentos com processo descontínuo alimentado.	146

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	8
<b>SUMMARY</b> .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	14
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	23
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
<b>IV.1. Microrganismo</b> .....	35
<b>IV.2. Manutenção do <i>Clostridium tetani</i></b> .....	35
<b>IV.3. Meios de Cultura</b> .....	35
IV.3.1. Meio utilizado para reativação do <i>Clostridium tetani</i> liofilizado .....	35
IV.3.2. Meio IB para produção de toxina tetânica .....	35
<b>IV.4. Preparo do Inoculo</b> .....	36
<b>IV.5. Métodos de Cultivo</b> .....	36
IV.5.1. Cultivos descontínuos .....	36
IV.5.2. Cultivos descontínuos alimentados .....	36
<b>IV.6. Esterilização do Meio de Cultura</b> .....	36
<b>IV.7. Inoculação do <i>Clostridium tetani</i></b> .....	37
<b>IV.8. Acompanhamento do Cultivo</b> .....	37
IV.8.1. Determinação da concentração celular .....	37
IV.8.2. Testes realizados com o filtrado .....	38
IV.8.2.1. Determinação do Limite de Flocculação (Lf/mL) para determinação do título da Toxina Tetânica produzida .....	38
IV.8.2.1.1. Material .....	38
IV.8.2.1.2. Procedimento .....	38
IV.8.2.1.3. Interpretação da prova .....	38
IV.8.2.2. Determinação da concentração de Nitrogênio .....	39
IV.8.2.3. Determinação da concentração de Glicose .....	39
IV.8.2.4. Determinação do pH .....	39
<b>IV.9. Plano de trabalho</b> .....	39

IV.9.1. Otimização da produção de toxina tetânica por processo descontínuo...	39
IV.9.2 Produção de toxina tetânica por processo descontínuo alimentado .....	41
<b>IV.10. Avaliação dos resultados .....</b>	<b>42</b>
<b>V. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>V.1. Processo descontínuo .....</b>	<b>43</b>
<b>V.2. Processo descontínuo alimentado .....</b>	<b>103</b>
<b>VI. CONCLUSÕES .....</b>	<b>147</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>149</b>

## I. INTRODUÇÃO

O termo tétano vem da palavra Grega “ζεζαυσῶ”, que significa contração. A infecção tetânica é conhecida pelo homem desde o início da história da medicina. De fato uma descrição clara desta pode ser encontrada nos livros de Hipócrates e Aretaeus escritos há 24 séculos atrás. O Tétano tem sido considerado uma infecção terrível e ameaçadora capaz de causar morte após um intenso sofrimento. É provocado pela ação da toxina tetânica, produzida pelo *Clostridium tetani*, microrganismo anaeróbico presente no solo. Um meio de prevenir infecções por *Clostridium tetani* é a imunização com o toxóide tetânico (VANCETTO *et al.*, 1997), obtido da toxina tetânica inativada por tratamento termo-químicos. De fato, já em 1923, Ramon registrou a preparação do toxóide tetânico antigênico pela ação de formaldeído e tratamento do produto pelo calor. Um processo similar foi utilizado por Glenny e Hopkins para destoxificação da toxina bacteriana. Em 1926, Ramon e Zoeller obtiveram sucesso pela imunização de humanos com o Toxóide Tetânico (GERMANIER, 1984).

A verdadeira incidência do tétano, não é conhecida, mas está estimada entre 500.000 a 1.000.000 de casos por ano (BLECK *et al.*, 1997). A maioria dos casos ocorre nos países em desenvolvimento, com 50% deles ocorrendo em neonatos. Em, contraste, o tétano em países desenvolvidos ocorre principalmente em idosos (KARALLIEDDE *et al.*, 1995). Por outro lado, é uma das poucas doenças humanas que pode ser quase completamente controlada pela vacinação, sendo que a falta desta torna-se um grande fator de risco. No Brasil, a vacinação contra o tétano faz parte do Programa Nacional de Imunizações, instituído para o combate a seis importantes enfermidades transmissíveis: tuberculose, difteria, coqueluche, **tétano**, poliomielite e sarampo.

O toxóide tetânico e adsorvido pelo gel de hidróxido de alumínio (adjuvante) é preparado a partir da anatoxina tetânica (toxina tetânica destoxificada) diluída para que contenha 10Lf/dose. Limite de flocculação (Lf) é o título da anatoxina tetânica determinado pelo método de Ramon (NORMAS TÉCNICAS DE FABRICAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DAS VACINAS: TRÍPLICE BACTERIANA, TOXÓIDE TETÂNICO, DUPLA ADULTO, DUPLA INFANTIL, 1996).

No Instituto Butantan a toxina tetânica é produzida através de dois biorreatores (420 litros e 360 litros), interligados em circuito fechado com o sistema de filtração tangencial para separação das células (FRATELLI *et al.*, 1993). Este projeto visa ao aumento da produtividade volumétrica do título da toxina tetânica produzida (Lf/L.h), aumentando a capacidade de produção mensal. Está, assim, contribuindo para redução de custo de produção da vacina antitetânica, com economia para o Instituto Butantan e para o Estado, através da otimização da utilização de equipamentos e infra-estrutura, bem como de mão-de-obra especializada.

## II. OBJETIVOS

Este trabalho busca:

- Verificar o efeito das concentrações iniciais de glicose e de *N-Z Case* (hidrolisado de caseína) no crescimento celular de *Clostridium tetani* e formação de toxina em cultivos estáticos;
- Obter equações de regressão multivariável que possam representar satisfatoriamente a relação entre as variáveis independentes estudadas que interferem no processo e no título de toxina no caldo fermentado em cultivos estáticos.
- Avaliar a produção de toxina por processo descontínuo alimentado de fermentação.

### III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Verifica-se que atualmente tem-se dado uma grande importância aos estudos toxicológicos e imunológicos referentes às aplicações de diferentes toxinas. Porém, a literatura carece de informações a respeito de processos fermentativos para cultivo do *Clostridium tetani* com vistas à obtenção de toxina tetânica, matéria-prima para elaboração do toxóide, embora este microrganismo venha sendo muito utilizado por empresas privadas, principalmente com o intuito da produção de vacinas antitetânicas para uso animal. Resguardando o interesse industrial, provavelmente as pesquisas desenvolvidas nessas empresas com vistas a aumentar a capacidade produtiva não são publicadas.

No entanto, embora carente de estudos, a produção de toxina tetânica ainda vem sendo estudada, com publicação sendo feita a partir de Universidades e/ou Institutos Governamentais, principalmente. Por exemplo, em trabalho recente (De LUCA *et al.*, 1997), desenvolveram um sistema para arraste dos gases formados na fermentação com borbulhamento de nitrogênio, resultando no aumento da formação da toxina tetânica.

Sem dúvida, dentre as inúmeras variáveis que interferem num processo fermentativo, o meio de cultivo deve ser destacado, pois é um fator determinante para o sucesso do processo. Pirt (1975), à parte das fontes de energia, classificou os nutrientes de um meio de fermentação nos seguintes grupos: a) fonte dos elementos “principais”- C, H, O, N; b) fonte dos elementos “secundários”- P, K, S, Mg; c) vitaminas e hormônios; d) fontes de “traços” de elementos, ou seja, requerimentos de elementos em quantidades mínimas para o crescimento microbiano (por exemplo, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo).

Na formulação de um mosto para fermentação deve-se levar em conta a necessidade desses nutrientes, lembrando que o meio, além de propiciar o desenvolvimento microbiano, deve favorecer a formação do produto que se deseja (CARVALHO & SATO, 2001a). Podem ser citados casos em que na formulação de um meio de cultivo também ocorra a adição de substâncias que não têm função direta na formação celular, mas que afetam os mecanismos de controle celular,

como por exemplo indutores gratuitos (BIRK *et al.*, 1997; GOTO *et al.*, 1998) e tensoativos (MASROOR & CHANDRAS, 1989).

A fonte de carbono é um item de extrema importância na formulação de um meio de cultivo. Tem a função de suprir energia, para o anabolismo e manutenção da célula, e cadeia carbônica tanto para a formação de biomoléculas que integram a célula como produtos, onde se incluem peptídeos. No caso de formação de peptídeos, onde as toxinas de *Clostridium tetani* estão inseridas, pode exercer um papel muito importante nos mecanismos de indução e repressão catabólica. Normalmente, o carbono é a fonte limitante de um crescimento microbiano. Sua quantidade no meio de cultivo será função de quanto se deseja produzir do microrganismo ou produto, levando em conta a relação estequiométrica entre o substrato e a quantidade de produto, embora haja casos em que isso não seja possível, como por exemplo, na produção de toxinas e antibióticos. De uma maneira geral, grande parte dos estudos iniciais para utilização desta fonte refere-se à utilização de substratos mais simples como açúcares, ácidos e álcoois (TONG & BAJENDRA, 1992; HAYASHI *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 1999) em meios quimicamente definidos. O uso de fontes de carbono mais simples se deve, em parte, ao fato da maioria dos microrganismos estudados não fermentarem polímeros e à maior facilidade em elucidar vias bioquímicas e/ou controles envolvidos na formação do produto.

Se por um lado concentrações mais elevadas de glicose podem levar a uma concentração celular maior, em função de maior suprimento energético e de cadeia carbônica para formação de nova célula, por outro, como mencionado, a produção de peptídeo pode sofrer repressão catabólica, fato comum na formação de diversos produtos sintetizados tanto por fungos como bactérias (BIRK *et al.*, 1997; GOTO *et al.*, 1998). Também se sabe que a partir de uma determinada concentração da fonte de carbono, que decresce no decorrer do cultivo, esse efeito de repressão deixa de existir, havendo a liberação da formação do produto.

Assim, o estudo da concentração inicial da fonte de carbono tem uma importância fundamental no desenvolvimento de um meio de cultivo e será avaliada neste trabalho.



Outro elemento de suma importância numa formulação de meio de cultivo é o nitrogênio. É ele que fornece o grupo amino para moléculas que o contenham em sua estrutura, incluindo os ácidos nucléicos e aminoácidos e, portanto, interfere efetivamente no crescimento celular e formação de peptídeos. Também para este elemento há estudos visando o uso de fontes quimicamente definidas, como por exemplo, nitratos, sais de amônio, uréia, amônia, etc (KUNDU & DAS, 1970; TONG & BAJENDRA, 1992; ZHEREBTSOV & NASONOVA, 1989), ou complexas tais como água de maceração de milho, extrato de levedura, farinha de peixe, farelo de amendoim desengordurado, entre outras (GREASHAM, 1993), que, além de fornecer o nitrogênio propriamente dito, pode suprir o meio também com vitaminas, aminoácidos e sais.

Normalmente, são avaliadas num processo de otimização de um meio de cultivo as fontes orgânicas (incluindo aqui grande parte das fontes complexas) e as inorgânicas (HAYASHI *et al.*, 1993; PANDEY *et al.*, 1994; RAMACHANDRAN *et al.*, 1979; SINKAIR & LEWIS, 1980).

As fontes de nitrogênio complexas, normalmente são orgânicas e além de fornecer material nitrogenado, estando inseridos aqui os aminoácidos, também fornecem cadeia carbônica, através do  $\alpha$ -cetoácido correspondente. Assim, como a fonte de nitrogênio a ser utilizada neste trabalho, que é o *N-Z Case* (LATHAM *et al.*, 1962), também se verificará o efeito de sua concentração inicial no crescimento do *Clostridium tetani*, bem como na produção da toxina tetânica.

Um procedimento muito utilizado atualmente para otimização de processos fermentativos é o método estatístico que utiliza superfície de resposta (WIND *et al.*, 1994; VISWANATHAN & KULKARNI, 1995; NAIR & PANDA, 1997). Foi descrito inicialmente por Box *et al.* (1978), como sendo uma estratégia para otimização simultânea de diversas variáveis, permitindo, por meio de cálculos estatísticos, verificar se existe interação entre as variáveis independentes, com possibilidade de chegar ao ponto de ótimo num processo com um número reduzido de experimentos, comparado aos métodos tradicionais, propiciando uma economia de tempo e de recursos. A obtenção de equações envolvendo todas as variáveis que influenciam no processo permite a otimização simultânea de todos os fatores e o emprego de metodologias que possibilitem a otimização de várias variáveis dependentes ao

mesmo tempo, como por exemplo crescimento microbiano e produção de toxina tetânica. Essa metodologia será utilizada no trabalho proposto para otimização das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio que levarão a maiores títulos de toxina tetânica no meio fermentado.

A partir de resultados obtidos nesta primeira etapa de otimização utilizando o processo descontínuo, atualmente empregado na produção de toxina tetânica (FRATELLI *et al.*, 1993), a utilização de diferentes condições experimentais de concentração das fontes de carbono e nitrogênio, permite determinar as concentrações desses nutrientes que maximizam a formação desse produto. Assim, o emprego de processos alternativos que procurem manter condições constantes dentro da dorna, como o contínuo (ZACHARIAS & BJORKLUND, 1968) e o descontínuo alimentado, poderiam ser indicados. Se consideradas as dificuldades da manutenção de condições isentas de contaminação por longos períodos de tempo para o processo contínuo, o uso deste seria, em princípio, menos promissor que o descontínuo alimentado.

Dentre as diversas aplicações do processo descontínuo alimentado, Carvalho & Sato (2001b) destacam seu uso quando se pretende: minimizar a formação de produtos tóxicos de metabolismo, evitar inibição por substrato ou precursores, contornar problemas freqüentes de estabilidade em processo contínuo, adequar processo fermentativo a condições operacionais, suprir nutrientes específicos em meios de cultura clássicos e minimizar efeitos do controle do metabolismo celular. Assim, neste trabalho, a utilidade deste processo está muito ligada principalmente à minimização dos efeitos do controle do metabolismo celular, através da manutenção de concentrações adequadas da fonte de carbono e de nitrogênio no meio de cultivo.

A formação de produtos tóxicos de metabolismo vem sendo reduzida em diversos processos envolvendo o cultivo de *Escherichia coli* e células animais. Na produção de fitase por *E. coli*, Kleist *et al.* (2003) estudaram diferentes estratégias de alimentação de glicose em cultivos realizados em biorreatores, mantendo baixos níveis de oxigênio dissolvido no meio de cultura. Verificaram que a alimentação controlada da fonte de carbono por sistema automatizado, mantendo uma concentração de glicose da ordem de 0,2 g/L, mesmo em condições de baixos níveis

de oxigênio dissolvido, foi eficiente na minimização da formação de acetato, considerado tóxico para este microrganismo (PAN *et al.*, 1987). A formação de altos níveis de proteína recombinante é dependente da obtenção de altas densidades celulares (FAULKNER *et al.*, 2006). De fato, estes autores, cultivando *E. Coli* por processo descontínuo alimentado, mantiveram a concentração de glicose no meio de cultivo em valores inferiores a 0,04 g/L, de forma que a velocidade específica de crescimento foi mantida em valores inferiores àqueles nos quais há a formação de acetato. Assim, conseguiram altas concentrações celulares (53 g/L, expressa em massa seca), obtendo uma atividade final de fenilalanina desidrogenase no meio líquido igual a 129 U/mL.

Também para o *Vibrio cholerae*, o acetato tem conseqüências negativas, reduzindo consideravelmente o crescimento e formação de proteínas recombinantes (MARÉ *et al.*, 2003). A diminuição da formação de acetato e manutenção de baixos níveis deste também foram conseguidas por Maré *et al.* (2003) no cultivo do *Vibrio cholerae* para produção da toxina B, utilizada no preparo da vacina contra a cólera. Para tanto, utilizaram o processo descontínuo alimentado, controlando a adição de glicose pela resposta de concentração de oxigênio dissolvido, evitando que houvesse uma limitação deste com conseqüente produção de ácido acético. Com essa técnica, conseguiram aumentar a concentração final de bactéria de 4 g/L (processo descontínuo) para 20-23 g/L da bactéria (expressa em massa seca).

No cultivo de *Kluyveromyces marxianus*, um microrganismo que tem sido considerado o mais adequado para bio-conversão da lactose do soro de leite, a presença de altos níveis de substrato podem levar à formação de metabólitos tóxicos, como etanol, com uma redução da formação de biomassa. Visando a minimização da formação deste metabólito, de tal forma que pudesse ser otimizada a formação da biomassa de *K. marxianus* a partir de meios de cultivo com lactose como fonte de carbono, Lukondeh *et al.* (2005) comparam a produção deste microrganismo pelos processos descontínuo e descontínuo alimentado. Nos cultivos descontínuos alimentados, com aeração, iniciaram com uma concentração inicial de lactose igual a 10 g/L e quando esta decresceu a 0,5 g/L começaram a alimentar por pulsos restabelecendo a cada 1-2 horas a concentração de lactose para 20 g/L, até estabilização do crescimento celular. Com isso evitaram a formação de etanol, e,

dessa forma, conseguiram um fator de conversão de substrato em células de 0,38 g/g e uma concentração celular final de 105 g/L, valor este 7 vezes maior que aquele obtido em cultivos descontínuos, o que demonstrou que a batelada alimentada é viável economicamente.

Em cultivos de células animais, as concentrações de células e de produtos finais são freqüentemente baixas devido a acumulação de produtos finais tóxicos, tais como amônia e lactato e/ou depleção de nutrientes essenciais. Visando uma diminuição da formação desses metabólitos tóxicos no cultivo de células de hibridoma, Xie & Wang (1994), através de uma alimentação estequiométrica de nutrientes, conseguiram manter níveis adequados destes no meio de cultivo, de forma que as velocidades específicas de formação de lactato e de amônia foram 26 vezes e 50 vezes, respectivamente, menores que aquelas obtidas em cultivos por batelada. Pôde ser evidenciado que o processo descontínuo alimentado possibilitou um aumento nas concentrações de células e de anticorpo monoclonal de 5 e 10 vezes, respectivamente.

A inibição por substrato ou precursores podem ser evitadas com o processo fermentativo descontínuo alimentado, como foi demonstrado no trabalho de Carvalho *et al.* (2004). No cultivo de *Arthrospira platensis* suplementado com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fonte de nitrogênio conseguiram prevenir a toxicidade por amônia no meio cultivado, o que possibilitou a resultados de concentração e produtividade celular comparáveis aos obtidos cultivos descontínuos com  $\text{KNO}_3$ , fonte comumente empregada no cultivo de *A. platensis*.

Na produção de sorbose, um intermediário da síntese da vitamina C, Giridhar & Srivastava (2000) conseguiram reduzir o efeito inibitório por sorbitol no crescimento celular quando cultivaram *Acetobacter suboxydans* por processo descontínuo alimentado. Os autores citados, com uma concentração inicial de 200g/L de sorbitol, em processo descontínuo, obtiveram após 14 horas de fermentação 100% de conversão, com produtividade de 14,2g/L/h. Na utilização da fermentação descontínua alimentada, iniciaram com uma concentração de 100g/L de sorbitol e começaram a alimentação com uma solução deste após 8 horas de cultivo, quando sua concentração era de 8,6 g/L. A alimentação da solução de substrato (600 g/L) se estendeu até 13 horas de cultivo, sendo adicionada com uma

vazão de 0,36L/h. Com isso foi possível adicionar o equivalente a 320 g/L de sorbitol e obter 99% de conversão após 18 horas de fermentação, com uma produtividade de 17,7g/L.

Mesmo nutrientes de baixa potencialidade tóxica, dependendo de sua concentração, podem inibir um microrganismo que os utilizam como fonte de carbono. Um exemplo disso é a glicose como fonte de carbono para produção de ácido láctico por *Lactobacillus casei*. Ding & Tan (2006) desenvolveram um estudo para produção de ácido láctico por *Lactobacillus casei*, comparando o processo de fermentação descontínua- usado atualmente para produção industrial de ácido láctico- com o processo descontínuo alimentado. No experimento com fermentação descontínua os autores mantiveram o meio de cultura padrão onde a concentração de glicose foi de 140g/L, e, após 84 horas de cultivo, obtiveram uma concentração de ácido láctico de 112,5g/L, uma produtividade de 1,34g/L/h e concentração celular por volta de 2,55g/L (expressa em massa seca). Nos experimentos com fermentação descontínua alimentada os autores avaliaram várias formas de alimentação de glicose, incluindo alimentação por pulsos e contínuas, com vazões constantes e exponencialmente crescentes. Os melhores resultados dos processos descontínuos alimentados sem adição de extrato de levedura na solução de glicose de alimentação foram obtidos quando trabalharam com vazão exponencialmente crescente, a partir do início da fase logarítmica de crescimento. Nestas condições, após 84 horas de cultivo, obtiveram concentração de ácido láctico de 157,5g/L, produtividade de 1,88g/L/h e concentração celular de 3,66g/L. Adicionalmente, a inclusão de 1% de extrato de levedura no meio de alimentação de glicose possibilitou aumento de todos os parâmetros avaliados, e obtiveram, após as 84 horas de cultivo, concentrações de ácido láctico e células correspondentes a 180g/L e 4,30 g/L, respectivamente, bem como produtividade de 2,14g/L/h. Assim, pôde-se concluir que o processo descontínuo alimentado, por evitar fenômenos de inibição por substrato, levou a um aumento na produção de ácido láctico.

O processo descontínuo alimentado também é indicado em substituição ao processo contínuo em condições que este não se apresenta estável, ou seja: em casos de contaminação; possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas, resultando na seleção de mutantes menos produtivos; dificuldades de

manutenção de homogeneidade no reator, quando se trabalha com baixas vazões, ou quando o caldo adquire comportamento pseudo-plástico, como é o caso do cultivo de fungos filamentosos; dificuldades de operação em estado estacionário em determinadas situações (formação de espuma, crescimento do microrganismo nas paredes do reator, ou ainda, nos sistemas de entrada e saída de líquidos).

Sun *et al.* (2006) estudaram os processos descontínuo e descontínuo alimentado para otimizar a produção de eritropoetina por células HEK 293 EBNA1. Quando estas células foram transferidas de frascos agitados para o biorreator, no processo descontínuo alimentado o meio de cultura foi enriquecido, depois de 2 dias, com uma mistura de meio de cultura, solução de aminoácidos e glicose. Embora essa complementação não tenha levado a um aumento da densidade de células viáveis, que foi de  $1,9 \times 10^6$  células/mL para os dois processos de cultivo, estendeu a manutenção da viabilidade celular por um período de dois dias a mais se comparado com o processo descontínuo. Dessa forma, houve um incremento na produção de eritropoetina de 18,1 mg/L no processo de batelada para 33,6 mg/L para o processo descontínuo alimentado, representando um aumento de 86%. Ademais, considerando a possibilidade do aumento de volume útil do biorreator quando usaram o processo descontínuo alimentado, houve uma produção 165% quando da utilização deste processo.

Quanto a adequação do processo fermentativo a condições operacionais podemos citar o trabalho realizado por Luna *et al.* (2004), onde os autores substituíram  $\text{KNO}_3$  por uréia como fonte de nitrogênio no cultivo de *Spirulina platensis*, por se tratar de um sal de menor custo. Sendo a uréia lábil nas condições de cultivo seja pela ação de urease e/ou pH alcalino do meio de cultivo, tiveram de adicioná-la parceladamente de forma a evitar a formação excessiva de amônia, pois em concentrações superiores a 2 mM é tóxica para esta cianobactéria.

Em estudos realizados com cultivos de *Mortierella alpina* para produção do ácido araquidônico (ARA; 20:4, n-6), um importante constituinte de membranas biológicas e precursor de várias moléculas importantes como prostaglandinas, entre outras, tendo um importante papel na alimentação infantil, muitos pesquisadores tem avaliado o processo descontínuo e descontínuo alimentado em várias escalas, como Hwang *et al.* (2005). Esses autores mostraram em seus experimentos o aumento de

rendimento do ARA utilizando o processo descontínuo alimentado, combinando a alimentação de glicose como fonte de carbono e  $\text{NH}_4\text{OH}$  para simultaneamente controlar o pH e fornecer nitrogênio para o microrganismo. Obtiveram concentração de ARA igual a 4,8g/L em 6 dias (produtividade de 0,8 g/L.d) e 18,8g/L em 12,5 dias (1,50 g/L.d) nos processos descontínuo e descontínuo alimentado respectivamente.

D-Ribose é um carboidrato presente naturalmente no ácido ribonucléico e tem sido muito usado para síntese química de riboflavina, que pode ser usada tanto para fins farmacêuticos como também em suplementos alimentares cosméticos e alimentos. *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumillus* que acumulam D-ribose têm sido isolados e caracterizados como transcetolase mutantes. Park *et al.* (2004), trabalhando com *Bacillus subtilis*, estudaram a biossíntese de D-ribose com processo descontínuo e descontínuo alimentado. No processo descontínuo utilizando xilose e glicose como fontes de carbono, o valor máximo de concentração celular foi de 4,78 g/L (expressa em massa seca) em 28 horas de cultivo, com uma concentração máxima de D-ribose de 23,0 g/L. No processo descontínuo alimentado o valor máximo obtido de concentração celular foi de 6,0 g/L e uma concentração máxima de D-ribose de 43,5 g/L em 52 horas de cultivo. Embora a produtividade em D-ribose dos dois processos tenha sido da mesma ordem de grandeza (aproximadamente 0,8 g/L.h), o processo descontínuo alimentado possibilitou o acúmulo do dobro da concentração do produto no meio de cultivo, o que contribui para diminuir o custo de separação e da formação de resíduos.

O processo descontínuo alimentado também tem sido aplicado para suprir carências específicas de nutrientes em cultivos de células animais. Pode ser observado pelo trabalho de Kim *et al.* (2000), que estudaram o cultivo de células de inseto em meio de Grace, que a adição de aminoácidos ou extrato aquoso de *Saccharomyces cerevisiae* (*yeastolate*) a partir do nono dia de cultivo favorece o retorno do crescimento celular, de forma a eliminar a carência desses nutrientes, mas exige uma quantidade maior de fornecimento de oxigênio ao sistema.

O processo descontínuo alimentado também vem sendo utilizado na produção de aminoácidos (YAMANE, 1984), em processos em que se trabalha com mutantes auxotróficos, visando reduzir a formação de produtos que inibam e/ou

reprimam as enzimas que levam à formação do aminoácido desejado (CARVALHO & SATO, 2001).

Sabe-se que em microrganismos, a glicose ou outras fontes de carbono rapidamente metabolizáveis reprimem a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas à formação de substâncias não diretamente relacionadas com o crescimento celular (CARVALHO & SATO, 2001b). Este fenômeno é conhecido como repressão catabólica (GANCEDO, 1992). A formação de muitos peptídeos está sujeita a essa regulação repressiva. Por exemplo, uma importante técnica para superar repressão catabólica na biossíntese de enzimas é a cultura por batelada alimentada em que a concentração de glicose no meio em fermentação é mantida baixa, onde o crescimento é restringido, e a biossíntese de enzima desreprimida (YOSHIDA *et al.*, 1973; IMAI *et al.*, 1994).

Muito ligado à repressão catabólica está um mecanismo de regulação denominado indução (CARVALHO & SATO, 2001b). Também é chamado de desrepressão, uma vez que os genes que codificam a síntese de enzimas induzidas estão usualmente reprimidos e que, em presença de um substrato e/ou indutor, são desreprimidos, liberando a síntese da respectiva enzima. Muitas enzimas catabólicas encontram-se nesta categoria (WANG *et al.*, 1979). Por exemplo, em processos fermentativos cujo produto seja a proteína recombinante, a indução de proteases se dá quando ocorre a diminuição da concentração de nitrogênio no meio (YOON & KANG, 1994). Trabalhando com *E.coli* recombinante para produção de somatotropina bovina, Yoon & Kang (1994) conseguiram evitar que esta fosse degradada por proteases, por meio da adição de extrato de levedura como fonte de nitrogênio orgânica, o que evitou a indução (desrepressão) dos genes que controlam a formação de proteases.

Wen *et al.* (2006) descrevem o cultivo descontínuo alimentado de *Saccharomyces cerevisiae* T65 para a produção de glutatona, utilizando glicose como fonte de carbono, com adição de aminoácidos no decorrer do cultivo. Neste microrganismo, o etanol é formado quando a concentração de substrato é superior a um valor crítico (efeito Crabtree), resultando na diminuição da produtividade. Nesse trabalho, os autores monitoraram continuamente a concentração de etanol no meio de cultivo e a adição da fonte de carbono que foi controlada de forma que não



houvesse acúmulo deste álcool no meio de cultivo. Em cultivos aerados, mantendo a concentração de etanol abaixo de 0,3%, pelo ajuste da vazão de alimentação de glicose, foi possível a obtenção de concentrações de células e de glutatona da ordem de 140 g/L (expressa em massa seca) e 1.730 mg/L, respectivamente, em 57 horas. Esses resultados foram significativamente maiores que os obtidos em condições não controladas- onde a concentração de etanol atingiu 3,5%- com concentrações de biomassa e glutatona após 48 horas de 38,5 g/L e 146,6 mg/L, respectivamente.

Zhang *et al.* (2006) avaliaram o cultivo de *Bacillus subtilis* WB600 (pMA5) pelos processos descontínuo e descontínuo alimentado para produção de Penicilina G acilase (enzima que atua em penicilinas para produzir o ácido 6-aminopenicilínico). Nesse processo, utilizaram amido, que não apresentou efeito de repressão. No entanto, em cultivos descontínuos, devido a limitação da fonte de carbono, somente foi possível a obtenção de atividade enzimática correspondente a 378 U/L. Para melhorar a produção, os autores resolveram utilizar o processo descontínuo alimentado. Devido à insolubilidade do amido e a viscosidade da suspensão de amido tratada termicamente, tiveram que solubilizá-la parcialmente por tratamento enzimático para que pudesse ser utilizada satisfatoriamente como uma suspensão nutriente. O tratamento com alfa-amilase levou à produção de amido que, contendo glicose como sub-produto, poderia reprimir a biossíntese da enzima desejada. No entanto, os autores, através do controle da alimentação da suspensão de amido, conseguiram a manutenção da concentração de glicose em níveis não detectáveis. Combinando a estratégia de alimentação da suspensão de amido parcialmente hidrolisada (158 g/L), enriquecida de triptona (50 g/L), foi possível a obtenção de uma atividade de Penicilina G acilase de 1960U/L, ou seja, 5,2 vezes maior que a atividade atingida pelo processo de fermentação descontínua.

Na produção de metabólitos secundários, a repressão enzimática é um mecanismo bastante importante. Por exemplo, na produção de cefalosporina por *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, Cruz *et al.* (1999), em reatores com 4 litros de meio de cultivo, verificaram que quando este microrganismo crescia em presença simultânea de glicose e sacarose, a produção do antibiótico iniciou-se quando a concentração de glicose era inferior a 3 g/L e o aumento de velocidade da

biossíntese do antibiótico somente ocorreu quando do esgotamento da glicose e início do consumo da sacarose, com uma concentração final de 1,2 mg/L. A partir desses resultados, realizaram cultivos usando apenas glicose como fonte de carbono, por processo descontínuo alimentado. Partindo de uma concentração de 20 g/L de glicose, quando esse valor praticamente se tornou igual a zero (após 37 horas de cultivo), a alimentação com uma vazão mássica de 0,92g/h foi adequada para manutenção da concentração de glicose em níveis próximos de zero, evitando que houvesse repressão por glicose. Nestas condições, conseguiram obter uma concentração de cefalosporina da ordem de 2,2 mg/L no meio fermentado.

Em vista às referências bibliográficas compulsadas, procuramos obter informações sobre o comportamento do *Clostridium tetani*, em diferentes condições experimentais relacionadas às fontes de carbono e nitrogênio, bem como avaliar a produção da toxina tetânica - matéria prima para a preparação de vacina contra o tétano - por processo descontínuo e descontínuo alimentado, que ora apresentamos.

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

**IV.1. Microrganismo:** *Clostridium tetani* – Harvard Caracas, proveniente do Instituto de Saúde Pública do Chile. Para cada tipo de cultivo (item IV.5) foi utilizado um Lote Trabalho (item IV.2) diferente.

**IV.2. Manutenção do *Clostridium tetani*:** A cepa (Lote Trabalho) é mantida na forma liofilizada e armazenada à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### IV.3. Meios de Cultura

IV.3.1. Meio utilizado para reativação do *Clostridium tetani* liofilizado: Meio de tioglicolato fluido.

IV.3.2. Meio IB para produção de toxina tetânica : Meio base de Müller, modificado por Latham (LATHAM *et al.*, 1962), cuja composição é apresentada a seguir.

- Glicose .....	8 g/L
- N-Z Case TT .....	25,0 g/L
- Cloreto de Sódio .....	2,5 g/L
- Sulfato de Magnésio .....	0,1 g/L
- Biotina .....	0,008 $\mu\text{g/L}$
- Vitamina B <sub>12</sub> .....	0,001 $\mu\text{g/L}$
- Cloridrato de Tiamina .....	0,25 mg/L
- Riboflavina .....	0,25 mg/L
- Cloridrato de Piridoxina .....	0,25 mg/L
- Pantotenato de Cálcio .....	1 mg/L
- Ácido Nicotínico .....	0,25 g/L
- Uracil .....	1,25 mg/L
- L-Cistina .....	0,125 g/L
- Cloreto de Ferro III 6H <sub>2</sub> O .....	32 mg/L

As concentrações iniciais de glicose e de N-Z Case TT<sup>®</sup> foram parâmetros avaliados neste trabalho, sendo que nos cultivos descontínuos seus valores variaram de acordo com o exposto na Tabela 1 (item IV.9.1). Nos cultivos por processo descontínuo alimentado, o valor inicial de glicose foi de 3,0 g/L e as concentrações de N-Z Case TT<sup>®</sup> variaram de 12,5 a 62,5 g/L, estando apresentadas na Tabela 2 (item IV.9.2).

Todos os ingredientes foram dissolvidos separadamente, misturados em seqüência adequada, para serem levados à esterilização em autoclave a 121° C por 20 minutos (LATHAM *et al.*, 1962).

#### **IV.4. Preparo do Inóculo**

A cepa de *Clostridium tetani* liofilizada foi semeada em meio de tioglicolato fluido, distribuído em tubos e incubados em condições de anaerobiose à temperatura de 36°C ±1°C, durante 36 horas no primeiro repique e 24 horas no segundo repique.

#### **IV.5. Tipos de Cultivo**

##### **IV.5.1. Cultivos descontínuos**

Os experimentos foram realizados em estufas, a 36°C ±1°C, sem agitação, em erlenmeyers com capacidade para 500 mL contendo 300 mL de meio IB para produção de toxina tetânica (item IV.3.2), com concentrações de glicose e de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> variando de acordo com o apresentado na Tabela 1. Os erlenmeyers foram tampados com tampões de algodão e gaze. Foram utilizados 5 erlenmeyers para cada experimento para que não houvesse variação significativa do volume inicial.

##### **IV.5.2. Cultivos descontínuos alimentados**

Os cultivos descontínuos alimentados foram realizados em frascos com capacidade para 4,0 L contendo 3,0 L de meio IB para produção de toxina tetânica (item IV.3.2), com modificação da concentração inicial de glicose para 3,0 g/L e concentração de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> variando de acordo com o apresentado na Tabela 2. Todos os experimentos foram realizados em estufas, a 36°C ±1°C, sem agitação.

#### **IV.6. Esterilização do Meio de Cultura**

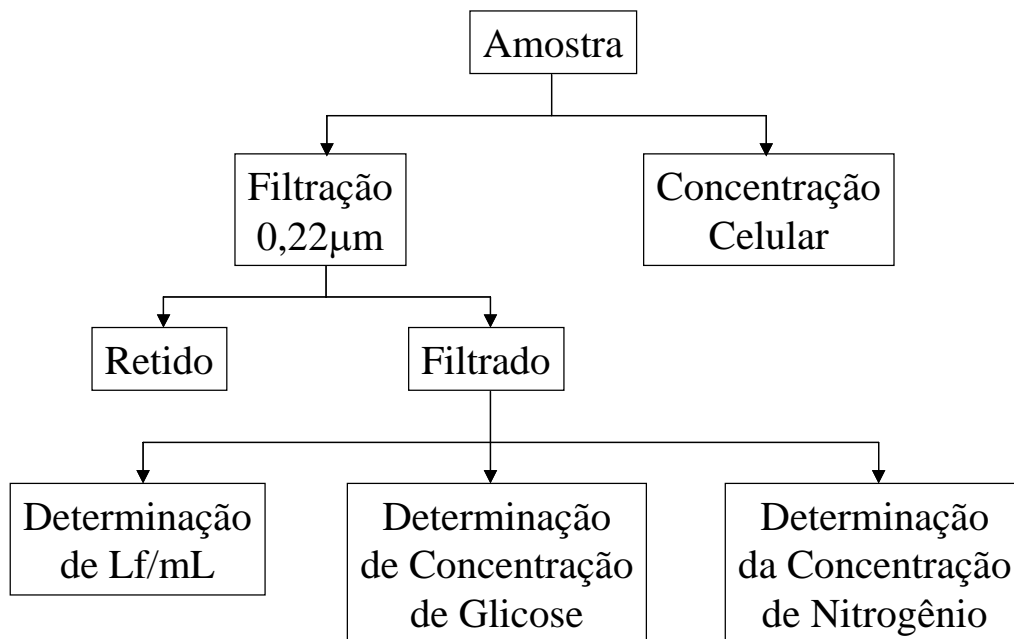
O meio de cultura foi esterilizado por autoclavação a 121°C por 20 minutos (LATHAM *et al.*, 1962). Após a autoclavação os erlenmeyers foram colocados em uma cuba contendo água fria (aproximadamente 20° C) para um resfriamento rápido do meio de cultura.

#### IV.7. Inoculação do *Clostridium tetani*

A inoculação foi realizada em Cabine de Fluxo Laminar Vertical. Cada erlenmeyer, contendo 300 mL de Meio IB para produção de Toxina Tetânica, foi inoculado com 5 mL do inóculo, preparado conforme descrito no item IV.4. A mesma proporção de inóculo foi mantida nos cultivos descontínuos alimentados.

#### IV.8. Acompanhamento do Cultivo

Foram tomadas amostras a cada 8 horas e determinadas as concentrações celulares, Limites de Floculação (Lf/mL) , pH e concentrações de glicose e de nitrogênio (Fluxograma 1).



Fluxograma 1. Tratamento das amostras

##### IV.8.1. Determinação da concentração celular

Foi determinada por densidade óptica (POSTEN & COONEY, 1993), através de curva de calibração relacionando a concentração microbiana, em massa seca, e

absorbância. A curva foi obtida em  $\lambda=540$  nm, por espectrofotômetro Pharmacia Biotech – Modelo Ultrospec 2000.

#### IV.8.2. Testes realizados com o filtrado.

Para os métodos descritos a seguir, as amostras foram previamente filtradas em membranas 0,22  $\mu\text{m}$  para separação das células.

##### IV.8.2.1. Determinação do Limite de Floculação (Lf/mL).

Esta prova tem por objetivo determinar, mediante a técnica de Ramon (NORMAS TÉCNICAS DE FABRICAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DAS VACINAS: TRÍPLICE BACTERIANA, TOXÓIDE TETÂNICO, DUPLA ADULTO, DUPLA INFANTIL, 1996), o título em Lf/mL de uma Toxina ou Anatoxina.

##### IV.8.2.1.1. Material

- Amostra de Toxina ou Anatoxina
- Antitoxina padronizada em Lf
- Solução fisiológica esterilizada
- Pipetas de 0,2 mL, 1,0 mL, 5,0 mL e 10,0 mL esterilizadas – pró-pipetas
- Tubos de ensaio esterilizados
- Estante para tubos
- Banho-maria a 45°C
- Cuba para descarte de material
- Agitador de tubos
- Pipetas automáticas

##### IV.8.2.1.2. Procedimento

- Distribuir em tubos de ensaio, volumes variáveis de Antitoxina padronizada
- Adicionar a cada tubo um volume constante de 1,0 mL de Toxina ou Anatoxina
- Homogeneizar e colocar em banho-maria a 45°C
- Observar os tubos constantemente
- Registrar no protocolo o primeiro tubo que apresentar floculação (Lf) e o tempo para esta reação ser visualizada (Kf).

##### IV.8.2.1.3. Interpretação da prova

O Lf/mL da Toxina ou Anatoxina foi determinado pelo primeiro tubo com mistura cuja floculação foi visualizada.

O valor em Lf/mL foi dado pelo volume de Antitoxina Padronizada presente no tubo multiplicado por sua concentração em equivalente Lf/mL (Normas Técnicas de Fabricação e Controle de Qualidade das Vacinas: Tríplice Bacteriana, Toxóide Tetânico, Dupla p/Usado Adulto, Dupla p/Usado Infantil – aprovada pela Vigilância Sanitária e Ministério da Saúde).

#### IV.8.2.2. Determinação da concentração de nitrogênio.

Para a determinação protéica do meio em fermentação foi utilizado o método de micro-Kjeldahl (WHO, 1977). A amostra líquida foi digerida com ácido sulfúrico concentrado em presença de catalisador, em bloco digestor, a 350° C. Posteriormente, em destilador de nitrogênio, após adição de NaOH a 60% no tubo proveniente da digestão, a amostra foi destilada por arraste a vapor, sendo recebida em uma solução saturada de ácido bórico. A quantidade de nitrogênio proveniente dessa destilação foi quantificada por titulação com HCl 0,02N.

#### IV.8.2.3. Determinação da concentração de Glicose.

A concentração de glicose foi quantificada pelo método de glicose-oxidase (BARHAM & TRINDER, 1972).

#### IV.8.2.4. Determinação do pH

O valor do pH no filtrado foi determinado por potenciometria

### IV.9. Plano de trabalho

#### IV.9.1. Otimização da produção de toxina tetânica por processo descontínuo.

Para a otimização da produção de toxina tetânica, inicialmente foram realizados experimentos de acordo com a metodologia proposta por BOX *et al.*, 1978, através do método de planejamento fatorial em estrela, com duas variáveis independentes (concentração inicial de glicose –  $G_0$  - e concentração inicial de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> -  $NZ_0$ ), em cinco níveis e 6 repetições do ponto central, resultando em 14 experimentos (Tabela 1, parte A). As variáveis independentes foram: concentração da fonte de carbono e concentração da fonte de nitrogênio, cujos pontos centrais foram fundamentados no Meio IB para produção de toxina tetânica (baseado no meio de Müller & Miller modificado por Latham (LATHAM *et al.*, 1962). Numa segunda etapa, houve a necessidade de realização de experimentos adicionais para que fosse possível a obtenção de um modelo matemático em que se obtivesse um

ponto de ótimo (Tabela 1, parte B). Adicionalmente, com vistas a verificar se o ponto de ótimo estimado era adequado, foram feitos testes de confirmação (Tabela 1, parte C). Maiores detalhes do planejamento são apresentados no item V.

Tabela 1: Experimentos realizados com processo descontínuo

Experimento	$X_1^*$	$X_2^*$	$G_0$ (g/L)	$NZ_0$ (g/L)
<i>Parte A: Planejamento experimental em estrela com cinco níveis</i>				
PD1	-1	-1	4,0	12,5
PD2	1	-1	12,0	12,5
PD3	-1	1	4,0	37,5
PD4	1	1	12,0	37,5
PD5	0	-1,414	8,0	7,3
PD6	-1,414	0	2,3	25,0
PD7	0	1,414	8,0	42,7
PD8	1,414	0	13,7	25,0
PD9	0	0	8,0	25,0
PD10	0	0	8,0	25,0
PD11	0	0	8,0	25,0
PD12	0	0	8,0	25,0
PD13	0	0	8,0	25,0
PD14	0	0	8,0	25,0
<i>Parte B: Testes adicionais para otimização do processo</i>				
PD15	-1	2	4,0	50,0
PD16	0	2	8,0	50,0
PD17	1	2	12,0	50,0
PD18	1	1,414	12,0	42,7
PD19	-1	1,414	4,0	42,7
PD20	-1	4	4,0	75,0
PD21	0	4	8,0	75,0
PD22	1	4	12,0	75,0
<i>Parte C: testes de confirmação do ponto de ótimo</i>				
PD23	0,43	1,48	9,7	43,5
PD24	0,43	1,48	9,7	43,5
PD25	0,43	1,48	9,7	43,5

\*  $X_1$  e  $X_2$  referem-se aos valores codificados das concentrações iniciais de glicose ( $G_0$ ) e N-Z Case TT<sup>®</sup> ( $NZ_0$ ).



#### IV.9.2. Produção de toxina tetânica por processo descontínuo alimentado.

Foram realizados experimentos com processo descontínuo alimentado procurando avaliar a produção de toxina tetânica por *Clostridium tetani* em baixas concentrações de glicose no decorrer do cultivo e diferentes concentrações iniciais de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> ( $NZ_0$ ). Foram adotados diferentes critérios para correção da concentração da glicose durante os cultivos (Tabela 2).

Tabela 2. Experimentos realizados com processo descontínuo alimentado.

Experimento*	Variáveis	
	$NZ_0$ (g/L)	Critério para correção da concentração de glicose
PDA1a e PDA1b	25,0	Tempos pré-determinados**
PDA2a e PDA2b	37,5	
PDA3a e PDA3b	50,0	
PDA4a e PDA4b	62,5	
PDA5a e PDA5b	25,0	inicial e após a concentração atingir uma faixa pré-determinada***
PDA6a e PDA6b	37,5	
PDA7a e PDA7b	50,0	
PDA8a e PDA8b	62,5	

\*Os experimentos foram realizados em duplicata.

\*\* Nestes experimentos, a concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

\*\*\* Nestes experimentos, a concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial e, durante o cultivo, quando seu valor caiu para 1,0-1,5 g/L, foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

Em todos os casos de correção de concentração de glicose (inicial e/ou durante os cultivos) foi utilizada uma solução de 500 g/L de forma que não houvesse variação significativa no volume de cultura.

Para se ter um parâmetro de comparação, foram realizados experimentos padrão com meio IB para produção de toxina tetânica (baseado no meio de Müller & Miller modificado por LATHAM (LATHAM *et al.*, 1962).

#### IV.10. Avaliação dos resultados

Os resultados dos itens IV.9.1 foram avaliados por metodologia de superfície de resposta (MSR). Esta técnica foi usada para o entendimento do efeito simultâneo das concentrações iniciais de glicose ( $G_0$ ) e de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> ( $NZ_0$ ) na concentração final de toxina tetânica. MSR é um grupo de técnicas utilizadas para avaliar a relação entre uma ou mais variáveis independentes no efeito sobre uma variável resposta (BOX *et al.*, 1978). Equação representativa do modelo e correspondente superfície de resposta ou gráfico de contorno, foram gerados neste estudo de acordo com seguinte equação polinomial:

$$TT_f = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

Onde  $TT_f$  é a resposta estimada da variável dependente (título final da toxina tetânica),  $X_1$  e  $X_2$  correspondem aos valores codificados das concentrações iniciais de glicose e NZ-Case, respectivamente. Os parâmetros  $b$  são coeficientes polinomiais estimados pelo modelo de ajuste utilizando o programa S-plus 2000. A análise de variância da regressão foi executada considerando um  $p < 0,0001$ .

Os resultados dos cultivos descontínuos alimentados (item IV.9.2) foram avaliados por análise de variância multivariável pelo teste de Tukey.

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### V.1. Processo descontínuo

Neste item, correspondente ao trabalho publicado por FRATELLI *et al.* (2005), são apresentados os resultados obtidos referentes aos experimentos correspondentes aos processos descontínuos, bem como sua discussão. Os resultados são apresentados na forma de tabelas (Tabelas 3 a 27) e figuras (Figuras 1 a 25).

Amostras dos experimentos foram retiradas a cada 8 horas para análises de valor de pH, título de toxina e concentrações de células e glicose. A análise de nitrogênio foi efetuada a cada 16 horas por se tratar de uma técnica demorada e por este tempo de amostragem ser considerado suficiente para o acompanhamento. Assim, foi possível a obtenção de muitos pontos consecutivos, o que possibilitou maior segurança no perfil dos parâmetros analisados em função do tempo.

Após a apresentação dos resultados experimentais, foi elaborada uma tabela com um resumo de todos os resultados obtidos (Tabela 28).

Tabela 3: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD1 ( $G_0 = 4,0$  g/L e  $NZ_0 = 12,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	3,31	1,50
8	7,1	0	0,54	3,16	
16	6,8	0	1,25	2,30	1,50
24	7,1	0	1,66	2,64	
32	7,1	0	1,89	2,17	1,20
40	7,1	0	1,88	1,91	
48	7,1	0	2,45	2,02	0,55
56	7,1	0	2,35	1,79	
64	7,1	0	2,26	1,23	0,60
72	7,1	0	2,61	1,36	
80	7,1	0	2,64	1,12	0,41
88	7,1	0	3,53	0,61	
96	7,1	0	3,11	0,48	0,37
104	7,1	0	2,94	0,33	
112	7,1	15	2,52	0,23	0,36

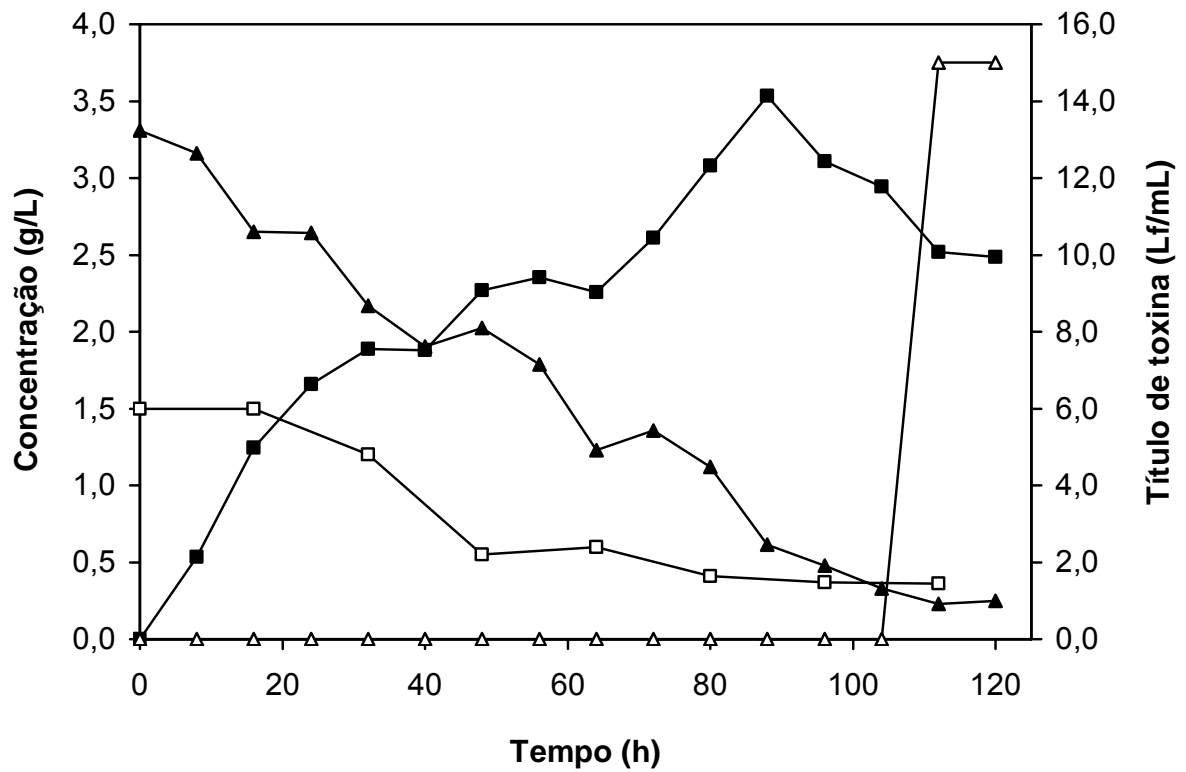


Figura 1: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD1 ( $G_o = 4,0$  g/L e  $NZ_o = 12,5$  g/L).

Tabela 4: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD2 ( $G_o = 12,0$  g/L e  $NZ_o = 12,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	9,12	1,50
8	6,8	0	0,47	8,26	
16	6,8	0	1,00	8,32	1,30
24	7,1	0	1,36	8,26	
32	7,1	0	1,69	7,95	0,99
40	7,1	0	2,04	7,64	
48	7,1	0	1,86	8,32	0,97
56	7,1	0	1,78	8,27	
64	6,8	0	2,66	7,43	0,80
72	6,8	0	2,97	7,31	
80	7,5	0	2,94	6,97	0,60
88	7,1	0	3,01	6,49	
96	7,1	0	2,73	7,52	0,33
104	7,1	0	2,49	6,64	
112	7,1	12	2,64	6,37	0,34

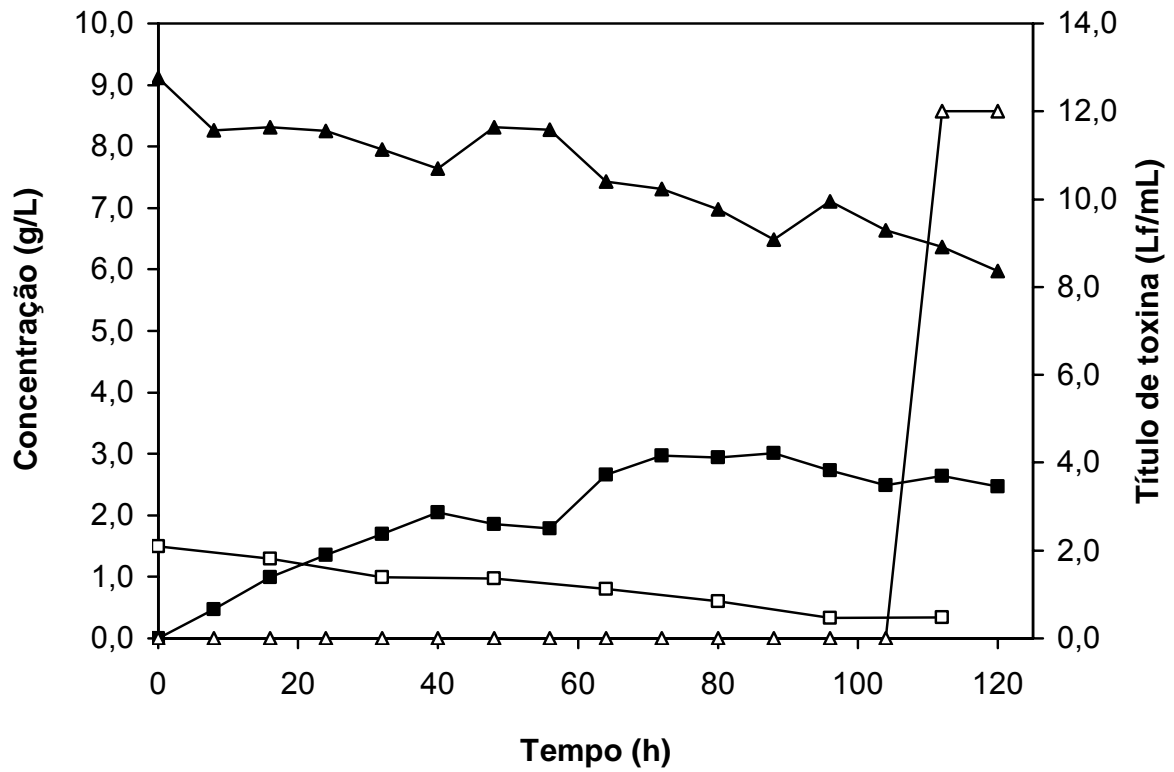


Figura 2: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD2 ( $G_o = 12,0$  g/L e  $NZ_o = 12,5$  g/L).

Tabela 5: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD3 ( $G_o = 4,0$  g/L e  $NZ_o = 37,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	2,16	4,68
8	7,1	0	0,82	1,87	
16	7,1	0	2,47	0,84	4,49
24	7,1	0	3,51	1,30	
32	7,1	0	3,91	0,92	3,43
40	7,1	0	4,24	0,21	
48	7,4	0	4,98	0,06	3,46
56	7,7	0	3,32	0,05	
64	7,4	24	2,83	0,05	2,49
72	7,1	27	2,61	0,04	
80	7,9	27	2,61	0,04	1,60
88	8,3	27	2,59	0,04	
96	7,9	30	2,57	0,03	0,58
104	7,9	40	2,49	0,02	
112	8,1	40	2,45	0,02	0,59



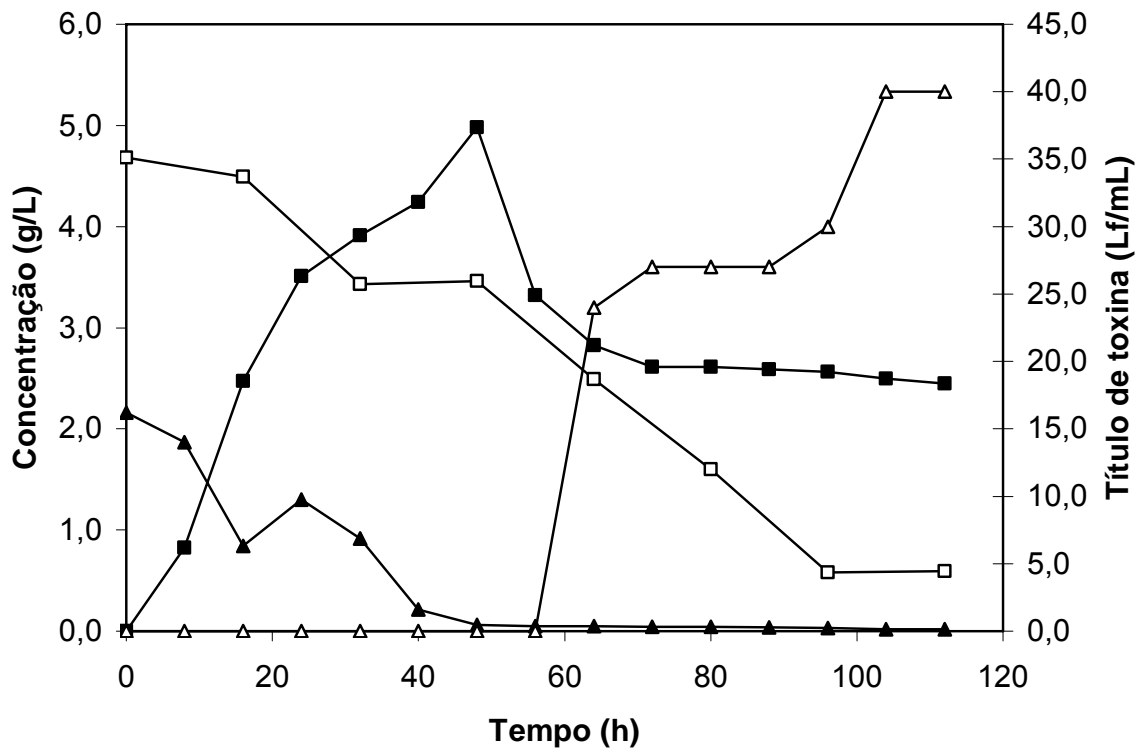


Figura 3: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD3 ( $G_o = 4,0$  g/L e  $NZ_o = 37,5$  g/L).

Tabela 6: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD4 ( $G_o = 12,0$  g/L e  $NZ_o = 37,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	5,99	4,71
8	6,8	0	1,31	7,32	
16	7,1	0	2,54	7,40	4,49
24	7,1	0	2,92	7,51	
32	7,1	0	3,04	6,36	3,57
40	7,1	0	3,13	6,40	
48	7,1	0	3,42	6,50	3,04
56	7,1	40	3,49	5,97	
64	7,1	40	3,98	5,83	2,82
72	7,1	50	3,77	5,13	
80	7,4	50	2,40	5,01	2,57
88	7,4	60	2,09	5,10	
96	7,4	60	1,62	4,79	1,55
104	7,7	60	1,64	4,32	
112	7,9	70	1,62	4,17	0,99

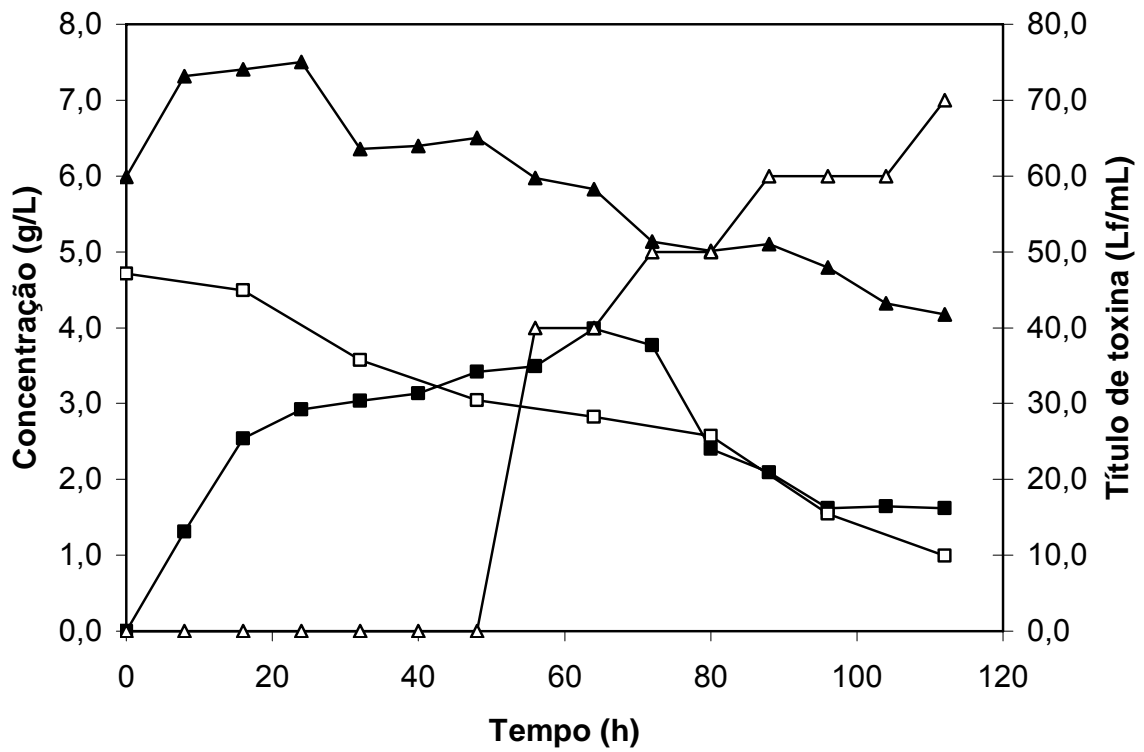


Figura 4: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD4 ( $G_o = 12,0$  g/L e  $NZ_o = 37,5$  g/L).

Tabela 7: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD5 ( $G_0 = 8,0$  g/L e  $NZ_0 = 7,3$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	6,49	1,33
8	6,5	0	0,40	5,37	
16	6,5	0	0,77	5,53	0,83
24	6,8	0	0,92	6,02	
32	6,8	0	1,23	5,81	0,83
40	6,8	0	1,42	5,72	
48	6,8	0	1,45	6,50	0,80
56	6,8	0	1,45	6,36	
64	6,8	0	1,51	5,35	0,80
72	6,8	0	1,61	5,62	
80	6,8	0	1,63	4,82	0,72
88	6,8	0	1,64	5,19	
96	6,5	0	1,69	5,38	0,52
104	6,5	0	1,80	4,60	
112	6,5	0	1,79	4,99	0,54

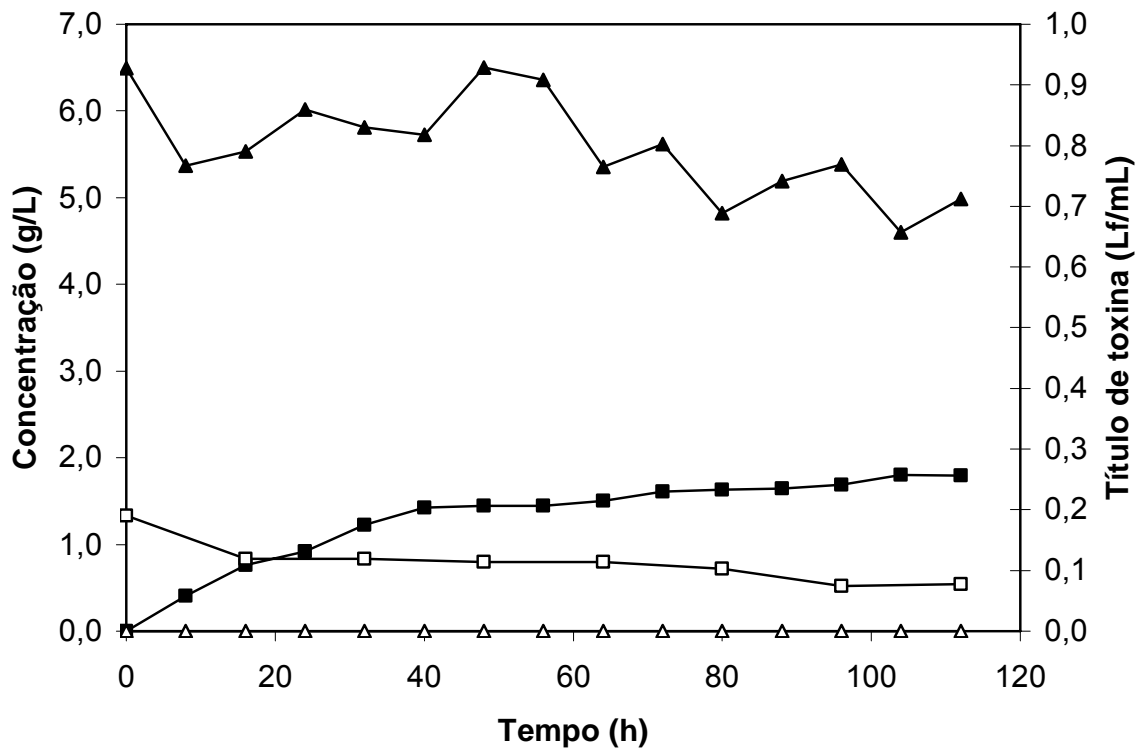


Figura 5: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD5 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 7,3$  g/L).

Tabela 8: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD6 ( $G_o = 2,3$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	2,60	3,32
8	7,1	0	0,90	2,45	
16	7,1	0	0,93	1,02	3,10
24	7,1	0	2,99	0,86	
32	7,1	0	2,87	0,47	2,91
40	7,1	0	4,01	0,10	
48	7,4	0	3,49	0,06	2,77
56	7,7	0	2,90	0,05	
64	7,5	0	2,83	0,04	1,80
72	7,5	0	2,33	0,03	
80	7,9	0	2,38	0,02	1,80
88	8,1	0	2,26	0,02	
96	8,1	0	3,42	0,02	1,38
104	8,1	0	3,70	0,02	
112	8,1	0	3,09	0,02	1,21

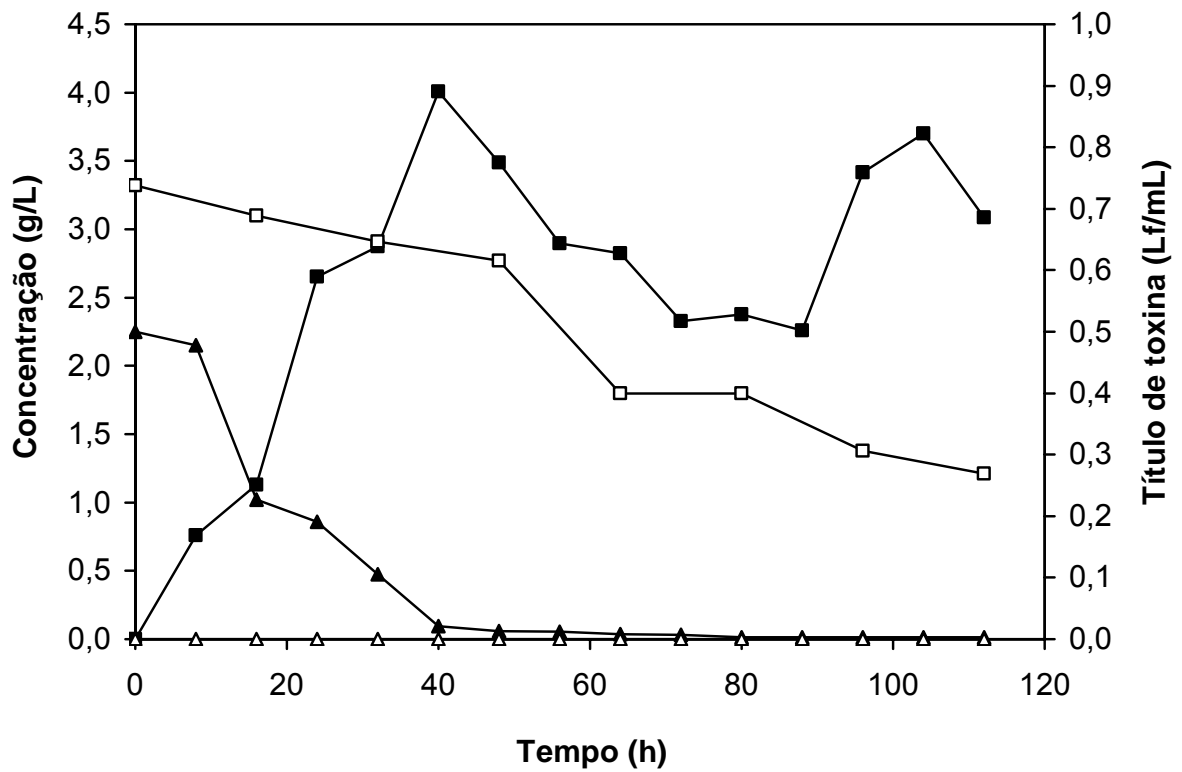


Figura 6: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD6 ( $G_o = 2,3$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tabela 9: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD7 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 42,7$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	4,46	5,40
8	6,8	0	1,38	4,72	
16	6,8	0	1,41	4,85	5,35
24	6,8	0	2,45	4,72	
32	6,8	0	4,81	3,26	5,21
40	6,8	0	4,48	3,19	
48	7,1	0	5,45	3,97	5,10
56	7,1	30	5,52	1,79	
64	7,1	50	4,27	1,68	4,71
72	7,1	50	3,75	1,15	
80	7,4	60	3,04	1,93	2,66
88	7,4	70	2,61	1,88	
96	7,7	70	2,59	1,40	2,03
104	7,9	70	1,41	1,33	
112	8,1	70	1,69	1,18	0,55



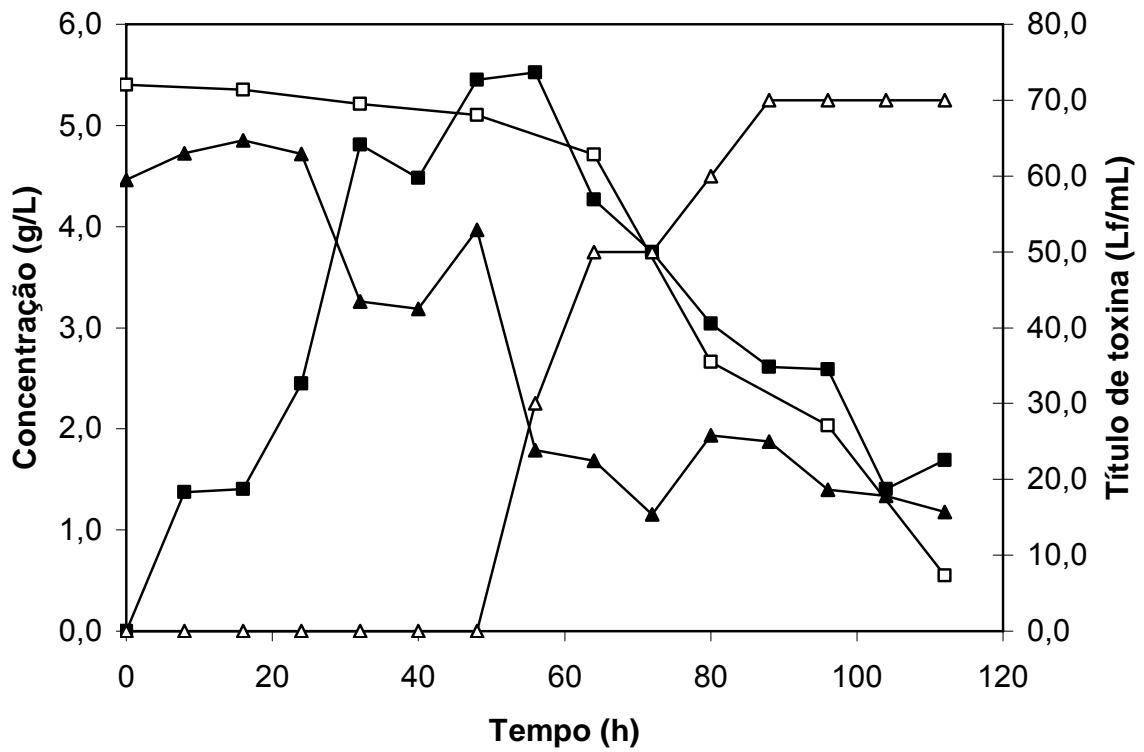


Figura 7: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD7 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 42,7$  g/L).

Tabela 10: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD8 ( $G_o = 13,7$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	9,47	3,16
8	6,8	0	0,96	8,79	
16	6,8	0	1,52	9,05	3,10
24	6,8	0	2,23	8,95	
32	6,8	0	2,52	8,57	2,82
40	6,8	0	3,53	8,67	
48	7,1	0	3,61	7,55	2,77
56	7,4	0	3,91	7,62	
64	6,8	0	4,29	6,68	2,66
72	6,8	0	3,91	6,41	
80	7,1	9	3,94	6,81	1,90
88	7,4	20	4,06	6,13	
96	7,4	30	3,72	6,03	1,66
104	7,4	45	3,30	6,08	
112	7,4	50	2,38	4,76	1,67

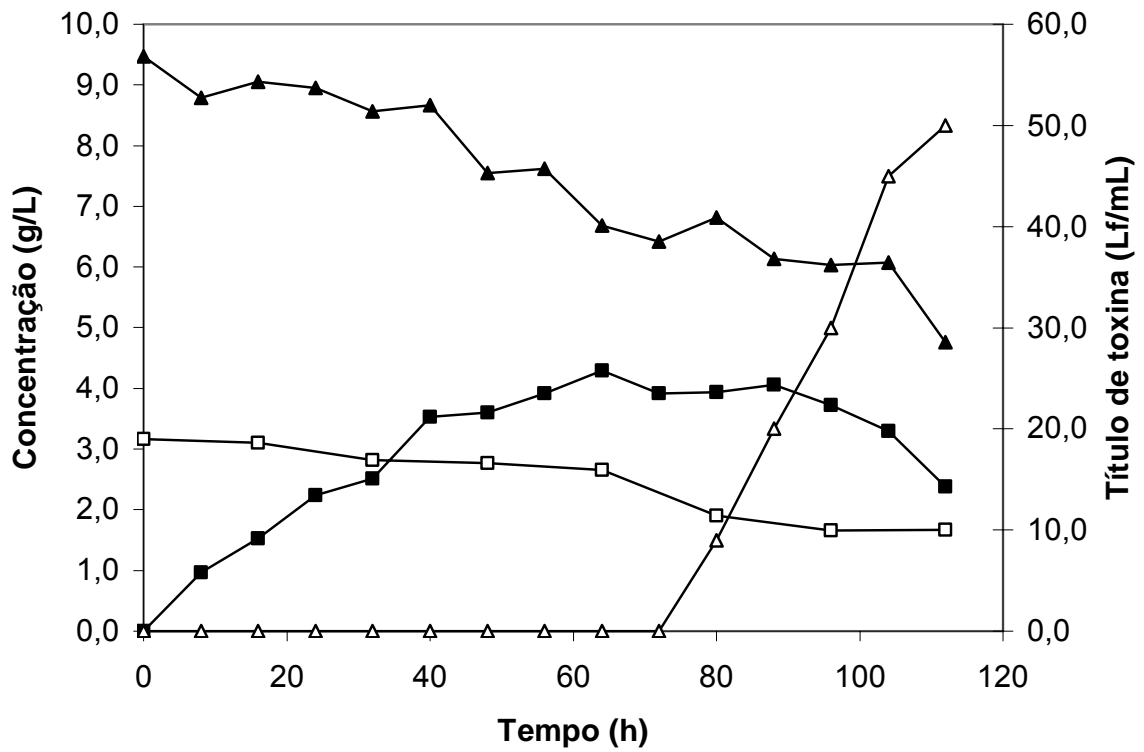


Figura 8: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD8 ( $G_o = 13,7$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tabela 11: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD9 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	5,40	3,16
8	6,8	0	0,92	4,87	
16	6,8	0	1,41	4,94	2,99
24	7,1	0	2,26	4,75	
32	7,1	0	2,57	3,66	2,96
40	7,1	0	2,97	3,95	
48	7,1	0	4,22	3,72	2,91
56	7,4	0	4,29	3,44	
64	7,4	0	4,22	2,41	2,74
72	7,4	0	4,62	2,14	
80	7,4	35	4,27	1,65	2,66
88	7,4	30	4,48	1,05	
96	7,4	40	4,62	0,15	1,44
104	7,4	35	5,00	0,03	
112	7,4	15	3,96	0,02	1,10

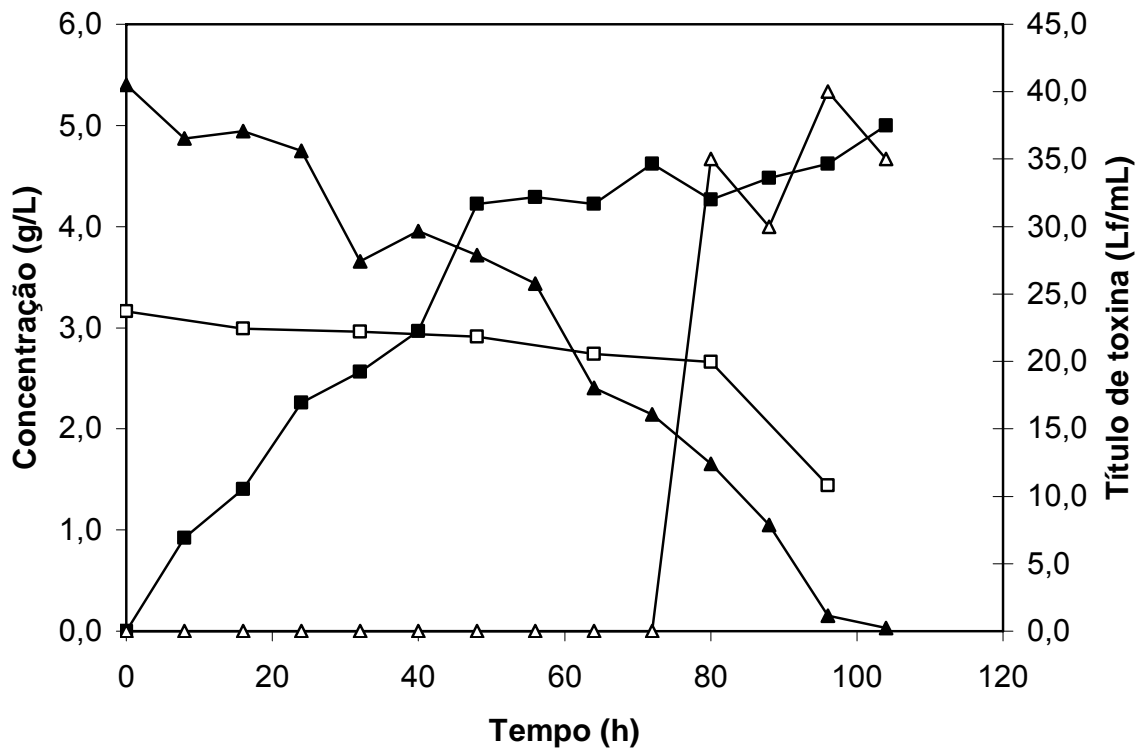


Figura 9: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD9 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tabela 12: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD10 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	5,31	3,77
8	6,8	0	1,05	4,69	
16	6,8	0	1,62	5,06	3,04
24	7,1	0	2,38	4,65	
32	7,1	0	2,33	4,44	2,85
40	7,1	0	3,44	3,23	
48	7,1	0	3,63	3,81	2,77
56	7,1	0	4,27	2,86	
64	7,1	0	4,43	2,16	2,63
72	7,1	0	4,06	2,41	
80	7,1	30	3,87	1,57	2,44
88	7,4	30	3,89	1,43	
96	7,4	40	5,10	0,53	1,85
104	7,4	35	4,41	0,19	
112	7,4	15	3,98	0,05	1,30

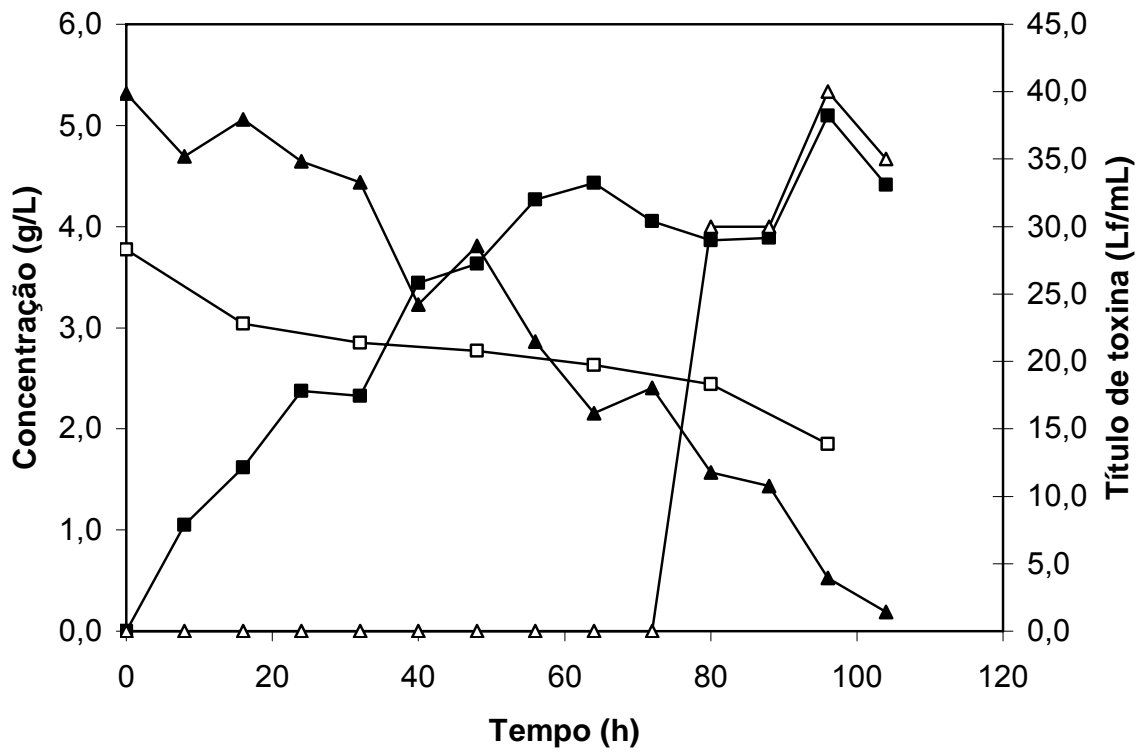


Figura 10: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD10 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tabela 13: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD11 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	5,11	3,32
8	6,8	0	0,93	4,37	
16	6,8	0	1,86	3,88	3,10
24	7,1	0	1,88	4,51	
32	7,1	0	2,87	4,26	3,10
40	7,1	0	2,92	3,95	
48	7,1	0	3,82	3,81	3,04
56	7,1	0	4,46	3,17	
64	7,1	0	4,27	2,32	3,02
72	7,1	0	4,98	1,92	
80	7,1	35	3,72	1,67	1,91
88	7,4	30	4,84	1,01	
96	7,4	40	4,17	0,22	1,80
104	7,4	35	4,17	0,02	
112	7,4	20	3,42	0,02	0,94



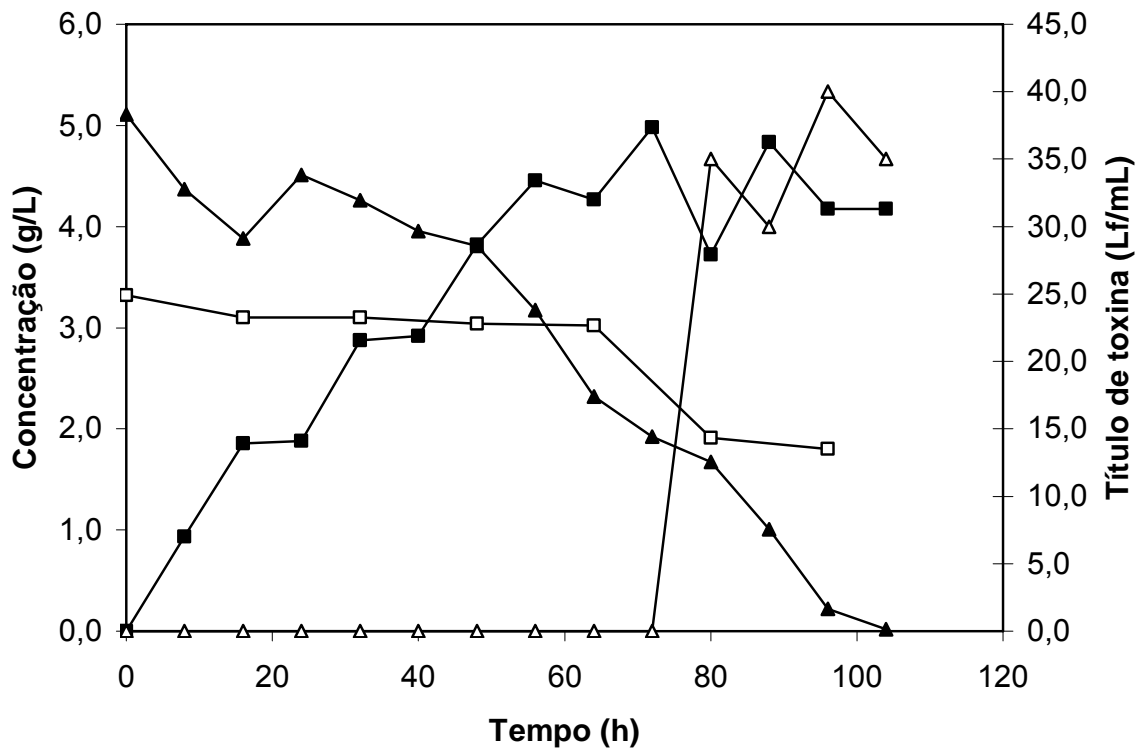


Figura 11: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD11 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tabela 14: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD12 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	6,40	3,43
8	6,8	0	-	5,79	
16	6,8	0	0,58	5,53	3,27
24	6,8	0	1,86	5,66	
32	6,8	0	2,16	5,24	3,23
40	6,8	0	2,64	5,04	
48	6,8	0	3,16	4,81	3,18
56	6,9	25	3,94	4,15	
64	7	25	2,66	3,94	2,63
72	7	30	1,97	3,98	
80	7,1	30	1,97	4,03	2,49
88	7,7	35	1,43	4,01	
96	7,7	40	1,00	4,13	1,85
104	7,9	40	1,03	4,07	
112	7,9	40	0,93	4,26	1,74

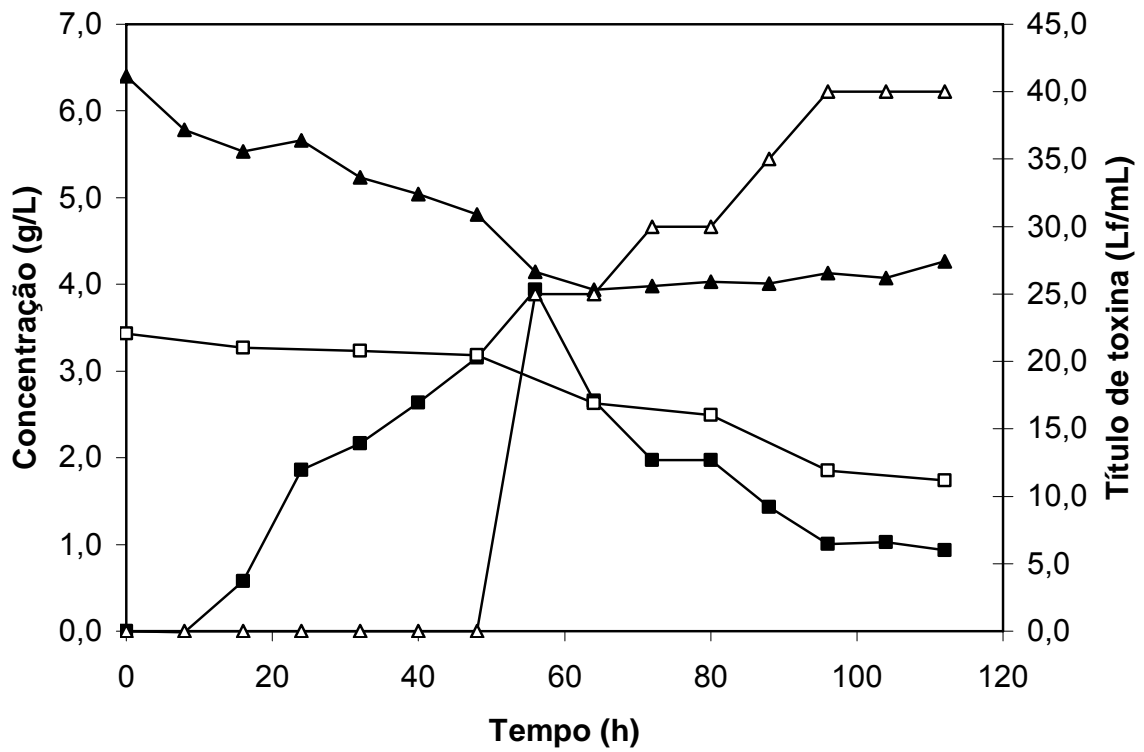


Figura 12: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD12 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tabela 15: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD13 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	6,26	3,38
8	6,8	0	0,18	6,08	
16	6,8	0	0,84	6,00	3,27
24	6,8	0	2,07	5,49	
32	6,8	0	2,21	5,52	3,02
40	6,8	0	3,13	5,41	
48	6,8	0	2,99	4,94	3,27
56	6,9	0	3,68	4,96	
64	7	25	2,40	4,87	2,81
72	7,1	30	1,17	4,94	
80	7,4	30	1,17	4,73	2,74
88	7,7	35	0,98	4,93	
96	7,4	40	0,81	4,44	2,13
104	7,7	40	0,96	4,62	
112	7,9	35	0,86	4,10	1,71

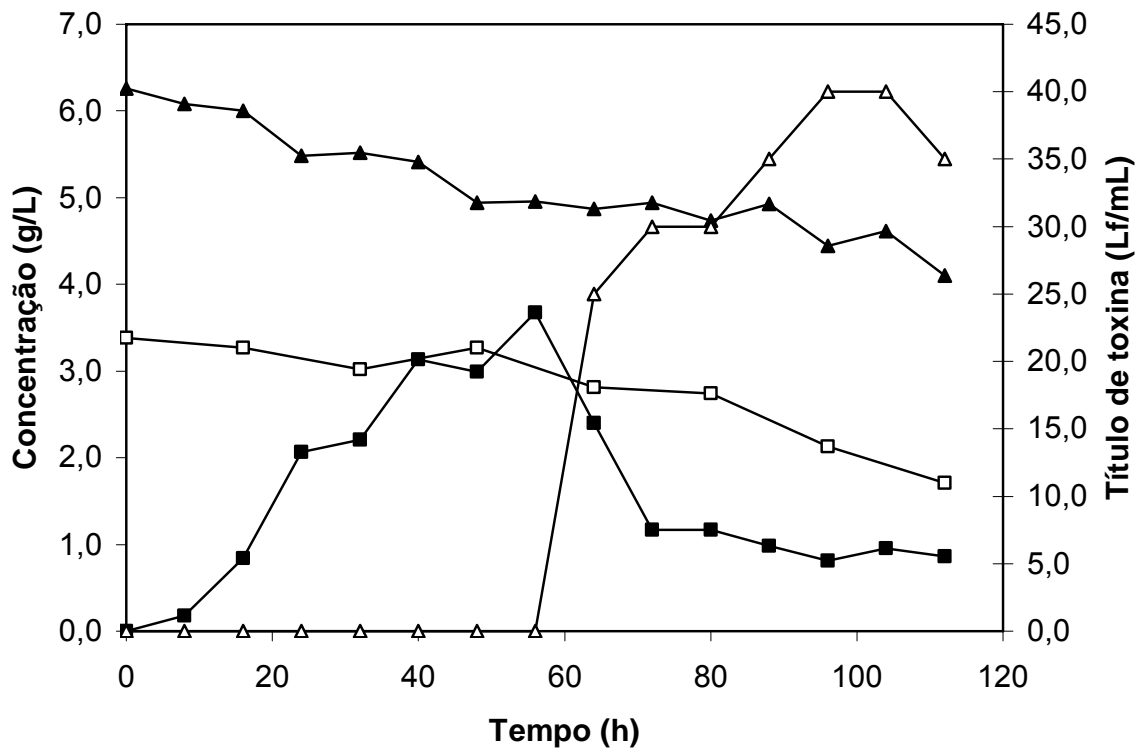


Figura 13: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD13 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tabela 16: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD14 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	7,23	3,04
8	6,8	0	1,32	6,05	
16	7,1	0	1,74	5,87	2,93
24	7,1	0	2,47	5,69	
32	7,1	0	2,68	5,38	2,93
40	7,1	0	3,58	4,99	
48	7,1	0	3,70	3,59	2,55
56	7,1	0	3,70	4,32	
64	7,1	0	4,36	4,00	2,35
72	7,1	20	4,41	3,61	
80	7,1	30	4,17	3,03	2,27
88	7,1	35	4,10	2,88	
96	7,1	35	4,34	2,36	1,98
104	7,1	35	3,98	2,05	
112	7,1	40	1,62	1,96	1,77

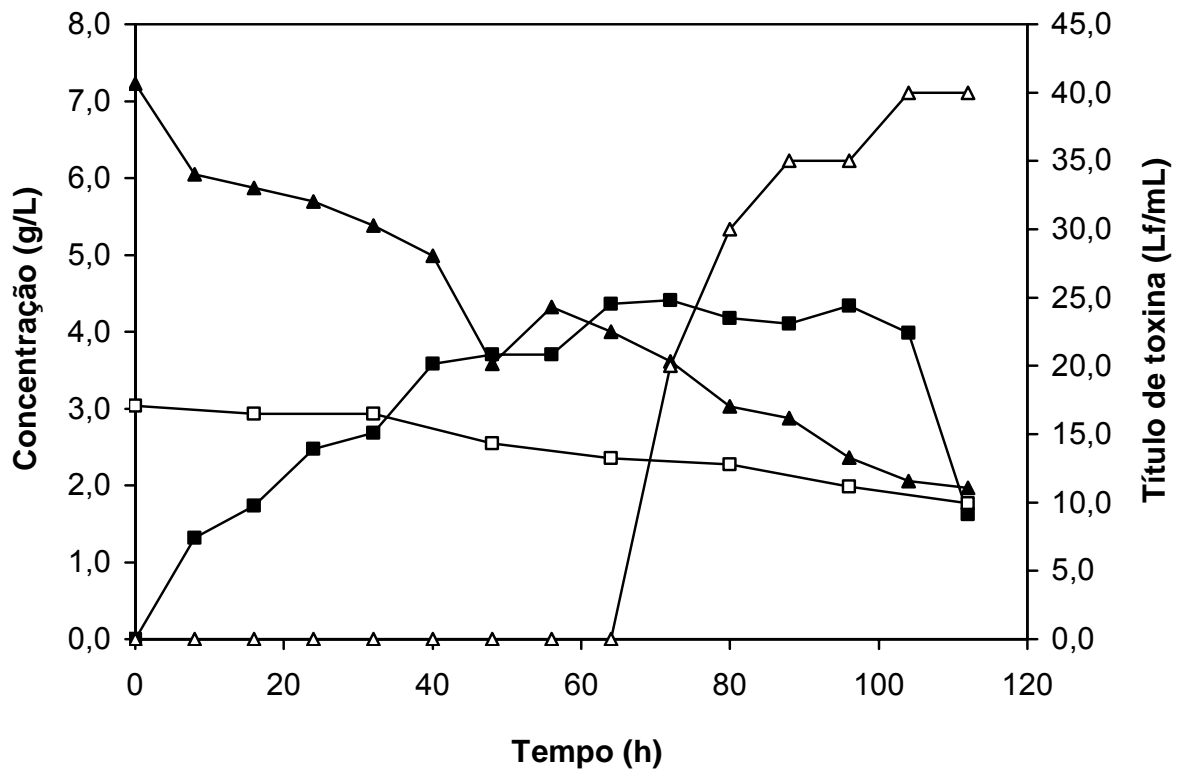


Figura 14: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD14 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tabela 17: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD15 ( $G_o = 4,0$  g/L e  $NZ_o = 50,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	2,99	6,09
8	7,4	0	1,89	1,95	
16	7,1	0	4,22	2,14	5,79
24	7,1	0	4,36	1,33	
32	7,1	0	3,94	0,96	5,60
40	7,1	0	4,03	0,55	
48	7,4	0	4,10	0,56	5,26
56	7,7	0	3,56	0,28	
64	7,7	0	2,92	0,67	4,99
72	7,7	70	2,85	0,55	
80	7,9	70	2,09	0,49	4,93
88	8	70	2,40	0,52	
96	8	70	2,28	0,40	4,85
104	8	80	2,61	0,43	
112	8	80	2,33	0,41	4,21



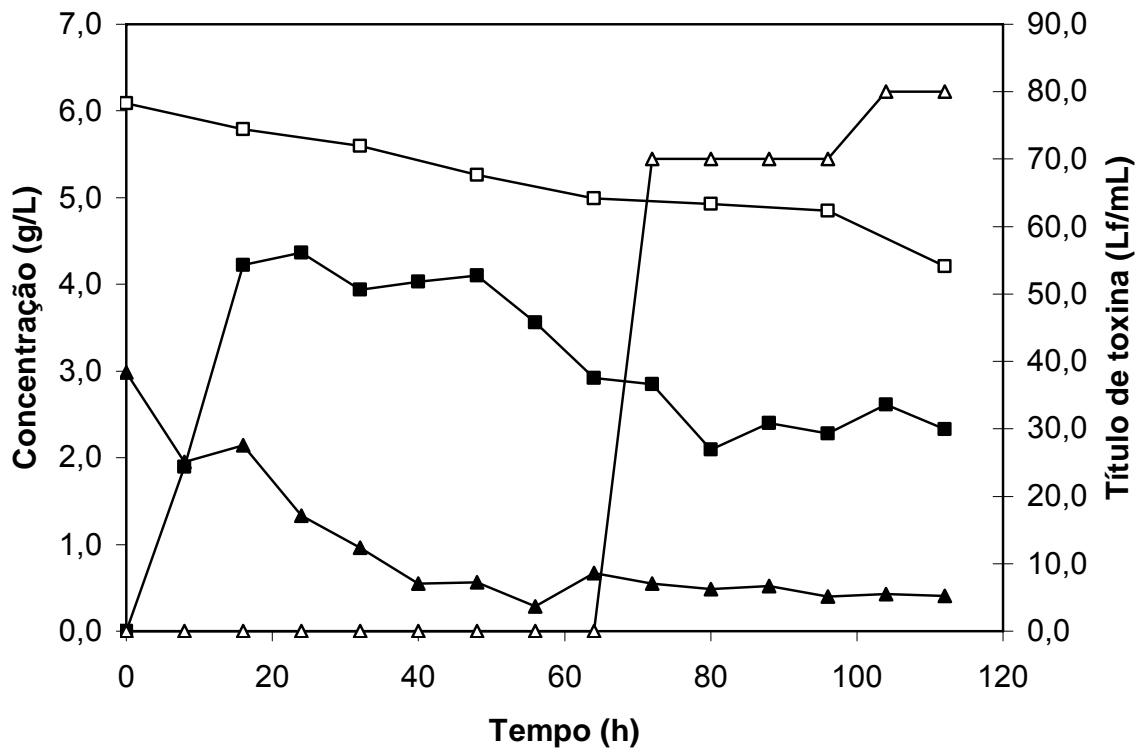


Figura 15: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD15 ( $G_o = 4,0$  g/L e  $NZ_o = 50,0$  g/L).

Tabela 18: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD16 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 50,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	5,43	5,40
8	7,4	0	1,45	4,99	
16	7,1	0	3,61	4,40	5,32
24	7,1	0	4,27	4,43	
32	6,8	0	2,85	3,63	5,26
40	7,1	0	2,19	3,88	
48	7,4	0	1,71	3,91	4,71
56	7,4	40	2,04	3,75	
64	7,4	50	1,60	3,44	4,24
72	7,5	70	1,67	3,28	
80	7,9	70	1,62	2,92	4,13
88	8	80	1,34	3,01	
96	7,7	80	1,31	3,51	3,68
104	7,7	70	1,36	3,20	
112	7,7	70	1,22	3,16	3,54

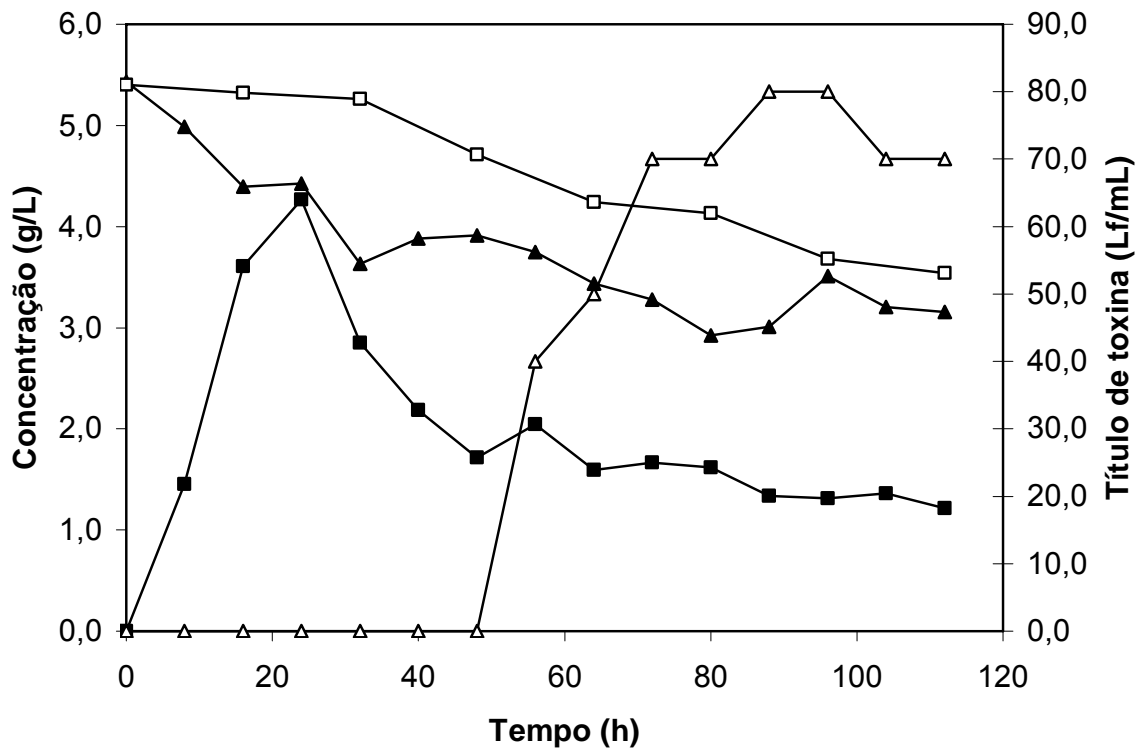


Figura 16: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD16 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 50,0$  g/L).

Tabela 19: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD17 ( $G_o = 12,0$  g/L e  $NZ_o = 50,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	7,79	5,40
8	7,4	0	1,35	7,32	
16	7,1	0	3,18	7,00	5,32
24	7,1	0	3,89	6,34	
32	7,1	0	2,54	6,34	5,26
40	7,1	0	1,81	6,78	
48	7,4	0	1,64	6,69	4,71
56	7,7	0	1,64	6,09	
64	7,7	0	1,62	6,36	4,24
72	7,8	20	1,57	6,28	
80	8	60	1,76	6,58	4,13
88	8	60	1,52	6,31	
96	8	60	1,48	7,03	3,68
104	8	60	1,34	6,40	
112	7,8	70	1,43	6,83	3,54

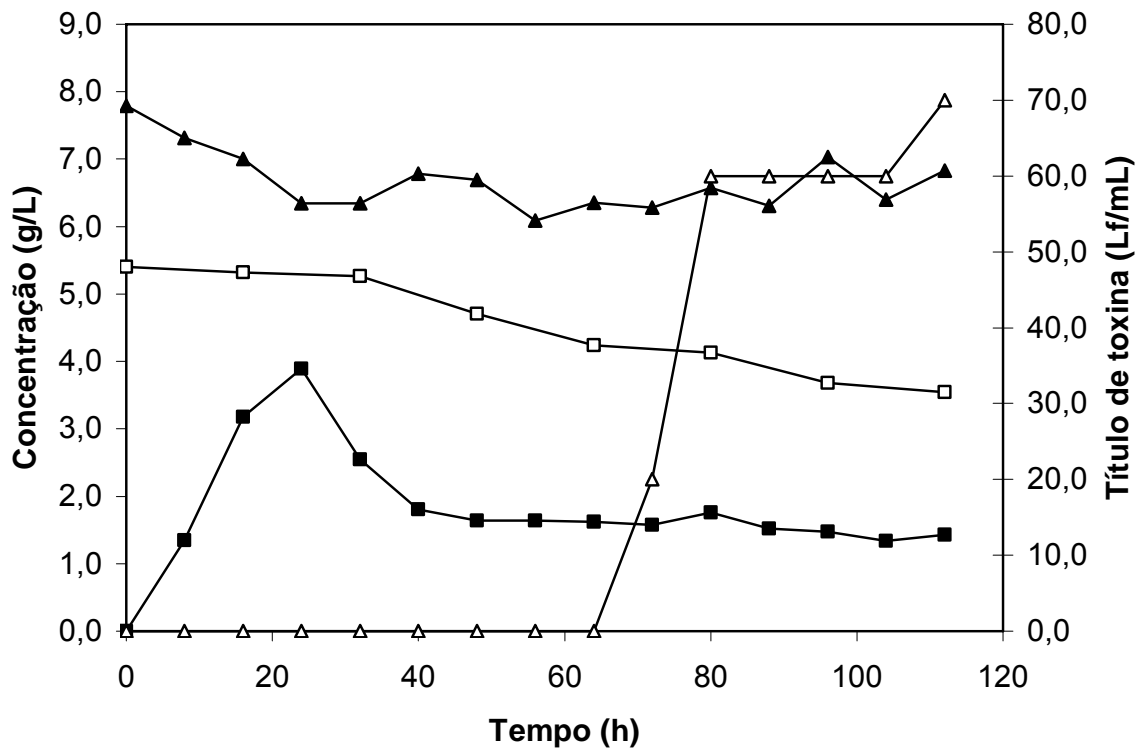


Figura 17: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD17 ( $G_o = 12,0$  g/L e  $NZ_o = 50,0$  g/L).

Tabela 20: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD18 ( $G_o = 12,0$  g/L e  $NZ_o = 42,7$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	8,38	5,15
8	7,4	0	1,31	8,03	
16	7,1	0	3,11	7,89	4,93
24	7,1	0	3,96	7,48	
32	7,1	0	2,97	7,67	4,99
40	7,1	0	2,16	7,06	
48	7,4	0	1,81	6,99	4,54
56	7,4	20	1,81	6,87	
64	7,4	20	1,78	6,96	2,88
72	7,7	30	1,36	7,06	
80	7,8	30	1,43	6,97	2,66
88	8	30	1,34	7,08	
96	7,7	25	1,29	6,71	2,19
104	7,7	30	1,12	6,69	
112	7,7	30	0,74	6,71	1,16

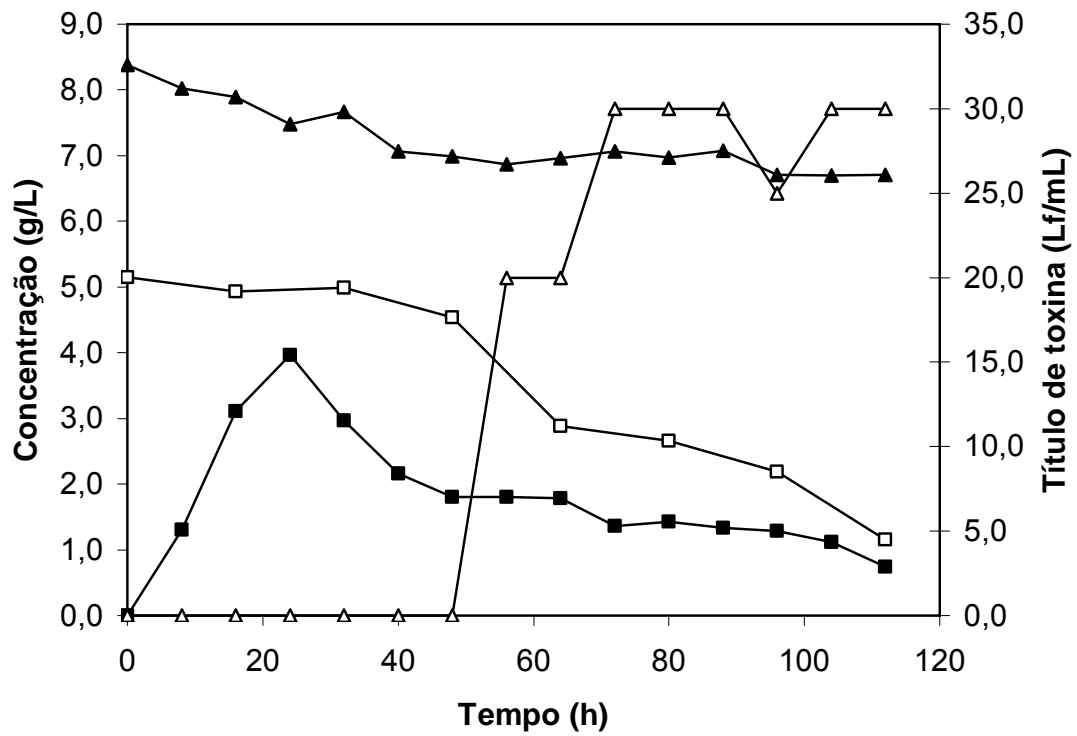


Figura 18: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD18 ( $G_o = 12,0$  g/L e  $NZ_o = 42,7$  g/L).

Tabela 21: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD19 ( $G_o = 4,0$  g/L e  $NZ_o = 42,7$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	3,04	4,99
8	7,4	0	1,52	2,90	
16	7,4	0	2,42	2,41	4,54
24	7,4	0	2,73	1,92	
32	7,1	0	2,97	1,39	4,57
40	7,4	0	2,57	0,92	
48	7,4	0	2,54	0,86	4,21
56	7,7	30	2,21	0,82	
64	7,7	40	1,97	1,24	2,91
72	7,7	50	1,76	1,17	
80	7,9	50	1,81	1,17	2,76
88	8	60	1,67	1,13	
96	8	40	1,60	0,82	2,52
104	8	40	1,78	0,83	
112	8	40	1,71	0,81	2,10



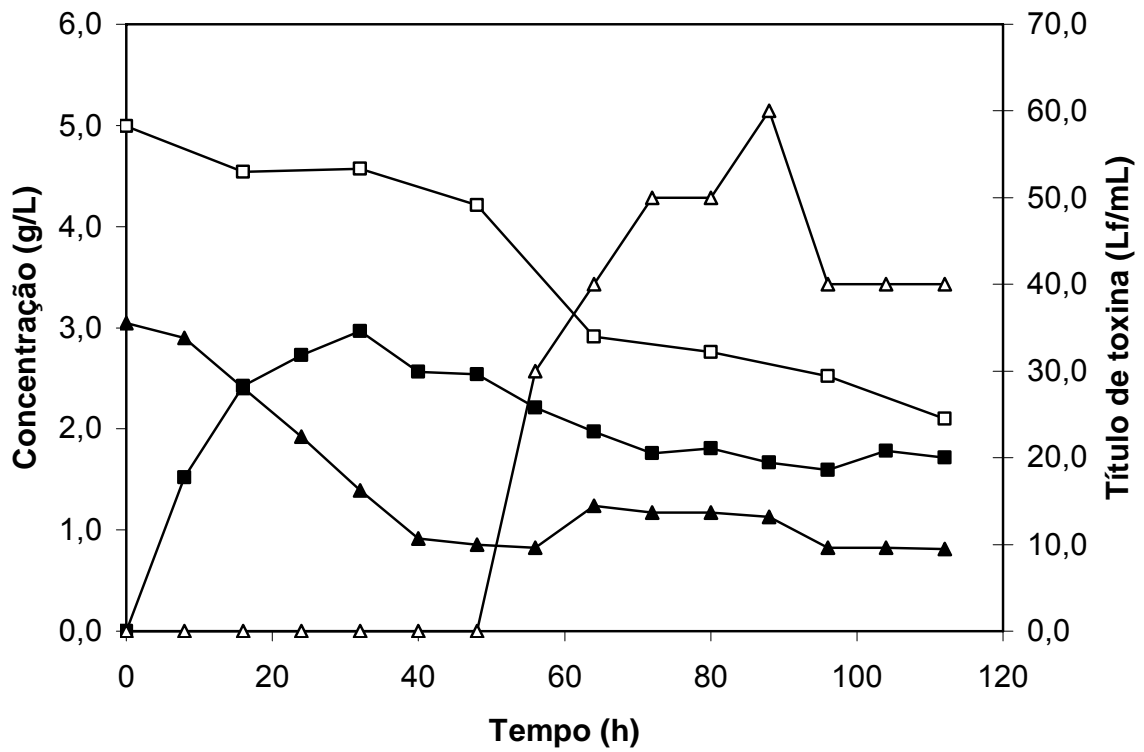


Figura 19: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD19 ( $G_o = 4,0$  g/L e  $NZ_o = 42,7$  g/L).

Tabela 22: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD20 ( $G_o = 4,0$  g/L e  $NZ_o = 75,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	1,87	8,04
8	7	0	1,75	1,84	
16	7,4	0	3,30	1,32	7,95
24	7,4	0	3,77	1,04	
32	7,4	0	4,36	0,59	7,87
40	7,4	0	3,72	0,34	
48	7,4	0	3,77	0,05	7,84
56	7,4	0	3,43	0,05	
64	7,7	0	3,42	0,04	7,71
72	7,7	0	3,34	0,04	
80	7,7	0	3,30	0,03	6,76
88	7,7	0	3,33	0,03	
96	7,9	0	3,33	0,03	5,92
104	7,9	0	2,95	0,03	
112	7,9	0	2,82	0,02	4,85

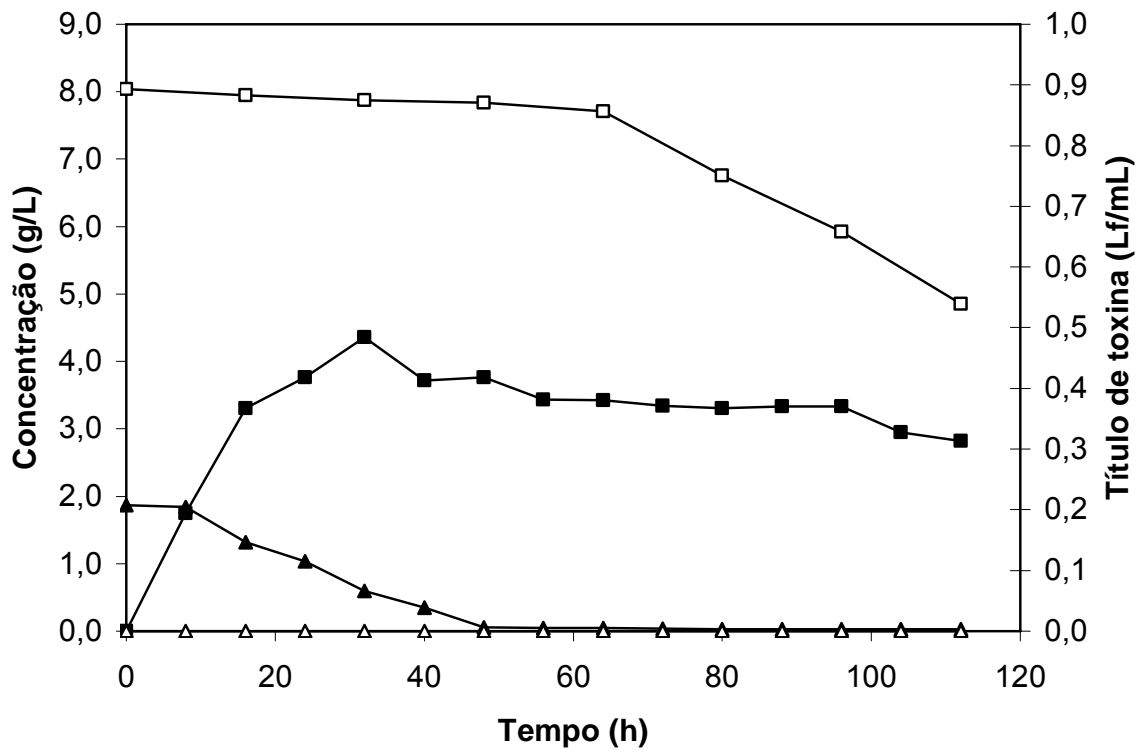


Figura 20: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD20 ( $G_o = 4,0$  g/L e  $NZ_o = 75,0$  g/L).

Tabela 23: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD21 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 75,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	4,28	7,51
8	7	0	1,67	3,90	
16	7,1	0	2,81	3,22	7,20
24	7,1	0	3,17	3,14	
32	7,1	0	3,38	2,86	7,00
40	7,1	0	4,71	1,67	
48	7,4	0	4,43	1,12	6,82
56	7,4	0	4,39	0,47	
64	7,4	0	4,29	0,24	6,21
72	7,4	0	4,62	0,22	
80	7,4	0	2,33	0,17	5,90
88	7,7	0	2,31	0,12	
96	7,7	0	2,25	0,10	5,71
104	7,7	0	2,23	0,08	
112	7,7	0	2,16	0,09	5,37

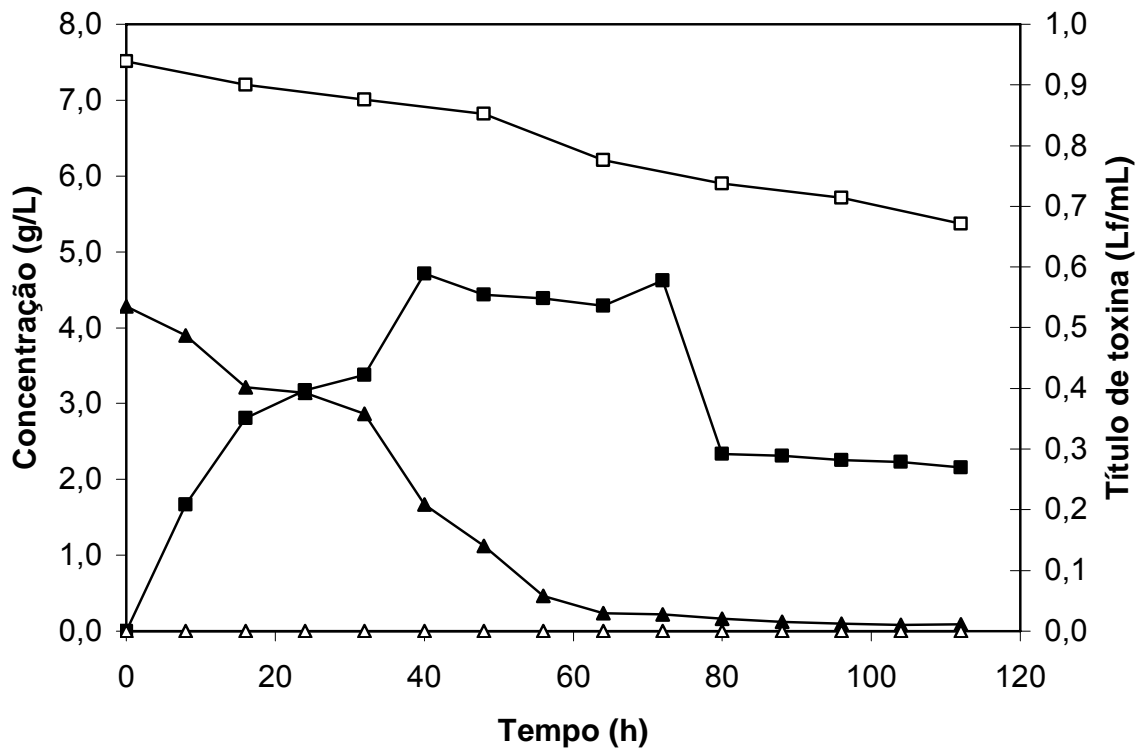


Figura 21: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD21 ( $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 75,0$  g/L).

Tabela 24: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD22 ( $G_o = 12,0$  g/L e  $NZ_o = 75,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	6,40	10,53
8	7	0	1,48	6,17	
16	6,8	0	3,14	5,53	7,56
24	7	0	3,75	5,10	
32	7,1	0	3,81	4,76	7,40
40	7,1	0	3,36	4,47	
48	7,4	0	4,31	4,65	7,15
56	7,4	0	2,25	4,48	
64	7,4	0	2,22	4,29	6,98
72	7,4	0	1,99	4,25	
80	7,4	0	1,87	4,28	6,93
88	7,4	0	1,92	3,63	
96	7,4	0	1,90	3,76	6,54
104	7,4	0	1,76	3,58	
112	7,4	0	1,77	3,56	4,26

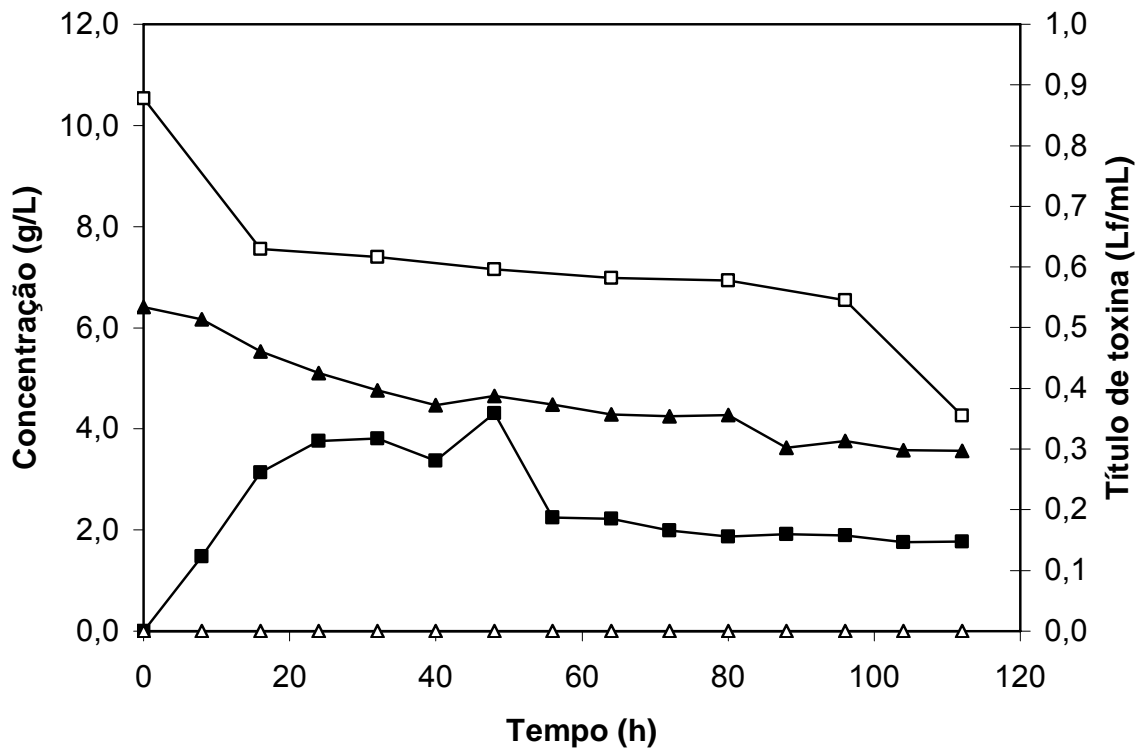


Figura 22: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD22 ( $G_o = 12,0$  g/L e  $NZ_o = 75,0$  g/L).

Tabela 25: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD23 ( $G_o = 9,7$  g/L e  $NZ_o = 43,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	6,88	5,54
8	7,1	0	1,84	6,52	
16	7,1	0	2,69	6,71	5,43
24	7,1	0	3,28	6,56	
32	7,1	0	3,74	6,31	5,15
40	7,1	0	4,01	5,24	
48	7,1	0	3,97	4,17	4,79
56	7,1	60	4,07	3,38	
64	7,1	65	4,22	2,81	4,26
72	7,1	65	4,20	2,39	
80	7,1	65	4,24	1,78	3,40
88	7,4	70	4,43	1,48	
96	7,4	70	4,31	1,45	3,18
104	7,4	70	4,20	1,09	
112	7,9	70	2,78	1,06	2,58



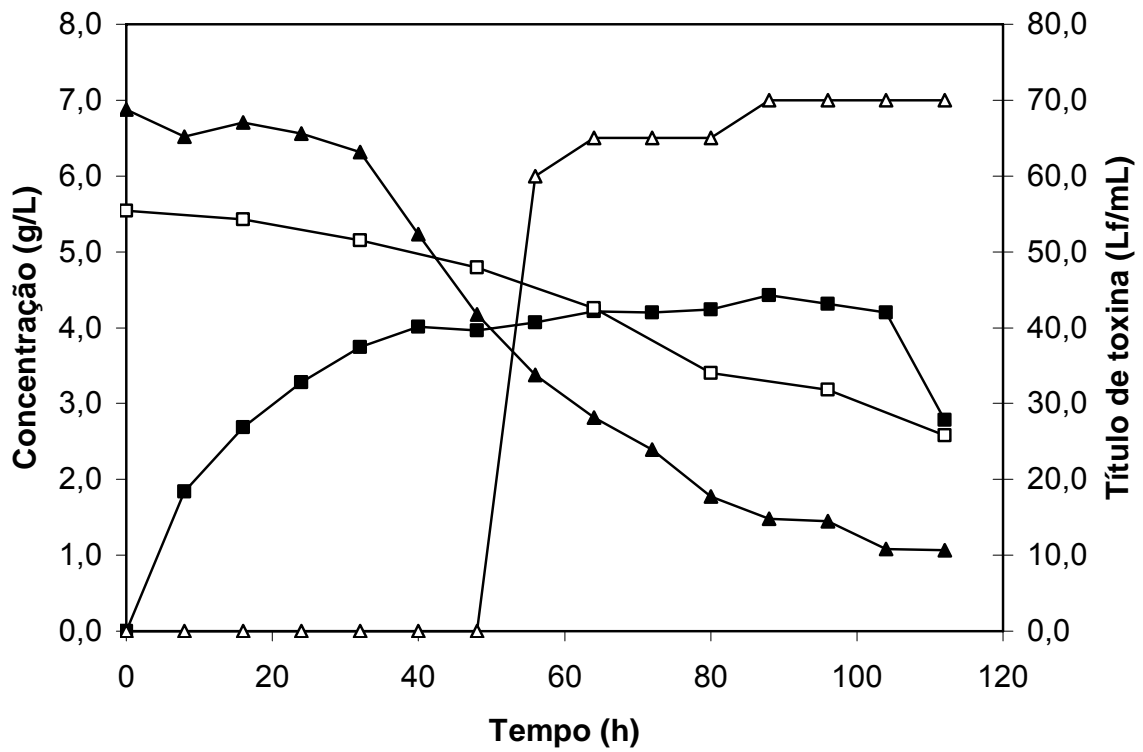


Figura 23: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD23 ( $G_o = 9,7$  g/L e  $NZ_o = 43,5$  g/L).

Tabela 26: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD24 ( $G_o = 9,7$  g/L e  $NZ_o = 43,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	6,91	5,65
8	7,1	0	2,07	6,70	
16	7,1	0	2,83	6,87	5,34
24	7,1	0	2,91	6,31	
32	7,1	0	3,81	5,83	5,35
40	7,1	0	5,05	5,12	
48	7,1	0	5,03	4,12	5,15
56	7,1	60	5,08	3,31	
64	7,1	60	5,27	3,02	4,61
72	7,1	65	6,52	2,62	
80	7,1	65	4,78	1,94	3,32
88	7,1	70	4,40	1,37	
96	7,4	70	3,91	1,16	2,91
104	7,4	70	3,84	1,03	
112	7,9	70	3,32	0,53	2,30

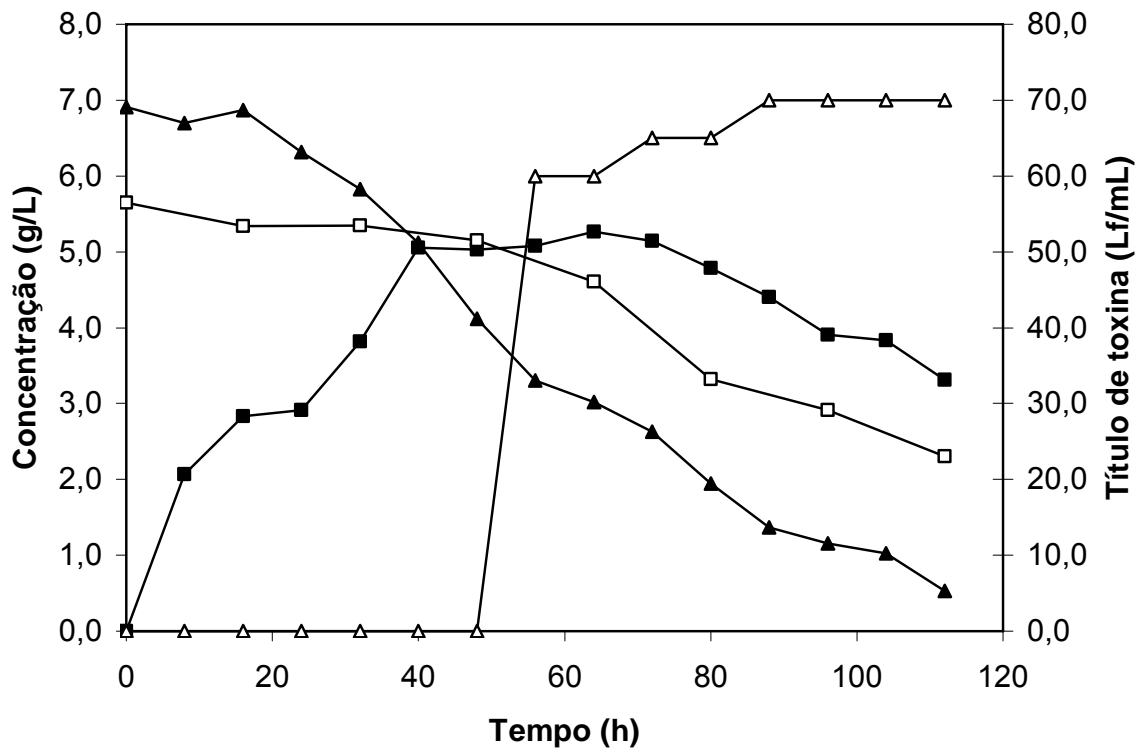


Figura 24: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD24 ( $G_o = 9,7$  g/L e  $NZ_o = 43,5$  g/L).

Tabela 27: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PD25 ( $G_o = 9,7$  g/L e  $NZ_o = 43,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,4	0	-	6,79	5,26
8	7,1	0	1,87	6,58	
16	7,1	0	2,78	6,92	5,10
24	7,1	0	4,74	6,31	
32	7,1	0	4,71	5,59	5,12
40	7,1	0	4,78	4,97	
48	7,1	0	4,51	4,38	4,99
56	7,1	65	3,94	3,57	
64	7,1	65	3,93	2,86	4,15
72	7,1	65	3,54	2,38	
80	7,1	70	3,59	2,22	3,41
88	7,1	70	3,34	1,76	
96	7,1	75	3,15	1,39	2,60
104	7,4	75	3,16	0,73	
112	7,9	75	2,89	0,63	2,53

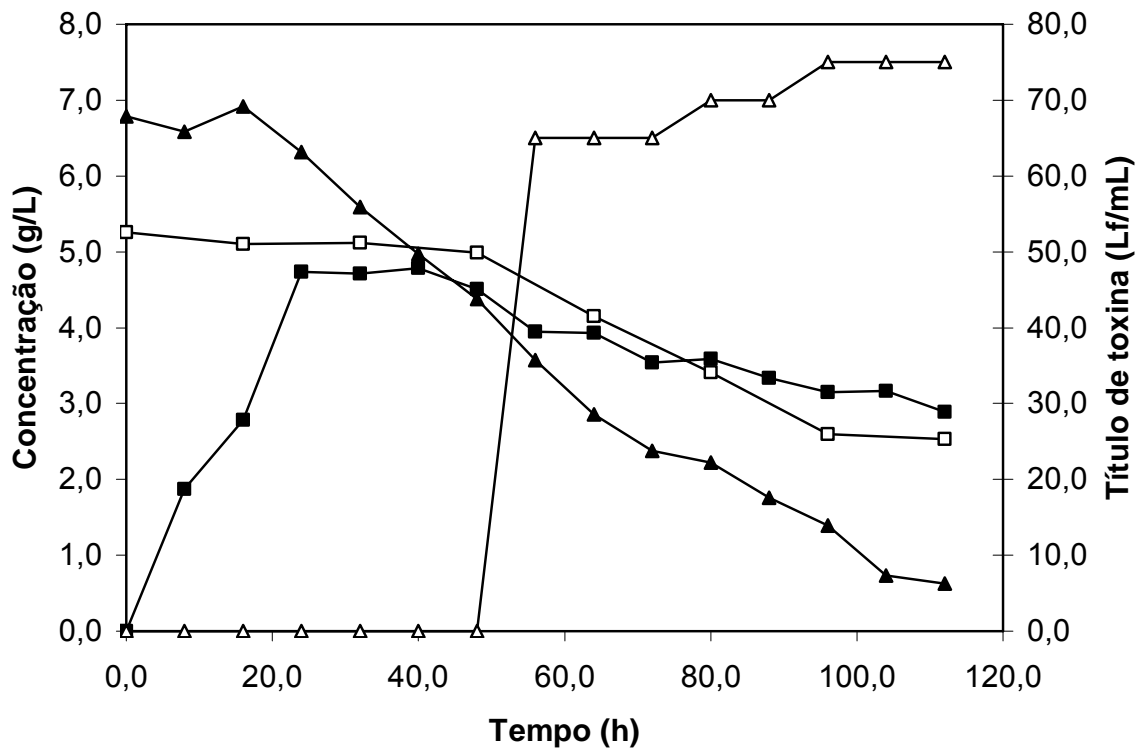


Figura 25: Título de toxina ( $\Delta$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PD25 ( $G_o = 9,7$  g/L e  $NZ_o = 43,5$  g/L).

Tabela 28 . Resultados de cultivos de *C. tetani* obtidos em diferentes concentrações iniciais de glicose ( $G_0$ ) e NZ Case TT<sup>®</sup> ( $NZ_0$ )

Ensaio	$X_1^a$	$X_2^b$	$G_0$ (g/L)	$NZ_0$ (g/L)	$X_m^c$ (g/L)	$T_f^d$ (h)	$pH_f^e$	$TT_f^f$ (L/mL)	$G_f^g$ (g/L)	$N_f^h$ (g/L)
<i>Parte A: Planejamento experimental em estrela com cinco níveis</i>										
1	-1	-1	4,0	12,5	3,53	112	7,1	15	0,23	0,37
2	1	-1	12,0	12,5	3,01	112	7,1	12	6,37	0,33
3	-1	1	4,0	37,5	4,98	104	7,9	40	0,02	0,58
4	1	1	12,0	37,5	3,98	112	7,9	70	4,17	0,99
5	0	-1,414	8,0	7,3	1,80	112	6,5	0	4,99	0,54
6	-1,414	0	2,3	25,0	4,01	112	8,1	0	0,02	1,21
7	0	1,414	8,0	42,7	5,52	88	7,4	70	1,88	2,66
8	1,414	0	13,7	25,0	4,29	112	7,4	50	4,76	1,67
9	0	0	8,0	25,0	5,00	96	7,4	40	0,15	1,44
10	0	0	8,0	25,0	5,10	96	7,4	40	0,53	1,85
11	0	0	8,0	25,0	4,98	96	7,4	40	0,22	1,80
12	0	0	8,0	25,0	3,94	96	7,7	40	4,13	1,85
13	0	0	8,0	25,0	3,68	96	7,4	40	4,44	2,13
14	0	0	8,0	25,0	4,41	112	7,1	40	1,96	1,77
<i>Parte B: Testes adicionais para otimização do processo</i>										
15	-1	2	4,0	50,0	4,36	104	8,0	80	0,43	4,85
16	0	2	8,0	50,0	4,27	88	8,0	80	3,01	4,13
17	1	2	12,0	50,0	3,89	112	7,8	70	6,83	3,54
18	1	1,414	12,0	42,7	3,96	88	8,0	30	7,06	2,66
19	-1	1,414	4,0	42,7	2,97	88	8,0	60	1,13	2,76
20	-1	4	4,0	75,0	4,36	112	7,9	0	0,02	4,85
21	0	4	8,0	75,0	4,71	112	7,7	0	0,09	5,37
22	1	4	12,0	75,0	4,31	112	7,4	0	3,56	4,26
<i>Parte C: Testes de confirmação do ponto de ótimo</i>										
23	0,43	1,48	9,7	43,5	4,43	88	7,4	70	1,48	3,40
24	0,43	1,48	9,7	43,5	6,52	88	7,1	70	1,37	3,32
25	0,43	1,48	9,7	43,5	4,78	96	7,1	75	1,39	2,60

<sup>a</sup>  $X_1$  = valor codificado da concentração inicial de glicose [ $X_1 = (G_0 - 8) / 4$ ]. <sup>b</sup>  $X_2$  = valor codificado da concentração inicial de N-Z Case TT<sup>®</sup> [ $X_2 = (NZ_0 - 25,0) / 12,5$ ]. <sup>c</sup>  $X_m$  = concentração celular máxima. <sup>d</sup>  $T_f$  = tempo de fermentação. <sup>e</sup>  $pH_f$  = pH final. <sup>f</sup>  $TT_f$  = título final de toxina. <sup>g</sup>  $G_f$  = concentração final de glicose. <sup>h</sup>  $N_f$  = concentração final de nitrogênio.

Está claro na literatura o reconhecimento do meio desenvolvido por Latham *et al.* (1962) como sendo o meio mais apropriado para o cultivo de *C. tetani* para fins de produção de toxina tetânica. Embora o *C. tetani* tenha um crescimento excelente em meio de tioglicolato, classicamente utilizado para microrganismos anaeróbios (WASSILAK *et al.*, 2003), este meio não se presta bem à etapa de produção da toxina e somente vem sendo utilizado para a fase de propagação da cepa (ZACHARIAS & BJÖRKLUND, 1968), bem como para a reconstituição da cepa liofilizada (De LUCCA *et al.*, 1997).

Até 1962, os meios que vinham sendo utilizados para a produção de toxina tinham como um fator essencial em sua composição o extrato de carne de coração, que após muitos anos de pesquisa, teriam sua quantidade diminuída com a utilização de um digesto pancreático, bem como a incorporação de diversos nutrientes, como glicose, aminoácidos, uracila, vitaminas e sais inorgânicos (FISEK *et al.*, 1954), e da adequação do nível de ferro reduzido no meio de cultivo. Anteriormente, Müller & Miller (1954) também já haviam determinado parâmetros importantes na preparação do meio de cultivo, como o tratamento com cálcio, fosfato e carvão ativo para clarificação do meio e remoção de possíveis substâncias inibitórias. O meio desenvolvido por Latham *et al.* (1962) substituiu com vantagens o meio desenvolvido por Fisek *et al.* (1954), pois já não apresentava em sua composição extrato de carne de coração, mas somente hidrolisado de caseína, conseguindo dessa forma eliminar a presença de proteínas estranhas no meio, sem a perda de rendimento na formação de toxina. No entanto, a complexidade da relação entre as concentrações dos vários componentes do meio de cultivo (FISEK *et al.*, 1954; MÜELLER & MILLER, 1954; LATHAM *et al.*, 1962), bem como a forma de preparo (MÜELLER & MILLER, 1954) e o tipo de processo utilizado no cultivo (THOMSON, 1957; ZACHARIAS & BJÖRKLUND, 1968) representavam dificuldades destacadas pelos pesquisadores que trabalharam com a produção de toxina tetânica. Dessa forma, neste trabalho, foi julgado importante verificar se outras combinações entre os componentes básicos principais do meio de Latham *et al.* (1962) poderiam proporcionar maiores rendimentos em toxina tetânica. Para isto, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta, comumente empregada em cultivos microbianos, por possibilitar a otimização simultânea dessas variáveis, bem

como permitir a verificação de possíveis interações entre elas (BOX *et al.*, 1978). Como mencionado anteriormente, os níveis empregados como pontos centrais para as concentrações de glicose e *N-Z Case TT*<sup>®</sup> do planejamento experimental adotado neste trabalho, baseados nos níveis recomendados por Latham *et al.* (1962), são empregados no Instituto Butantan (São Paulo- Brasil) na escala de produção. Em escala de produção, os níveis de toxina tetânica produzidos são da ordem de 60 Lf/mL. Como se observa nas Figuras 9 a 14, referentes a resultados obtidos com o ponto central adotado neste trabalho ( $G_0 = 8$  g/L;  $NZ_0 = 25$  g/L), e no tipo de frasco empregado, a concentração de toxina tetânica obtida foi de 40 Lf/mL. Isto se deve, provavelmente, ao tipo de reator utilizado neste trabalho e/ou devido o processo em cultivo estático, que teria dificultado o escape dos gases formados, levando a menores rendimentos em toxina (MÜELLER *et al.*, 1948). Outra hipótese, que não pode ser descartada, é a etapa de esterilização do meio de cultivo. Embora inicialmente tenha sido observado o cuidado de esterilização do meio em condições iguais àsquelas utilizadas nos reatores de produção, não houve produção de toxina tetânica (dados não mostrados). Todavia, ocorreu a formação de toxina tetânica nos cultivos em pequena escala quando o meio de cultura foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos (LATHAM *et al.*, 1962). Isso provavelmente decorreu do fato de se trabalhar com volumes muito diferentes, pois em escala de produção industrial os volumes são da ordem de 1300 vezes maiores que os utilizados nestes experimentos, que seriam possivelmente, causadores de alterações do meio, devido aos tempos maiores requeridos para o seu aquecimento e resfriamento. Thomson (1957) também mencionou que o processo de autoclavação é um fator importante a ser considerado para a obtenção de altos títulos de toxina. Assim, foram padronizadas as condições de autoclavação que levassem à formação de toxina, como descrito anteriormente. Durante a etapa de autoclavação, devido à grande quantidade de energia fornecida ao sistema, reações podem ocorrer, principalmente entre a glicose e as fontes de nitrogênio (peptídeos e aminoácidos). De fato, fica claro que essa reação ocorreu pelo fato dos níveis iniciais de glicose determinados experimentalmente, serem menores do que aqueles que realmente foram adicionados no meio de cultivo (Tabela 28). Um elemento ao qual também têm sido atribuídas modificações no processo de esterilização é a cistina (LATHAM *et al.*,



1962), de tal forma que sua adição é recomendada desde as primeiras formulações de meio de cultivo para produção de toxina tetânica por Müller & Miller, 1942. Outros fatores, como método de inóculo e idade de inóculo não são considerados fatores determinantes (Müller & Miller, 1954), e não parecem ter sido os fatores responsáveis por essas diferenças. Deve ser ressaltado, no entanto, que embora ocorram diferenças dos títulos de toxina entre as escalas de produção (pequena e grande escala) é esperado que a tendência de aumento de título, verificada em pequena escala, seja posteriormente verificada em escala de produção, como relatado por Müller & Miller (1945), que trabalharam em pequena escala com 20 mL de meio de cultivo em tubos de ensaio.

Considerando o planejamento experimental inicialmente idealizado (Tabela 28, parte A), foram avaliadas diferentes relações entre as concentrações iniciais de glicose e *N-Z Case TT*<sup>®</sup> no meio de cultivo. No experimento PD1, onde foram empregados baixos níveis de concentração de glicose e *N-Z Case TT*<sup>®</sup>, observa-se que houve o consumo total das fontes de carbono e nitrogênio (Figura 1). Essa limitação por nutrientes provavelmente foi a responsável pelo retardo na curva de crescimento (onde o máximo valor da concentração celular ocorreu somente com 88 horas de fermentação), com a conseqüente pequena e tardia produção de toxina tetânica, somente detectada após 112 horas de cultivo. No experimento PD2, embora tenha sido fornecida uma quantidade maior de glicose em relação ao experimento PD1, e até mesmo que os experimentos correspondentes ao ponto central do planejamento (PD9 a PD14), o que poderia levar a um consumo maior deste açúcar como fonte de carbono, isto não ocorreu, levando a uma sobra substancial de glicose (Figura 2), indicando que níveis mais baixos de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> limitaram o crescimento celular e conseqüentemente o consumo de glicose. Também neste experimento o crescimento foi retardado, como demonstra a curva, embora em menor intensidade que no caso do experimento PD1, levando a resultados não satisfatórios em relação à produção de toxina tetânica. Fica evidente com os resultados destes dois experimentos que a limitação por nitrogênio dificulta severamente a produção da toxina tetânica. Com relação aos experimentos PD3 e PD4, procurou-se então avaliar como se desenvolveriam os cultivos aumentando a quantidade da fonte de nitrogênio adicionada ao sistema. Observa-se claramente

que houve uma melhora substancial em relação aos experimentos PD1 e PD2, tanto no tempo de desenvolvimento da cultura (menores ou iguais a 64 horas) quanto nos títulos de toxina obtidos. Adicionalmente, observa-se na Tabela 28 (parte A), que nos experimentos PD1 e PD2, onde a limitação por nitrogênio foi mais marcante, o pH final do cultivo foi menor que nos experimentos PD3 e PD4, onde o fornecimento da fonte de nitrogênio não levou à carência, como se observa pelos maiores níveis residuais desta no meio de cultivo. Nota-se ainda, observando os níveis finais destes experimentos que, como esperado, a concentração residual foi maior no experimento PD4 ( $N_f = 0,99$  g/L), pois neste experimento a concentração inicial de glicose foi mais elevada. Outra observação denota que o tipo de metabolismo utilizado pelo microrganismo para seu crescimento relaciona-se ao pH final do meio de cultivo. Nos experimentos PD1 e PD2 o pH final foi de 7,1 enquanto que nos experimentos PD3 e PD4 o pH final foi de 7,9, indicando que quando o microrganismo utilizou o *N-Z Case TT*<sup>®</sup> como fonte de carbono, para formação de célula e/ou manutenção, houve provavelmente a liberação de amônia no meio de cultivo com conseqüente aumento do pH. De fato, essas diferenças de pH final indicando vias de utilização de glicose e *N-Z Case TT*<sup>®</sup> foram mais marcantes quando da observação dos valores finais de pH obtidos nos experimentos PD5 e PD6, correspondendo a 6,5 e 8,1, respectivamente (Tabela 28, parte A). Cabe aqui ressaltar que o experimento PD6, embora não tenha levado à formação de toxina, levou a resultados julgados dignos de nota. Neste experimento, durante as primeiras 40 horas de cultivo, ficou nítido o aumento de concentração celular acompanhado pelo consumo de toda a glicose fornecida, com a evidente queda de pH no período de sua utilização (Figura 6), provavelmente com a formação de ácidos como acético, láctico e butírico, os quais são produzidos por diversas espécies do gênero *Clostridium*. Essa preferência da utilização da glicose como fonte de energia, como esperado, é evidente pelo fato da pequena alteração na concentração de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> durante essa fase de utilização de glicose. Após o esgotamento da glicose, a concentração celular se reduz, provavelmente devido a uma deficiência na obtenção de energia, e é obrigada a utilizar a fonte de nitrogênio para este fim. Deste modo, após 40 horas de cultivo, ocorre aumento simultâneo do pH e da concentração celular, decorrente, provavelmente, da adaptação celular a uma nova fonte de

obtenção de energia. Ainda considerando este experimento como exemplo, uma vez que foi a condição de menor adição de glicose e conseqüentemente quando se tornou mais clara a utilização da fonte de nitrogênio (*N-Z Case TT<sup>®</sup>*) como fonte de energia. Pode-se evidenciar este fato com um simples balanço de massa para o nitrogênio. Considerando que a célula bacteriana contém no máximo 80 % de proteína e ainda a relação 6,25 para a razão proteína/nitrogênio, tem-se que a necessidade de nitrogênio para a formação de 4 g (massa seca)/L durante as primeiras 40 horas de cultivo seria de  $4 \times 0,8 / 6,25 = 0,51$  g/L, enquanto que a necessidade de nitrogênio para a formação de células do instante  $t = 72$  h a  $t = 104$  h seria de 0,18 g/L, totalizando 0,69 g/L. No entanto, observando a curva de nitrogênio desse experimento, nota-se um consumo de 2,11 g/L. Com essa diferença conclui-se que grande parte do nitrogênio adicionado no meio de cultivo não foi para formação celular. De fato, o *C. tetani* provavelmente usou apenas os alfa-cetoácidos correspondentes aos aminoácidos, liberando amônia no meio de cultivo, que foi a responsável pelo aumento do pH. Devido ao pH alcalino do meio de cultivo, parte da amônia deve ter se perdido no gás de arraste, constituído principalmente de CO<sub>2</sub> e demais voláteis, formados devido ao metabolismo microbiano.

Considerando o planejamento em estrela adotado inicialmente, com os correspondentes pontos centrais (Tabela 28, parte A), conclui-se que a melhor condição de produção de toxina tetânica foi aquela que combinou concentrações iniciais de glicose e *N-Z Case TT<sup>®</sup>* de 8 e 42,7 g/L (experimento PD7), respectivamente, propiciando a obtenção do título máximo (70 Lf/mL) em 88 horas de fermentação. De fato, esta condição mostrou-se bastante adequada, pois levou a um crescimento celular vigoroso nas primeiras 56 horas de fermentação, acompanhado do consumo de glicose. Após esse período, nota-se um aumento da velocidade de consumo do *N-Z Case TT<sup>®</sup>*, com o respectivo aumento na liberação de toxina tetânica no meio de cultivo.

Após a conclusão dessa primeira fase, os resultados foram analisados pela metodologia de superfície de resposta e não foi possível se chegar a uma equação quadrática para o modelo, que levaria à obtenção do ponto de máximo do título de toxina em função das variáveis independentes avaliadas neste trabalho. Observando-se a Figura 26, que resume os títulos obtidos nos ensaios PD1 a PD14

(Tabela 28, parte A), isso já seria esperado, pois nota-se uma tendência ao aumento dos títulos de toxina quando do emprego de maiores níveis iniciais da concentração de *N-Z Case TT*<sup>®</sup>. Dessa forma, foram realizados experimentos adicionais que pudessem expandir esse planejamento experimental na direção em que foram obtidos os mais altos títulos de toxina tetânica (Tabela 28, parte B), visando encontrar o ponto de máximo da função que relaciona o título de toxina com as variáveis independentes avaliadas neste trabalho.

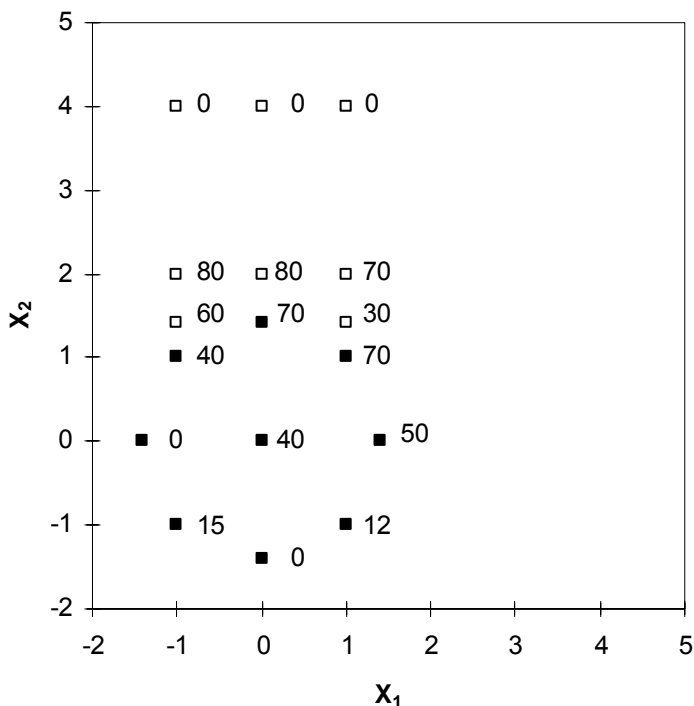


Figura 26: Valores experimentais de título de toxina (Lf/mL) em relação a diferentes níveis codificados de concentrações iniciais de glicose ( $X_1$ ) e *N-Z Case TT*<sup>®</sup> ( $X_2$ ). (■) planejamento experimental inicial (Tabela 28, parte A); (□) expansão do planejamento experimental (Tabela 28, parte B).

Todos os resultados obtidos pelas fases A e B deste trabalho estão representados pela equação:

$$TT_f \text{ (Lf/mL)} = 46,29 + 5,55 \cdot X_1 + 26,82 \cdot X_2 - 6,39 \cdot X_1^2 - 9,04 \cdot X_2^2 \quad (2)$$

( $p < 0,0001$ ;  $R^2 = 0,76$ )

A partir desta equação foi elaborada a Figura 27, que mostra claramente que foi possível encontrar o ponto de máximo desta.

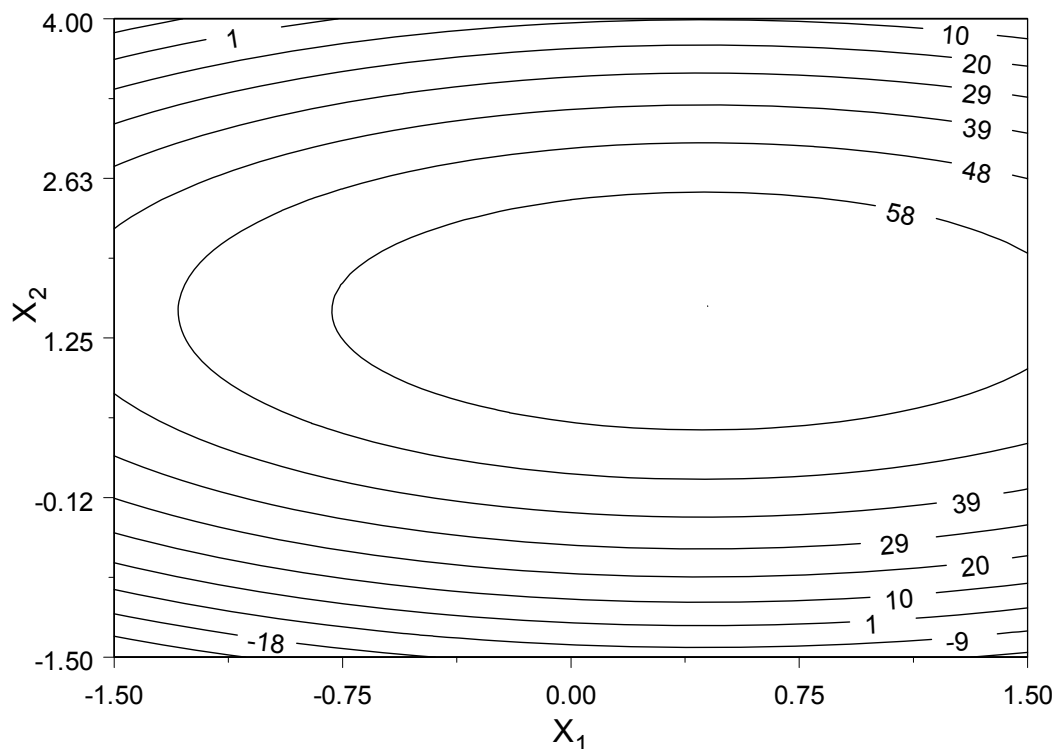


Figura 27: Gráfico de contorno relacionando título de toxina em função dos níveis codificados de concentrações iniciais de glicose ( $X_1$ ) e N-Z Case TT<sup>®</sup> ( $X_2$ ).

A partir da equação 2, foi possível determinar como  $G_0 = 9,7$  g/L e  $NZ_0 = 43,5$  g/L como sendo as concentrações que maximizam o teor de toxina tetânica no meio fermentado. Assim, foram realizados os testes de confirmação (Tabela 28, parte C), cujos comportamentos podem ser visualizados nas Figuras 23 a 25. De um modo geral, observa-se que numa primeira etapa (até 40h) houve intenso crescimento celular com consumo de parte da glicose fornecida, sem que se notasse um consumo substancial da fonte de nitrogênio. Após esse período a concentração celular decaiu lentamente até o término do cultivo, numa fase onde se verificou um consumo mais acentuado da fonte de nitrogênio e a formação da toxina tetânica. Considerando o valor médio final do título de toxina tetânica obtidos nos experimentos PD23 a PD25 ( $72 \pm 3$  Lf/mL, com 96h), pode-se concluir que esse valor não difere substancialmente do valor máximo estimado pela equação 2 (67,4 Lf/mL), correspondendo a uma diferença de 6,4 %. Nessa condição, o título final de

toxina foi da ordem de 79% maior que aquele obtido quando da utilização das condições preconizadas por Latham *et al.* (1962). Assim, a metodologia de superfície de resposta permitiu que se otimizasse a produção de toxina tetânica em erlenmeyers em cultivo estático.

### **V.1. Processo descontínuo alimentado**

Neste item, são apresentados os resultados obtidos referentes aos experimentos correspondentes aos processos descontínuos alimentados, bem como sua discussão. Os resultados são apresentados na forma de tabelas (Tabelas 29 a 44) e figuras (Figuras 28 a 43). Também são apresentados os resultados referentes aos cultivos padrão realizados (Tabelas 45 e 46 e Figuras 44 e 45), utilizando processo descontínuo, cujos resultados serviram como base para comparação com os resultados obtidos nos cultivos descontínuos alimentados.

Tabela 29: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA1A\* ( $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	2,00	3,18
8	7,0	0	2,16	1,70	
16	7,0	0	2,14	1,58	3,02
16	7,0	0	2,14	3,00	
24	6,9	0	1,97	2,85	
32	6,9	0	2,96	1,85	2,96
40	6,9	0	2,78	2,15	
48	6,8	0	3,23	2,15	2,91
56	6,8	0	2,75	1,75	
56	6,8	0	2,75	3,00	
64	6,9	0	3,11	2,00	2,49
72	6,9	0	3,46	1,80	
80	7,0	25	3,37	1,30	2,05
88	7,0	25	3,39	0,80	
88	7,0	25	3,39	3,00	
96	7,1	35	2,97	2,20	1,80
104	7,2	35	2,71	1,95	
112	7,2	35	1,86	1,85	1,63

\* A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.



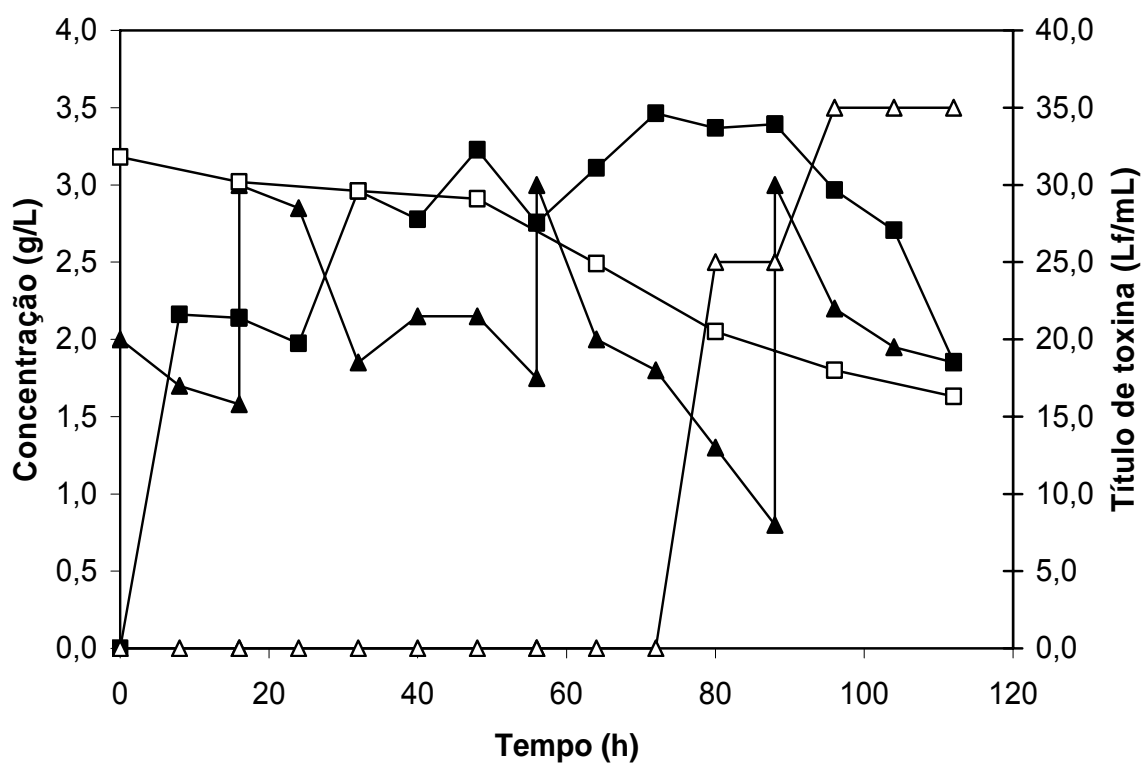


Figura 28: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA1A ( $NZ_o = 25,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

Tabela 30: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA1B\* ( $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	2,00	3,21
8	7,0	0	0,85	1,85	
16	7,0	0	1,22	1,68	2,98
16	7,0	0	1,22	3,00	
24	6,9	0	1,36	2,24	
32	6,8	0	2,00	2,40	2,71
40	6,8	0	2,47	2,30	
48	6,7	0	3,20	2,10	2,52
56	6,6	0	2,73	1,50	
56	6,6	0	2,73	3,00	
64	6,6	0	3,58	2,45	2,32
72	6,9	25	3,68	2,15	
80	7,0	25	3,13	1,75	1,97
88	7,0	35	2,73	1,15	
88	7,0	35	2,73	3,00	
96	7,1	35	1,97	2,45	1,93
104	7,2	35	1,86	2,05	
112	7,2	35	1,78	2,15	1,71

\* A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

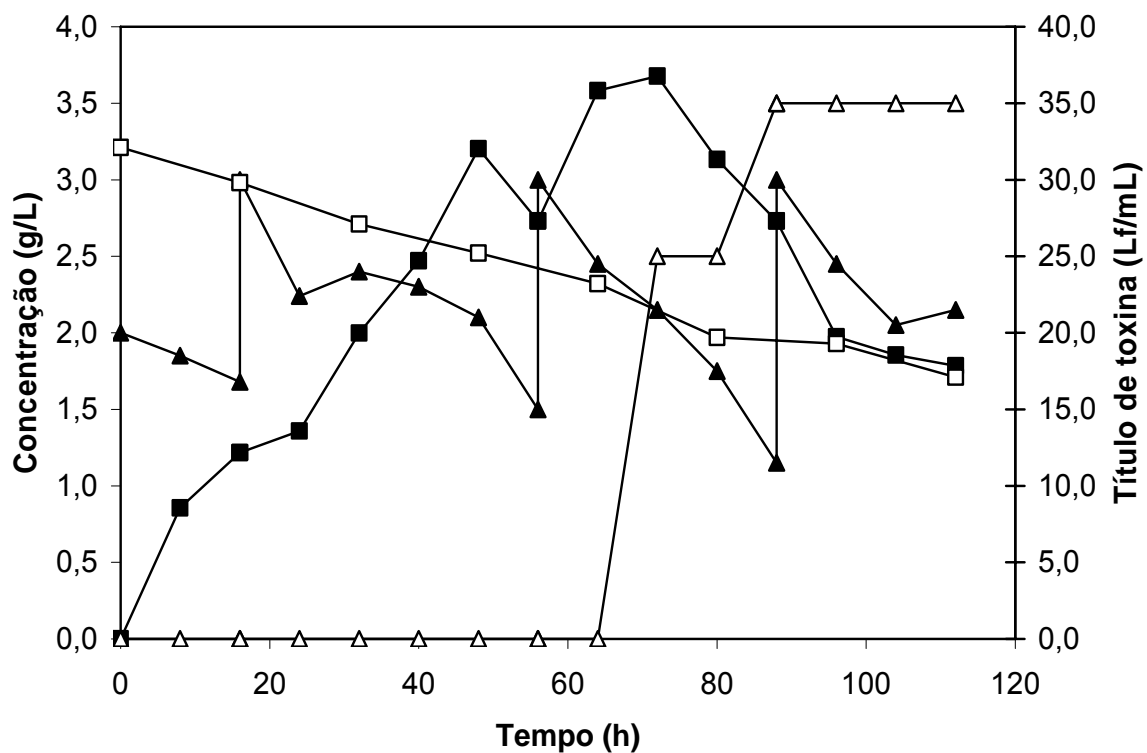


Figura 29: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA1B ( $NZ_0 = 25,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

Tabela 31: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA2A\* ( $NZ_0 = 37,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	1,50	4,74
8	7,1	0	1,24	1,35	
16	7,1	0	1,74	0,96	4,54
16	7,1	0	1,74	3,00	
24	6,9	0	2,19	2,70	
32	6,9	0	3,01	2,85	4,49
40	6,8	0	3,35	2,35	
48	6,7	0	3,51	1,90	4,01
56	6,7	0	3,53	1,80	
56	6,7	0	3,53	3,00	
64	6,8	35	2,80	2,35	3,72
72	7,1	45	2,85	2,25	
80	7,2	45	2,30	1,90	3,76
88	7,3	45	2,45	1,55	
88	7,3	45	2,45	3,00	
96	7,3	45	2,00	2,70	3,21
104	7,4	45	2,02	2,42	
112	7,4	50	1,67	2,55	2,88

\* A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

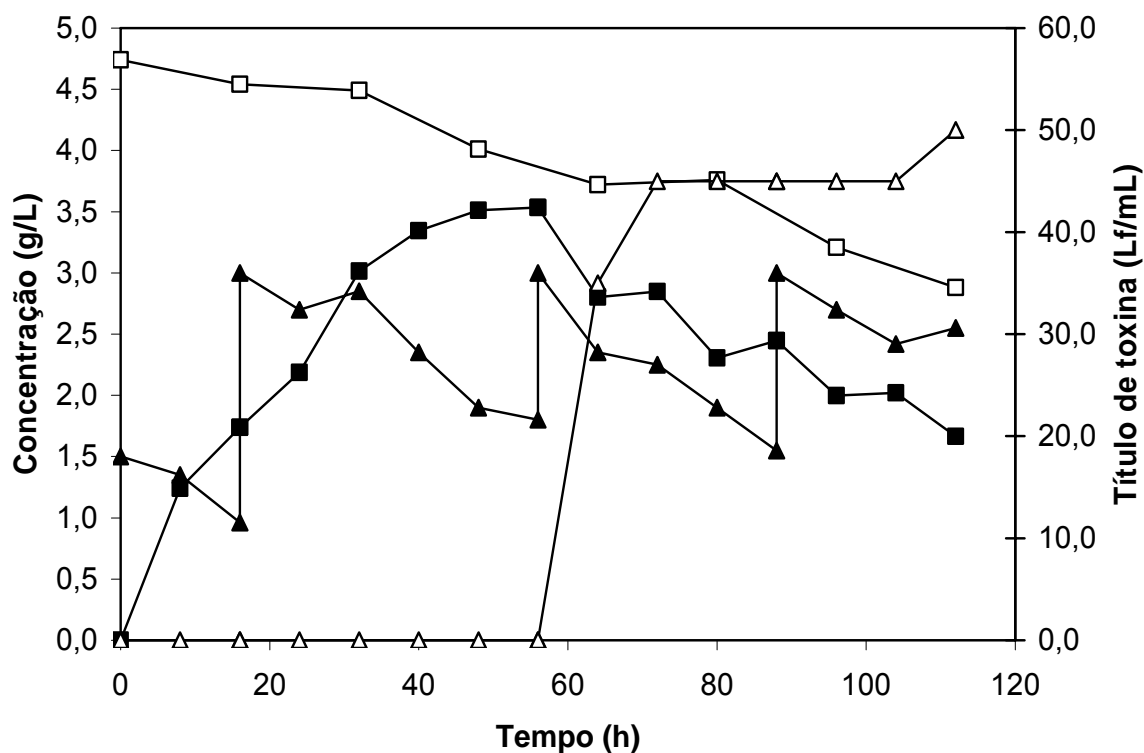


Figura 30: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA2A ( $NZ_o = 37,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

Tabela 32: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA2B\* ( $NZ_o = 37,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	1,50	4,63
8	7,1	0	1,23	1,35	
16	7,1	0	1,74	0,94	4,33
16	7,1	0	1,74	3,00	
24	7,0	0	1,78	2,60	
32	7,0	0	2,26	2,40	4,03
40	6,9	0	2,28	2,45	
48	6,8	0	3,11	2,15	4,01
56	6,7	0	3,18	1,60	
56	6,7	0	3,18	3,00	
64	6,8	35	1,52	2,45	3,62
72	7,2	35	1,52	2,85	
80	7,2	35	1,60	2,85	3,54
88	7,2	35	1,31	2,50	
88	7,2	35	1,31	3,00	
96	7,2	35	1,07	3,00	3,19
104	7,4	35	1,29	2,95	
112	7,4	35	1,22	2,80	3,01

\* A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

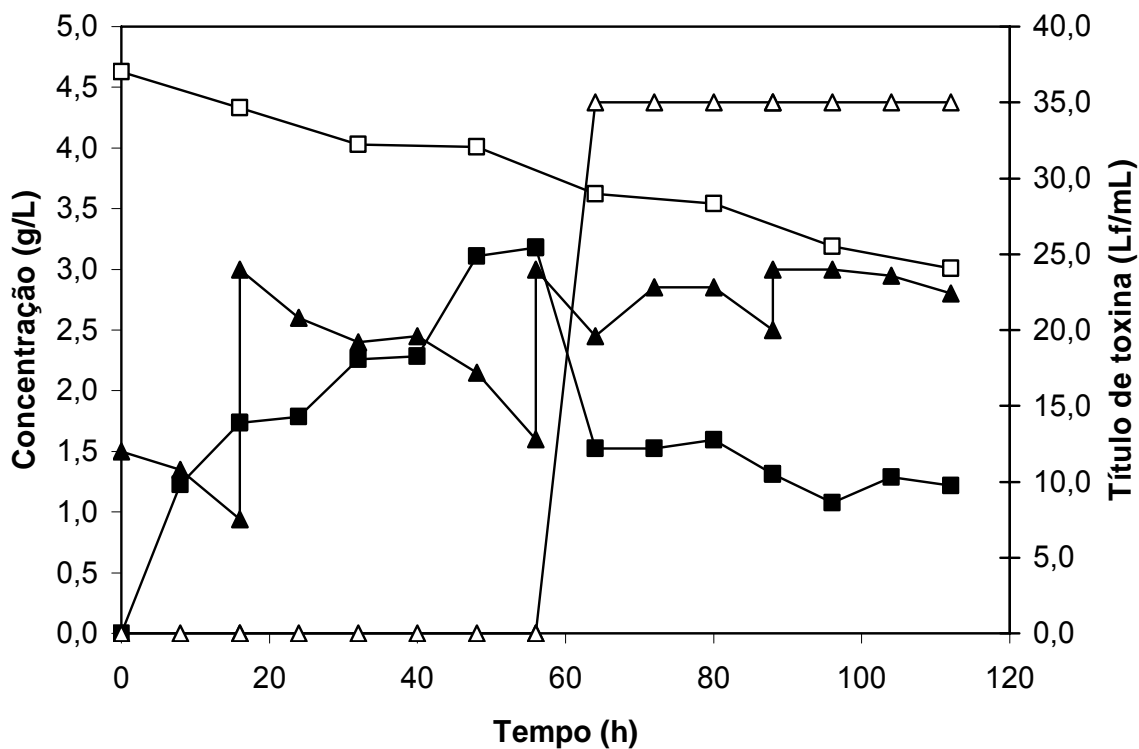


Figura 31: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA2B ( $NZ_o = 37,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

Tabela 33: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA3A\* ( $NZ_0 = 50,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	1,25	6,32
8	7,0	0	1,61	1,15	
16	6,9	0	2,16	0,76	5,93
16	6,9	0	2,16	3,00	
24	6,9	0	2,30	2,45	
32	6,9	0	2,68	2,50	5,87
40	6,8	0	4,15	2,30	
48	6,8	0	3,30	2,00	5,87
56	6,8	35	2,73	1,45	
56	6,8	35	2,73	3,00	
64	6,8	45	1,78	2,75	5,71
72	7,1	50	2,35	2,90	
80	7,1	50	2,30	2,35	4,04
88	7,1	50	1,78	2,20	
88	7,1	50	1,78	3,00	
96	7,2	50	2,04	2,55	3,91
104	7,4	55	1,81	2,40	
112	7,4	60	1,71	2,15	3,88

\* A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.



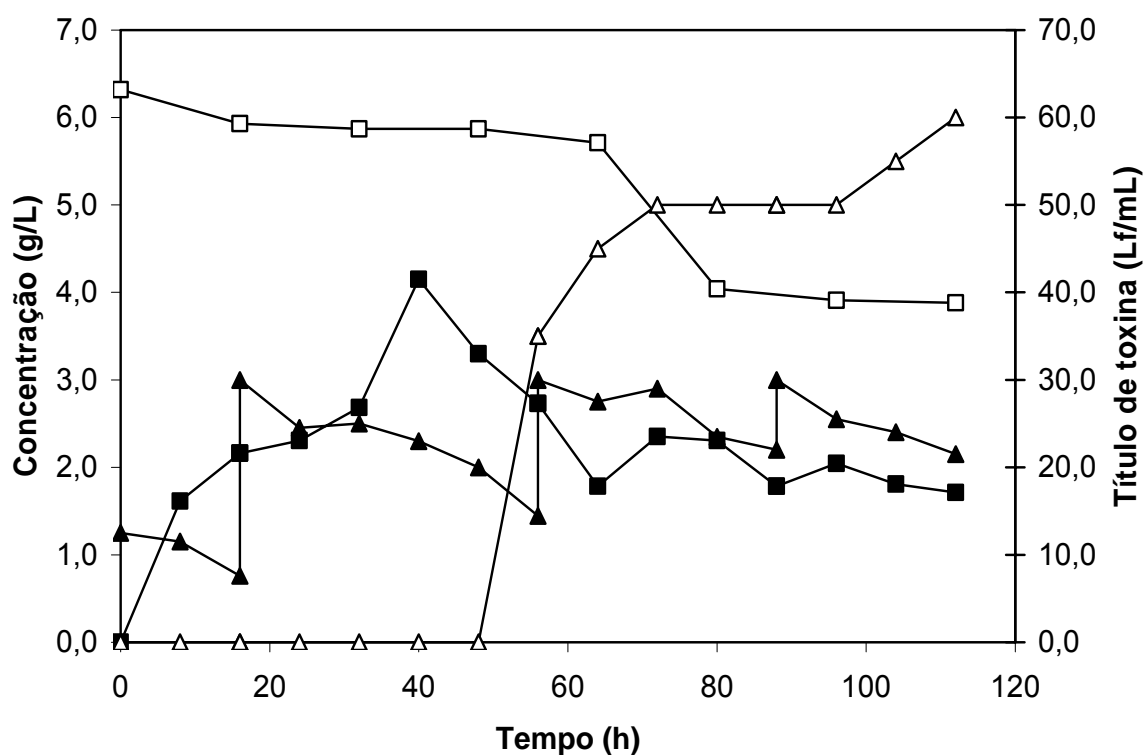


Figura 32: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA3A ( $NZ_o = 50,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

Tabela 34: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA3B\* ( $NZ_o = 50,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	1,25	6,47
8	7,0	0	1,61	1,35	
16	6,9	0	1,78	0,78	6,01
16	6,9	0	1,78	3,00	
24	6,9	0	2,28	2,95	
32	6,8	0	2,28	2,95	6,03
40	6,9	0	2,45	2,60	
48	6,8	0	2,26	2,65	5,78
56	6,9	45	2,00	1,80	
56	6,9	45	2,00	3,00	
64	6,9	50	2,73	3,00	5,61
72	7,2	50	1,78	2,90	
80	7,2	55	1,67	2,90	3,88
88	7,2	55	0,98	2,90	
88	7,2	55	0,98	3,00	
96	7,2	55	1,48	3,30	3,65
104	7,4	55	1,05	2,70	
112	7,5	60	1,22	2,55	3,41

\* A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

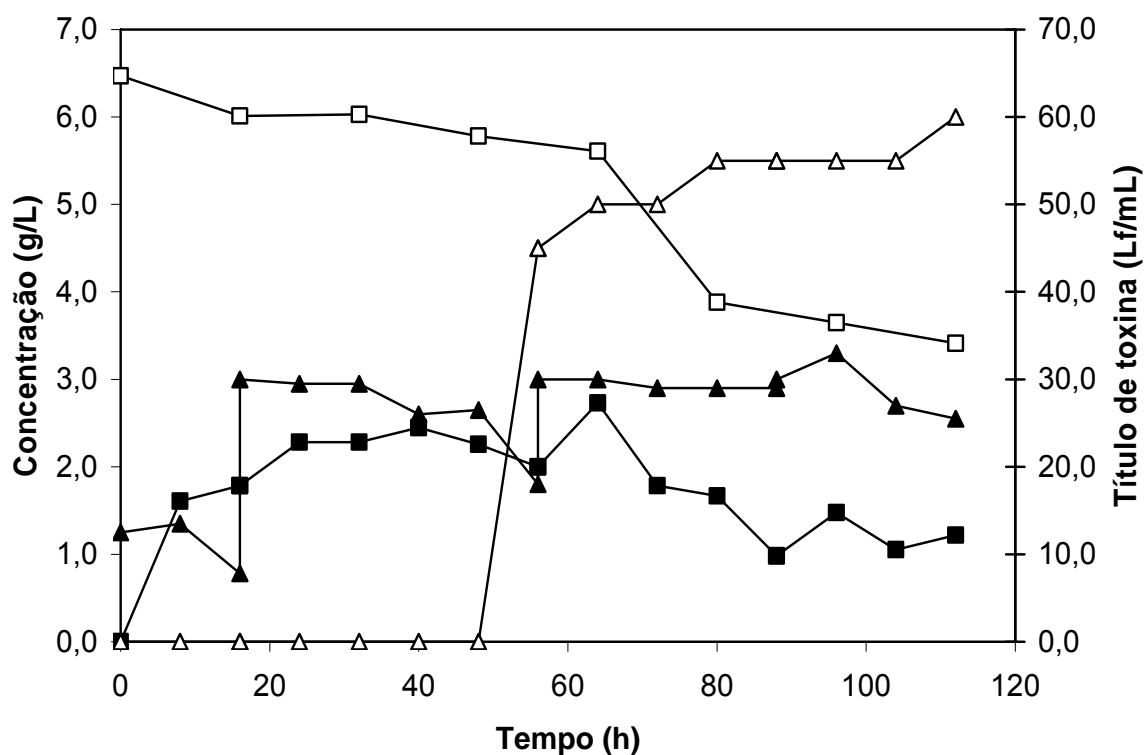


Figura 33: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA3B ( $NZ_o = 50,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

Tabela 35: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA4A\* ( $NZ_o = 62,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	0,75	7,18
8	7,0	0	1,42	0,60	
16	6,9	0	3,25	0,20	6,98
16	6,9	0	3,25	3,00	
24	7,0	0	3,96	2,33	
32	6,9	0	4,69	2,50	6,18
40	6,8	0	4,32	2,15	
48	6,8	0	4,94	1,85	5,60
56	6,8	45	4,41	0,80	
56	6,8	45	4,41	3,00	
64	6,8	50	4,55	2,55	4,57
72	7,1	55	4,81	2,15	
80	7,2	55	4,74	1,75	4,46
88	7,2	60	4,03	1,30	
88	7,2	60	4,03	3,00	
96	7,2	60	2,68	2,65	4,50
104	7,3	60	2,64	2,50	
112	7,3	60	2,66	2,45	3,51

\* A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

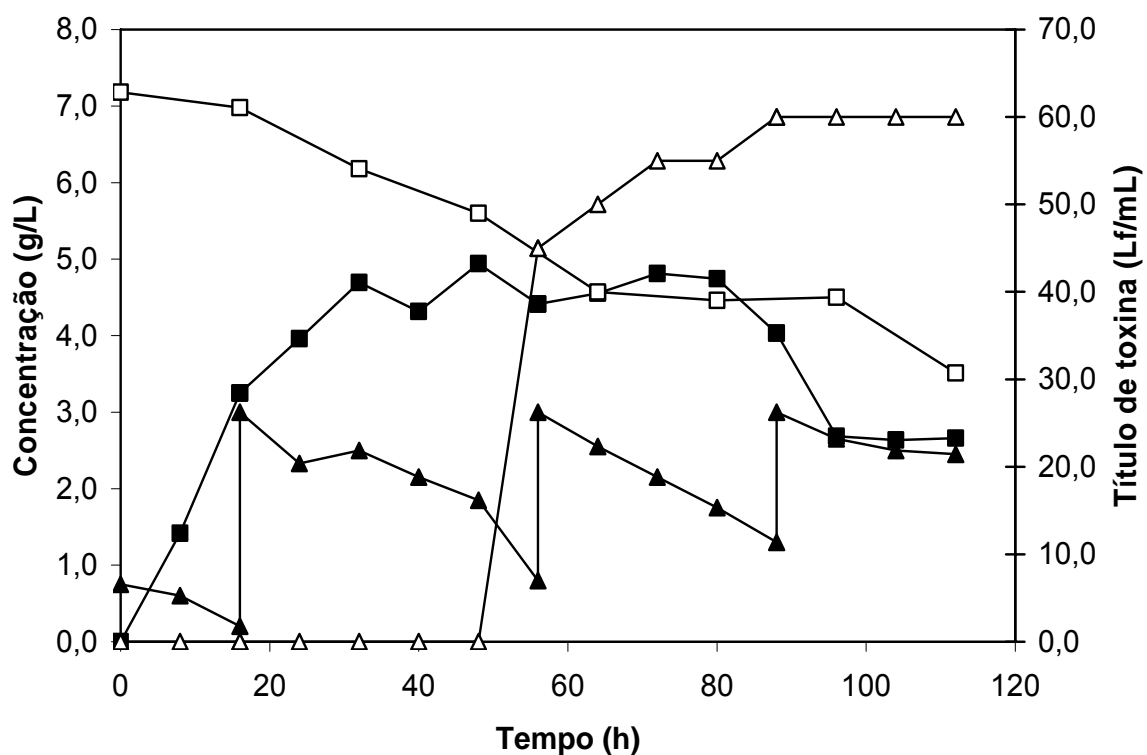


Figura 34: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA4A ( $NZ_o = 62,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

Tabela 36: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA4B\* ( $NZ_o = 62,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	0,75	7,23
8	7,0	0	1,52	0,85	
16	6,9	0	3,87	0,24	7,03
16	6,9	0	3,87	3,00	
24	6,9	0	3,91	2,70	
32	6,9	0	3,91	2,55	6,12
40	6,8	0	3,98	2,40	
48	6,8	0	3,72	2,25	5,38
56	6,9	35	3,21	1,40	
56	6,9	35	3,21	3,00	
64	6,9	50	4,20	3,15	4,72
72	7,3	55	4,34	3,35	
80	7,4	55	2,26	2,75	4,74
88	7,4	60	1,81	2,75	
88	7,4	60	1,81	3,00	
96	7,4	60	1,07	2,50	4,33
104	7,4	60	1,00	2,40	
112	7,4	70	1,05	2,40	3,61

\* A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

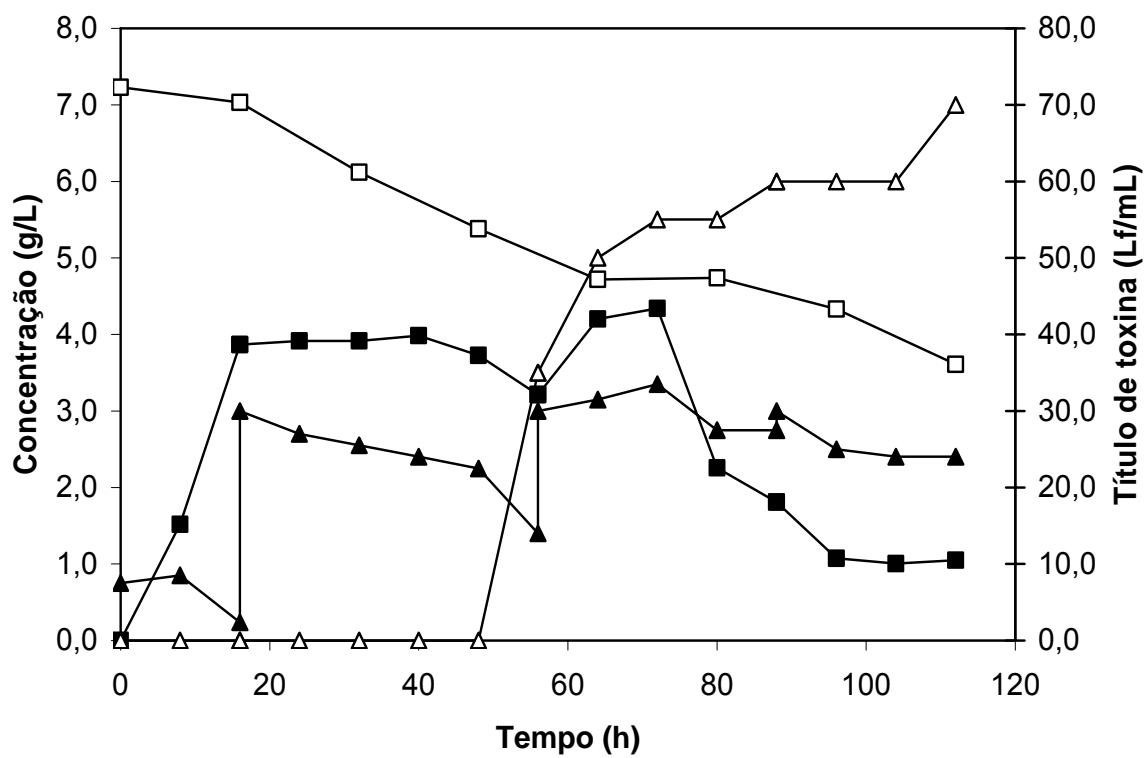


Figura 35: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA4B ( $NZ_o = 62,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida ao valor de 3,0 g/L nos tempos 16, 56 e 88 horas.

Tabela 37: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA5A\* ( $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	3,00	2,49
8	7,4	0	0,88	2,65	
16	7,4	0	1,28	2,63	2,30
24	7,1	0	1,73	2,48	
32	7,1	0	2,21	2,22	1,94
40	6,9	0	2,31	2,14	
48	6,8	10	2,44	1,92	1,85
56	6,8	15	2,62	1,76	
64	7,0	15	2,26	1,34	1,71
64	7,0	15	2,26	3,00	1,71
72	7,2	15	1,99	2,48	
80	7,5	15	1,72	2,54	1,71
88	7,5	15	1,64	2,26	
96	7,5	15	1,46	2,24	1,66
104	7,5	15	1,40	2,12	
112	7,7	15	1,35	2,10	1,58

\* A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).



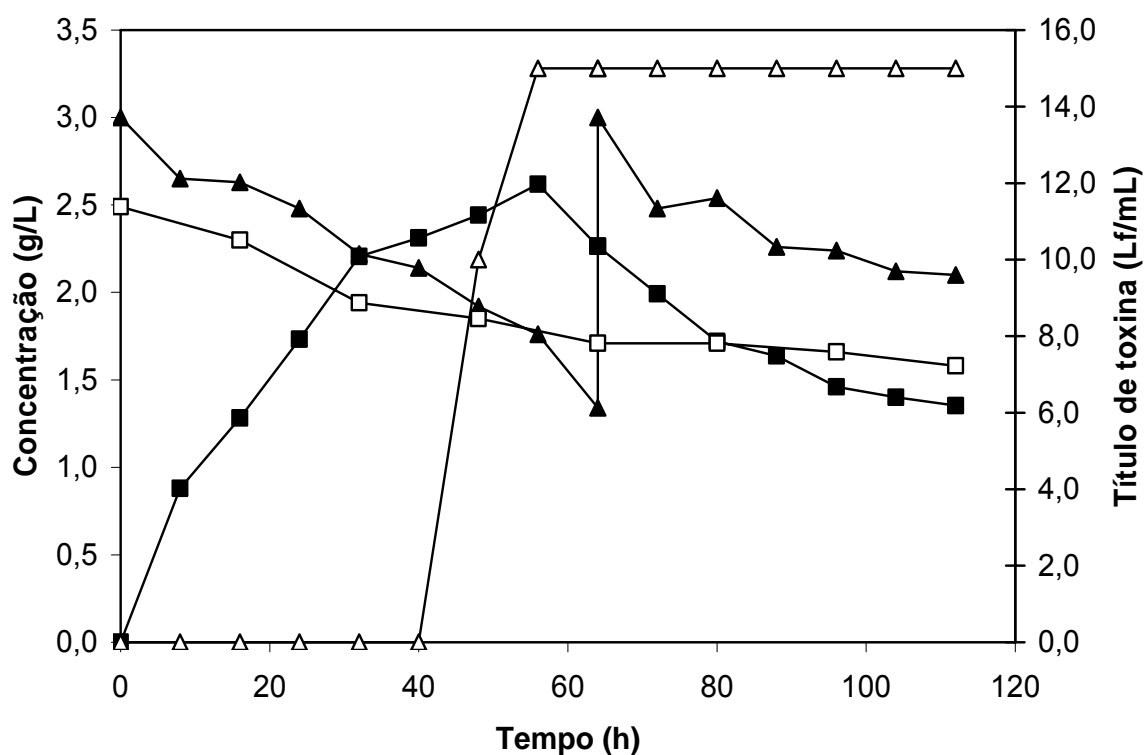


Figura 36: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA5A ( $NZ_o = 25,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

Tabela 38: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA5B\* ( $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	3,00	2,60
8	7,4	0	0,80	2,50	
16	7,2	0	1,59	2,50	2,46
24	7,1	0	2,29	2,44	
32	7,0	0	2,36	2,22	2,00
40	6,9	0	2,45	2,18	
48	6,9	10	2,48	2,14	1,85
56	6,8	15	2,13	1,88	
64	6,8	15	1,84	1,42	1,58
64	6,8	15	1,84	3,00	1,58
72	7,2	15	1,61	2,72	
80	7,5	15	1,51	2,52	1,52
88	7,5	15	1,48	2,46	
96	7,5	15	1,45	2,14	0,97
104	7,5	15	1,38	2,16	
112	7,7	15	1,34	2,16	0,83

\* A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

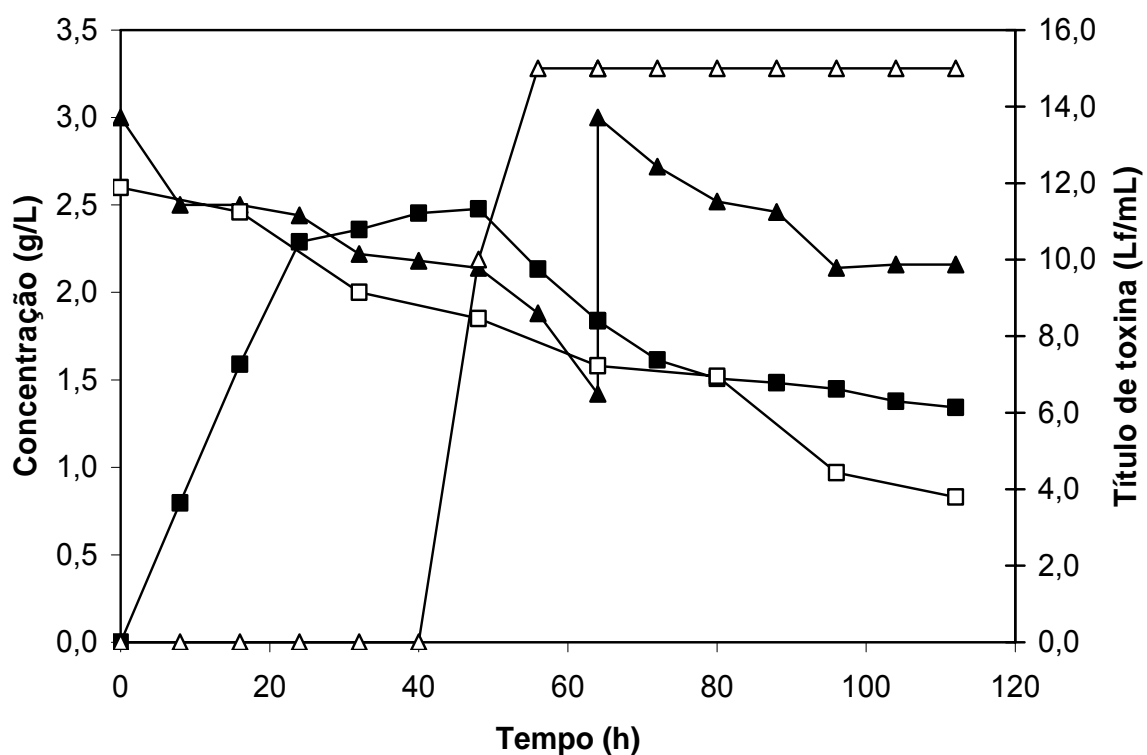


Figura 37: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA5B ( $NZ_o = 25,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

Tabela 39: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA6A\* ( $NZ_0 = 37,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	3,00	5,02
8	7,4	0	0,94	2,55	
16	7,4	0	1,40	2,50	5,18
24	7,2	0	1,55	2,28	
32	7,1	0	1,83	2,04	4,85
40	7,0	0	2,31	1,94	
48	7,0	5	2,24	1,84	4,43
56	7,0	5	1,81	1,80	
64	7,1	15	1,59	1,30	3,24
64	7,1	15	1,59	3,00	3,24
72	7,3	15	1,55	2,82	
80	7,5	15	1,52	2,62	3,24
88	7,5	15	1,52	2,46	
96	7,5	20	1,39	2,40	3,02
104	7,5	20	1,37	2,30	
112	7,7	20	1,37	2,24	2,77

\* A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

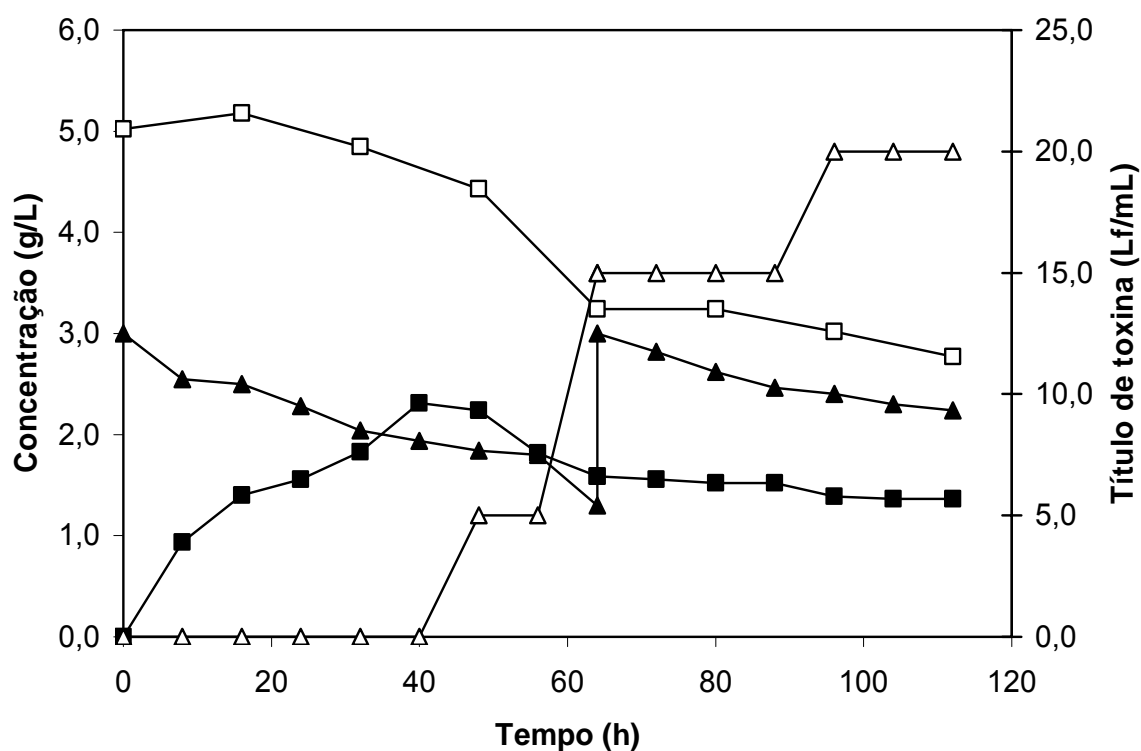


Figura 38: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA6A ( $NZ_o = 37,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

Tabela 40: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA6B\* ( $NZ_o = 37,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	3,00	4,96
8	7,3	0	0,95	2,50	
16	7,3	0	1,25	2,48	5,04
24	7,2	0	1,74	2,42	
32	6,9	0	1,87	2,08	4,86
40	6,9	0	2,25	2,06	
48	7,0	15	2,11	1,88	4,76
56	7,0	25	1,99	1,82	
64	7,1	25	1,81	1,38	4,60
64	7,1	25	1,81	3,00	4,60
72	7,3	25	1,70	2,76	
80	7,5	25	1,48	2,54	3,18
88	7,5	25	1,47	2,50	
96	7,5	25	1,45	2,36	3,02
104	7,5	25	1,32	2,24	
112	7,7	25	1,35	2,16	2,89

\* A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

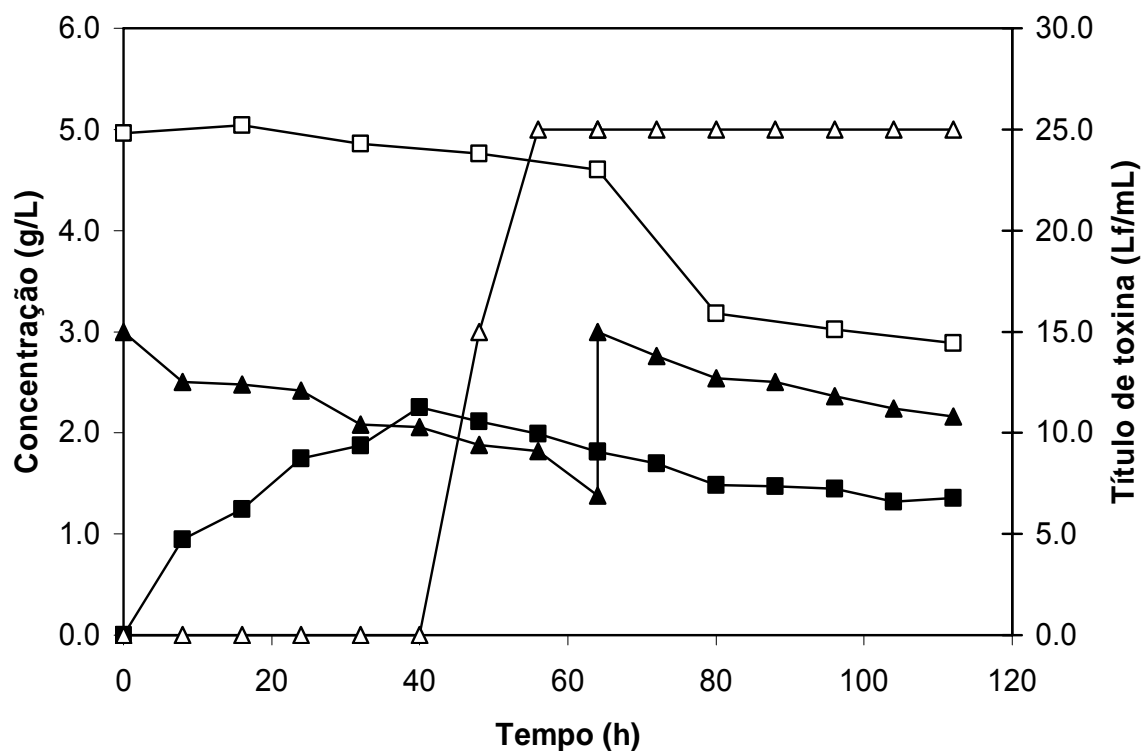


Figura 39: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA6B ( $NZ_o = 37,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

Tabela 41: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA7A\* ( $NZ_0 = 50,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	3,00	6,43
8	7,4	0	1,39	2,65	
16	7,3	0	1,81	2,52	6,26
24	7,3	0	1,86	2,16	
32	7,1	0	2,18	2,00	5,93
40	6,8	0	2,12	1,94	
48	6,9	15	2,07	1,80	5,73
56	7,1	35	1,91	1,74	
64	7,1	35	1,76	1,38	5,04
64	7,1	35	1,76	3,00	5,04
72	7,3	35	1,55	2,84	
80	7,7	45	1,63	2,72	4,46
88	7,7	45	1,57	2,46	
96	7,7	50	1,65	2,50	4,63
104	7,7	50	1,55	2,40	
112	7,7	50	1,38	2,30	4,25

\* A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).



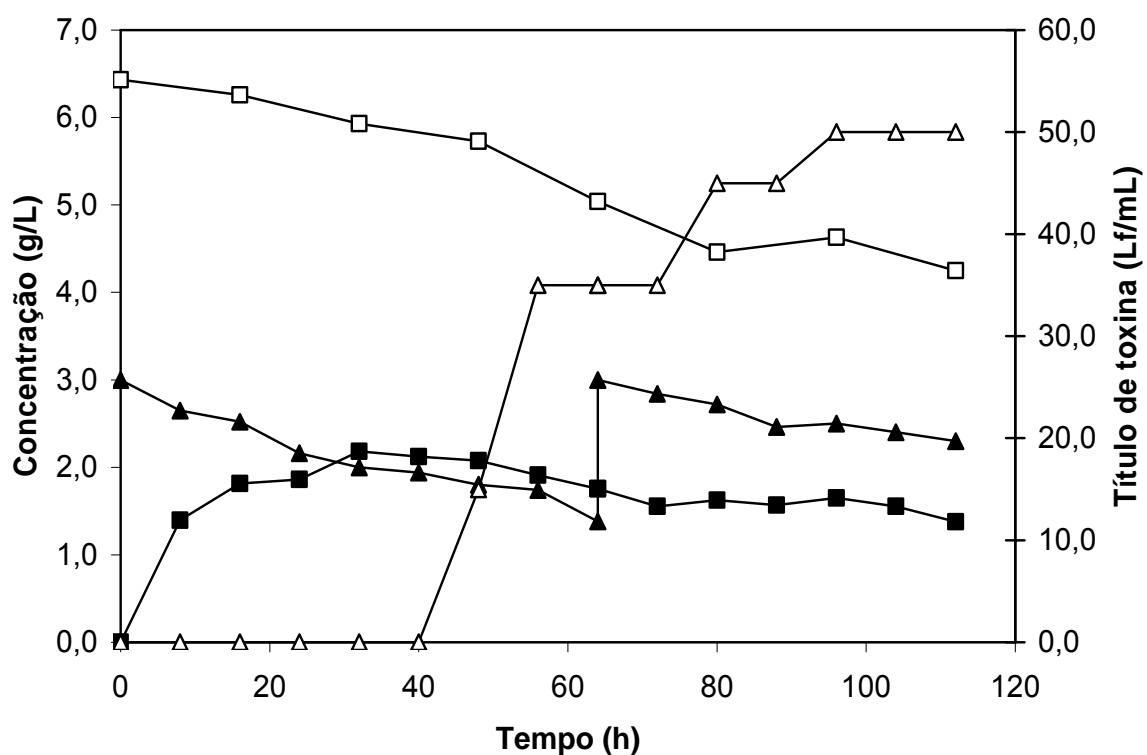


Figura 40: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA7A ( $NZ_o = 50,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

Tabela 42: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA7B\* ( $NZ_0 = 50,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	3,00	6,57
8	7,4	0	1,54	2,60	
16	7,4	0	2,16	2,58	6,18
24	7,2	0	2,26	2,36	
32	7,1	0	2,44	2,12	5,90
40	7,0	0	2,24	2,10	
48	7,1	15	2,13	1,84	5,68
56	7,1	35	1,94	1,64	
64	7,1	35	1,96	1,36	4,74
64	7,1	35	1,96	3,00	4,74
72	7,3	35	1,83	2,86	
80	7,6	45	1,74	2,66	4,46
88	7,6	45	1,71	2,46	
96	7,6	45	1,72	2,40	4,26
104	7,6	45	1,74	2,40	
112	7,7	45	1,72	2,22	4,13

\* A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

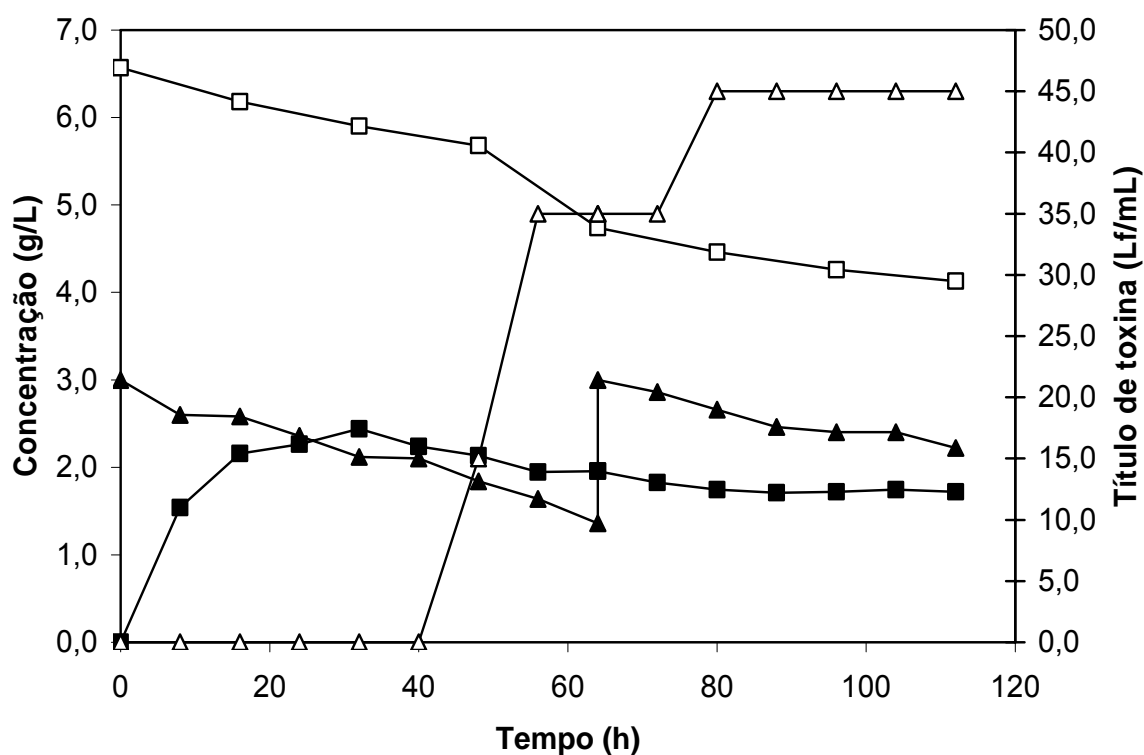


Figura 41: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA7B ( $NZ_o = 50,0$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 64$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

Tabela 43: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA8A\* ( $NZ_o = 62,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	3,00	8,12
8	7,2	0	1,83	2,65	
16	7,4	0	2,43	2,26	8,09
24	7,2	0	2,60	2,06	
32	7,2	0	2,41	1,94	8,12
40	7,0	0	2,26	1,88	
48	7,2	25	1,99	1,76	7,23
56	7,2	45	1,91	1,78	
64	7,4	45	1,92	1,68	6,54
72	7,7	45	1,87	1,60	
80	7,7	45	1,91	1,30	6,43
80	7,7	45	1,91	3,00	6,43
88	7,7	45	1,78	2,42	
96	7,7	45	1,52	2,56	5,18
104	7,7	45	1,31	2,42	
112	7,8	45	1,28	2,36	3,54

\* A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 80$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

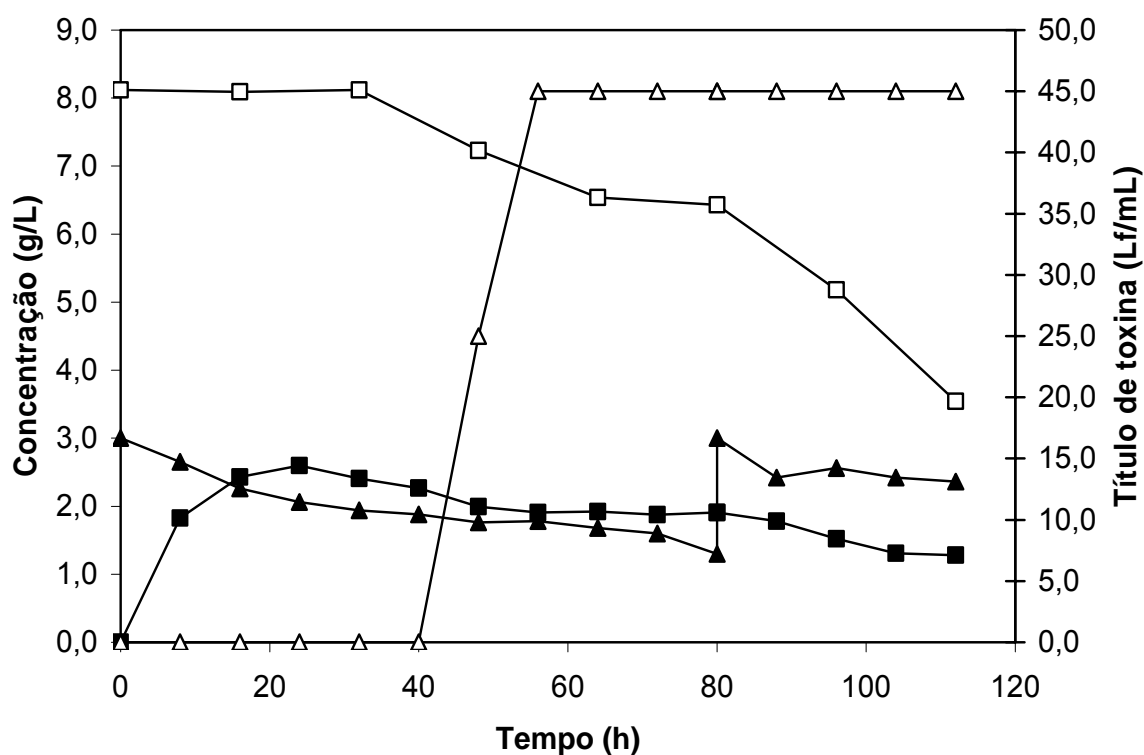


Figura 42: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA8A ( $NZ_o = 62,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 80$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

Tabela 44: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento PDA8B\* ( $NZ_0 = 62,5$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	3,00	7,79
8	7,5	0	1,68	2,45	
16	7,4	0	2,29	2,16	6,76
24	6,8	0	2,25	2,08	
32	7,1	0	1,99	1,88	6,62
40	7,1	0	1,91	1,86	
48	7,2	20	1,77	1,80	6,48
56	7,3	35	1,85	1,78	
64	7,4	35	1,78	1,48	6,57
72	7,7	35	1,79	1,44	
80	7,7	35	1,73	1,38	6,34
80	7,7	35	1,73	3,00	6,34
88	7,7	40	1,61	2,76	
96	7,7	45	1,53	2,44	4,65
104	7,7	45	1,35	2,42	
112	7,8	45	1,39	2,20	3,84

\* A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 80$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

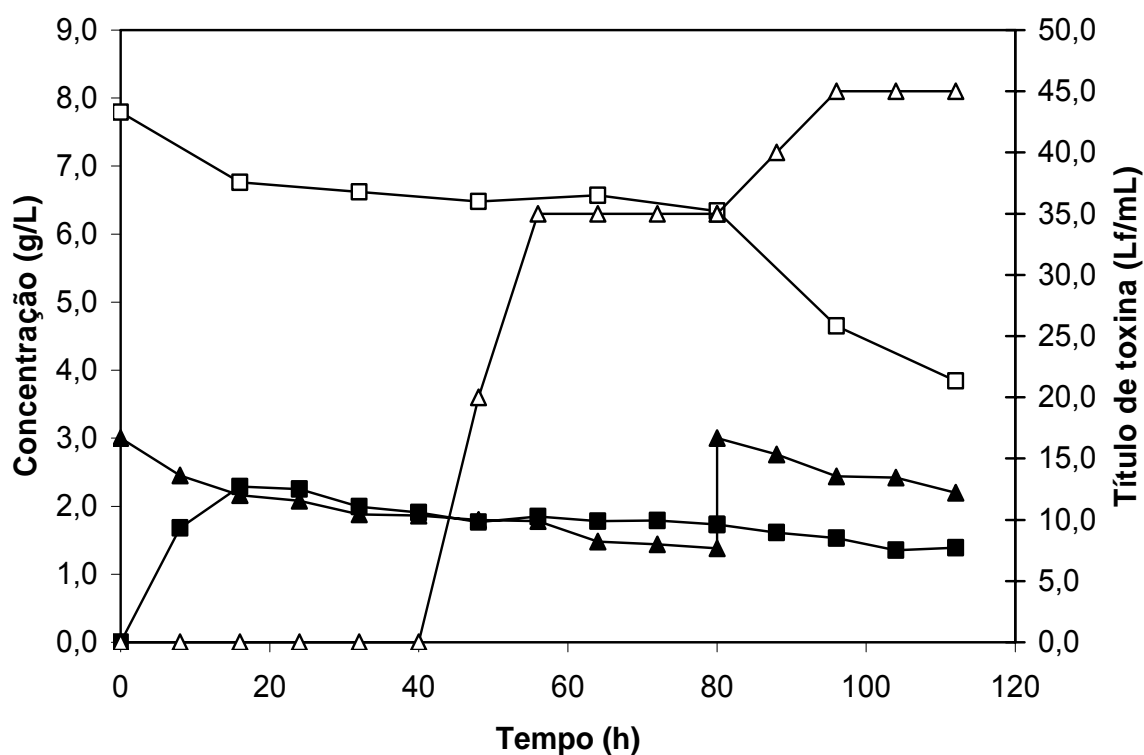


Figura 43: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento PDA8B ( $NZ_o = 62,5$  g/L). A concentração de glicose foi corrigida a 3,0 g/L no instante inicial. No instante  $t = 80$  horas foi realizada uma alimentação por pulso de forma a restabelecer o valor inicial (3,0 g/L).

Tabela 45: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento Padrão I (cultivo descontínuo;  $G_0 = 8,0$  g/L e  $NZ_0 = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	5,10	3,65
8	7,1	0	0,79	5,05	
16	7,3	0	1,11	4,86	3,79
24	7,5	0	1,53	4,58	
32	7,5	0	1,74	4,30	2,88
40	7,7	0	1,98	4,20	
48	7,6	5	1,83	4,12	2,91
56	7,6	5	1,70	4,16	
64	7,6	10	1,60	3,66	2,74
72	7,6	10	1,28	3,58	
80	7,6	15	1,22	4,06	2,66
88	7,6	15	1,25	3,80	
96	7,4	15	1,12	3,76	2,27
104	7,4	15	1,18	3,64	
112	7,4	15	1,14	3,54	1,82



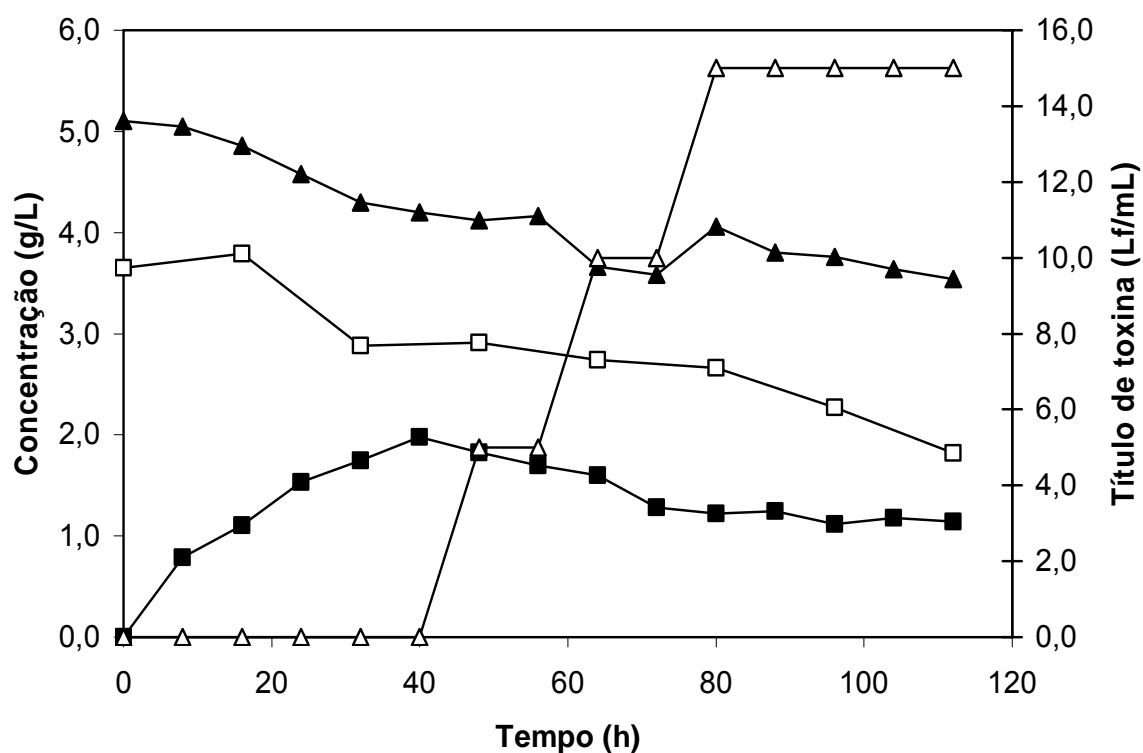


Figura 44: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento Padrão I (cultivo descontínuo;  $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

Tabela 46: Valor de pH, título de toxina e concentrações de células (X), glicose (G) e nitrogênio (N) referentes ao experimento Padrão II (cultivo descontínuo;  $G_0 = 8,0$  g/L e  $NZ_0 = 25,0$  g/L).

Tempo (h)	pH	Título de toxina (Lf/ mL)	X (g/L)	G (g/L)	N (g/L)
0	7,2	0	0,00	5,10	3,74
8	7,1	0	0,86	5,05	
16	7,4	0	1,18	4,86	3,65
24	7,5	0	1,58	4,68	
32	7,5	0	1,83	4,56	3,10
40	7,7	0	2,02	4,32	
48	7,6	10	2,02	4,20	2,99
56	7,6	10	1,94	4,18	
64	7,6	15	1,48	3,78	3,07
72	7,6	15	1,32	3,72	
80	7,6	15	1,15	3,72	2,68
88	7,4	15	1,15	3,60	
96	7,4	15	1,24	3,54	2,49
104	7,4	15	1,15	3,48	
112	7,4	15	1,12	3,20	1,96

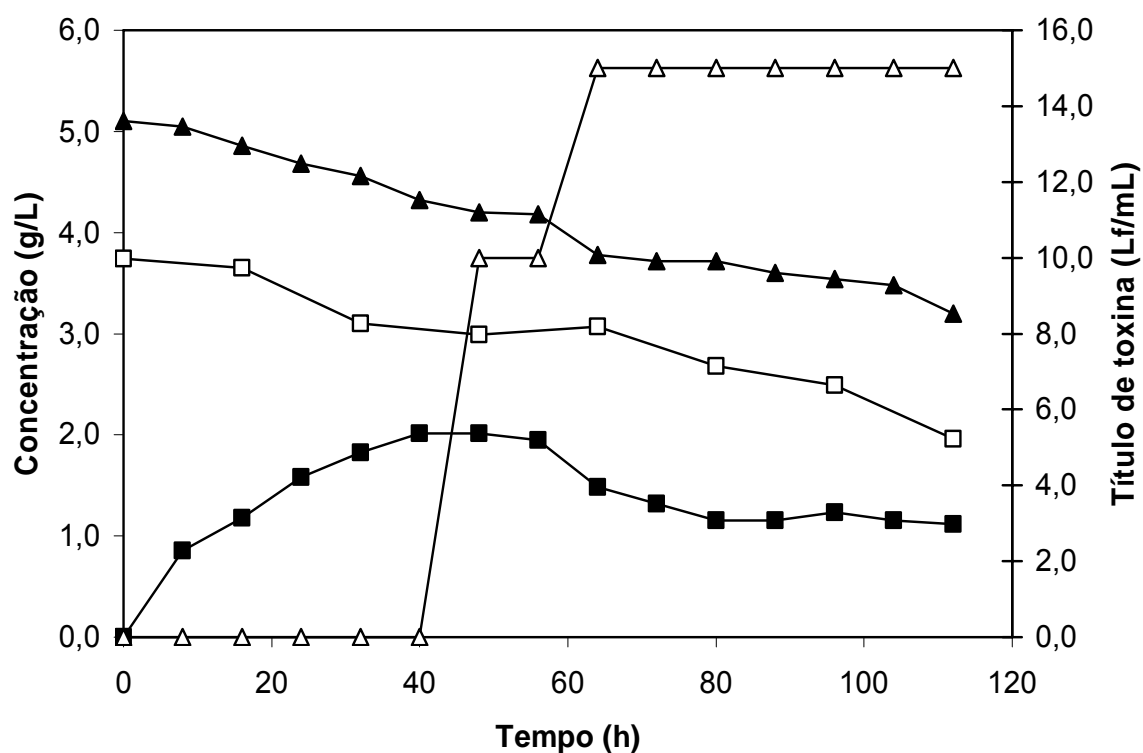


Figura 45: Título de toxina ( $\triangle$ ) e concentrações de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangle$ ) e nitrogênio ( $\square$ ) referentes ao experimento Padrão II (cultivo descontínuo;  $G_o = 8,0$  g/L e  $NZ_o = 25,0$  g/L).

O processo descontínuo alimentado de cultivo microbiano é um processo que merece destaque na produção industrial, pois permite o controle da concentração de nutrientes durante o cultivo. Considerando que as células suspensas num meio de cultivo, além de dependerem de fatores físicos e químicos, têm seu metabolismo diretamente relacionado com o fornecimento de nutrientes, fica clara a utilidade do processo descontínuo alimentado quando se pretende produzir células e/ou substâncias desejadas em grandes quantidades. Assim, neste trabalho, a utilidade deste processo está muito ligada principalmente à minimização dos efeitos do controle do metabolismo celular, através da manutenção de concentrações adequadas da fonte de carbono no meio de cultivo.

Num primeiro grupo de experimentos (experimentos PDA1A a PDA4B), as concentrações de glicose foram corrigidas para 3,0 g/L em tempos pré-determinados (16, 56 e 88 horas). O nível máximo de concentração de glicose estipulado em 3,0 g/L foi decorrente dos resultados obtidos na primeira fase deste trabalho, com processo descontínuo, em que, nas condições otimizadas ocorreu uma produção elevada de toxina tetânica a partir do instante em que a concentração de glicose no meio de cultivo foi dessa ordem de grandeza. Assim, foram mantidas as concentrações de glicose no meio de cultivo numa faixa suficiente para suprir a demanda de energia do *C. tetani* e favorecer a produção de toxina tetânica.

Pode-se notar nos experimentos feitos com correção da concentração de glicose em tempos pré-determinados que a concentração inicial de glicose foi sempre menor que a concentração estabelecida inicialmente (3 g/L), o que se deve, como comentado anteriormente, à reação da glicose com proteínas e aminoácidos durante o processo de autoclavação do meio de cultura. Adicionalmente, quanto maior a concentração inicial de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> ( $NZ_0$ ), menor a concentração de glicose após a autoclavação.

O maior valor de  $NZ_0$ , além de levar a uma menor concentração inicial de glicose, também antecipou o crescimento celular pela maior disponibilidade de nitrogênio para o microrganismo. De fato, a observação das curvas de crescimento dos experimentos PDA1A a PDA4B (Figuras 28 e 35), permite visualizar que há uma tendência de antecipação do tempo para obtenção da concentração celular máxima com o aumento de  $NZ_0$ . Como consequência, quando da primeira correção da

concentração de glicose ( $t = 16h$ ), os valores residuais da concentração deste nutriente eram mais baixos nos ensaios conduzidos com maior concentração inicial de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> (experimentos PDA4A e PDA4B- Tabelas 35 e 36). O aumento de  $NZ_0$  também levou a uma tendência de aumento da concentração celular máxima obtida (Tabela 47). Por outro lado, o aumento da concentração inicial de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> deve ter estimulado o microrganismo a utilizar este nutriente como fonte de carbono. De fato, o aumento da concentração de  $NZ_0$  de 25,0 para 62,5 g/L levou a um aumento do consumo de nitrogênio de aproximadamente 1,5 g/L para 3,6 g/L (Tabela 47). Observando-se os valores de glicose consumida nessa mesma tabela, não se pode afirmar que houve uma tendência nítida do aumento de consumo deste nutriente nos experimentos com maior  $NZ_0$ . Como consequência deste fato, o pH ao término das fermentações tendeu a aumentar com o aumento de  $NZ_0$  (Tabelas 29 a 36) em decorrência da formação da amônia. No entanto, o pH não aumentou demasiadamente mesmo nos ensaios com maiores valores de  $NZ_0$ , pois a amônia, tendo uma temperatura de ebulição muito baixa, provavelmente estaria sendo continuamente liberada do meio de cultivo juntamente com os demais gases formados no processo de fermentação.

O aumento do pH em cultivos de *C. tetani* com *N-Z Case TT*<sup>®</sup> como fonte de nitrogênio já foi observado na primeira parte deste trabalho, onde se utilizou processo descontínuo. Esse tipo de comportamento já foi relatado também em cultivo aeróbio envolvendo um açúcar e uma fonte de nitrogênio de origem protéica (MARTINS & SOUTO MAIOR, 2003). Em todos os experimentos, mesmo naqueles em que a concentração residual de glicose após o processo de autoclavação do meio foi mais baixa (experimentos com  $NZ_0 = 62,5$  g/L- Tabelas 35 e 36) houve uma diminuição inicial do pH decorrente da produção de ácidos orgânicos, indicando o uso preferencial da glicose como fonte de carbono pelo *C. tetani*, como citado anteriormente. Após esse período, mesmo em presença de glicose no meio de cultivo, pois esta foi suplementada ao longo do tempo, houve um aumento progressivo do pH, que se deve provavelmente ao maior consumo do *N-Z Case TT*<sup>®</sup> como fonte de carbono. Foi somente neste período de aumento de pH que foi verificado o início da produção de toxina tetânica, indicando que sua produção está provavelmente associada ao período em que há consumo do *N-Z Case TT*<sup>®</sup> como

fonte de carbono. Observando-se as curvas de concentração de nitrogênio no meio de cultivo, nota-se, de uma forma geral, uma contínua queda desde os instantes iniciais do cultivo. Numa primeira fase, a maior parte da fonte de nitrogênio estaria sendo canalizada para a formação de células sem uma conseqüente interferência no valor do pH do meio de cultivo e numa segunda fase a maior parte do nitrogênio estaria sendo dirigida para obtenção de energia.

Tabela 47. Resultados de cultivos de *Clostridium tetani* obtidos em diferentes condições de cultivo.

Ensaio	Processo de cultivo	Tipo de alimentação	NZ <sub>0</sub> (g/L)	X <sub>m</sub> <sup>a</sup> (g/L)	T <sub>f</sub> <sup>b</sup> (h)	TT <sub>f</sub> <sup>c</sup> (L <sub>f</sub> /mL)	G <sub>c</sub> <sup>d</sup> (g/L)	N <sub>c</sub> <sup>e</sup> (g/L)
PDA1a	PDA <sup>f</sup>		25,0	2,96	96	35	5,02	1,55
PDA1b	PDA <sup>f</sup>		25,0	3,68	88	35	4,52	1,50
PDA2a	PDA <sup>f</sup>		37,5	3,53	112	50	3,64	1,86
PDA2b	PDA <sup>f</sup>	A <sup>h</sup>	37,5	3,18	64	35	2,66	1,62
PDA3a	PDA <sup>f</sup>		50,0	4,15	112	60	3,69	2,44
PDA3b	PDA <sup>f</sup>		50,0	2,73	112	60	2,22	3,06
PDA4a	PDA <sup>f</sup>		62,5	4,94	88	60	5,00	3,67
PDA4b	PDA <sup>f</sup>		62,5	4,34	112	70	2,96	3,62
PDA5a	PDA <sup>f</sup>		25,0	2,62	56	15	2,56	0,91
PDA5b	PDA <sup>f</sup>		25,0	2,45	56	15	2,42	1,77
PDA6a	PDA <sup>f</sup>		37,5	2,31	96	20	2,46	2,25
PDA6b	PDA <sup>f</sup>	B <sup>i</sup>	37,5	2,25	56	25	2,46	3,14
PDA7a	PDA <sup>f</sup>		50,0	2,12	96	50	2,32	2,18
PDA7b	PDA <sup>f</sup>		50,0	2,44	80	45	2,42	2,44
PDA8a	PDA <sup>f</sup>		62,5	2,60	56	45	2,34	4,58
PDA8b	PDA <sup>f</sup>		62,5	2,29	96	45	2,42	3,95
PI	PD <sup>g</sup>	-	25,0	1,98	80	15	1,56	1,83
PII	PD <sup>g</sup>	-	25,0	2,02	64	15	1,90	1,78

<sup>a</sup> X<sub>m</sub> = concentração celular máxima. <sup>b</sup> T<sub>f</sub> = tempo de fermentação. <sup>c</sup> TT<sub>f</sub> = título final de toxina. <sup>d</sup> G<sub>c</sub> = concentração de glicose consumida. <sup>e</sup> N<sub>c</sub> = concentração de nitrogênio consumida. <sup>f</sup> PDA = processo descontínuo alimentado. <sup>g</sup> PD = processo descontínuo. <sup>h</sup> A = experimentos realizados com a correção pré-determinada da concentração de glicose para 3,0 g/L nos instantes 16, 56 e 88 h. <sup>i</sup> B = experimentos com correção inicial da concentração de glicose para 3,0 g/L e após esta cair para 1-1,5 g/L.

O processo descontínuo alimentado permitiu que o processo ocorresse com concentrações de glicose relativamente baixas, abaixo daquelas relatadas como repressoras (5 g/L) para cultivo de *Clostridium difficile* para produção de toxinas (OSGOOD *et al.*, 1993).

O aumento da concentração inicial de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> adiantou a produção de toxina tetânica, o que pode ser decorrente da antecipação da obtenção da concentração celular máxima. No instante em que se deu o início da produção de toxina, as concentrações de glicose variaram entre 0,80 g/L (experimento PDA4A) e 2,45 g/L (experimento PDA2B). Tendo em vista essa variabilidade no valor da concentração de glicose nos experimentos realizados quando do início da produção de toxina tetânica, nesses níveis encontrados, aparentemente não se verificou efeito de repressão por glicose. Levando-se em conta que mesmo após a adição de glicose, seja no instante  $t = 56$  horas ou  $t = 88$  horas, ainda continuou havendo produção de toxina tetânica na maior parte dos experimentos, pode-se entender que até 3 g/L a glicose não foi repressora.

Nos cultivos em que a concentração inicial de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> foi de 25,0 g/L (experimentos PDA1A e PDA1B), a adoção da correção de glicose em tempos pré-determinados, devido provavelmente à manutenção de níveis mais adequados de concentração de glicose no meio de cultivo, levaram a resultados 133% maiores que aqueles obtidos nos experimentos realizados em condições preconizadas por Lathan *et al.* (1962) (experimentos PI e PII- Tabelas 45 e 46), atualmente utilizadas em escala de produção no Instituto Butantan. A associação da adição de glicose em tempos pré-determinados com o aumento de  $NZ_0$  levou a valores de título de toxina da ordem de 60 Lf/mL (experimentos PDA3A a PDA4B), correspondendo a um aumento de 300% em relação aos cultivos padrão (experimentos PI e PII- Tabelas 45 e 46). O efeito positivo do aumento de  $NZ_0$  já havia sido constatado na primeira etapa deste trabalho, que estudou o processo descontínuo de produção de toxina tetânica (item V.1). Nesse processo, em condições otimizadas ( $G_0 = 9,7$  g/L e  $NZ_0 = 43,5$  g/L) o título final de toxina foi da ordem de 79% maior que aquele obtido quando da utilização das condições preconizadas por Latham *et al.* (1962). Esse aumento, embora seja satisfatório, está bastante abaixo do obtido utilizando o

processo descontínuo alimentado (aumento de 300%). Assim, pode-se inferir que o processo descontínuo alimentado tenha conseguido potencializar o efeito do aumento da concentração inicial de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> por, provavelmente, ter permitido que o cultivo se desenvolvesse sem o efeito de repressão por glicose.

Ainda procurando avaliar uma nova forma de condução do processo, novos experimentos foram planejados (PDA5A a PDA8B), procurando, neste segundo grupo de ensaios, corrigir a concentração de glicose para 3,0 g/L no instante inicial e após seu valor cair para 1- 1,5 g/L, valores observados quando do início da produção de toxina tetânica nos experimentos em que foram obtidos os maiores títulos de toxina no primeiro grupo de estudo do processo descontínuo alimentado (PDA3A a PDA4B).

Também neste grupo de experimentos (PDA5A a PDA8B), o processo de autoclavação levou a uma queda da concentração de glicose no meio de cultivo, sendo a concentração deste nutriente devidamente corrigida imediatamente antes da inoculação.

De uma maneira geral, o efeito da concentração inicial de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> ( $NZ_0$ ) neste grupo de experimentos foi similar àquele encontrado nos experimentos com correção da concentração de glicose em tempos pré-determinados. O aumento de  $NZ_0$  proporcionou uma antecipação da obtenção da concentração celular máxima (Figuras 36 a 43) e levou a um aumento do consumo de nitrogênio, sem interferir no consumo de glicose (Tabela 47). O perfil dos valores de pH em função do tempo também foi semelhante aos obtidos nos experimentos anteriores referentes não somente ao processo descontínuo como descontínuo alimentado utilizando correções pré-determinadas da concentração de glicose. Da mesma forma, o aumento do valor de  $NZ_0$  levou ao aumento do título de toxina tetânica, com os maiores valores (da ordem de 45 Lf/mL) sendo obtidos com  $NZ_0 \geq 50$  g/L (Tabela 47). No entanto, nestes experimentos, onde se adotou a correção inicial da concentração de glicose para 3,0 g/L e posteriormente quando esta atingisse 1-1,5 g/L, foram obtidos títulos de toxina tetânica final menores que aqueles em que se adotou a correção em tempos pré-determinados (Figura 46). Possivelmente, os perfis de concentração de glicose naqueles experimentos devem ter levado a condições onde a minimização do efeito de repressão pode ter sido mais eficiente.



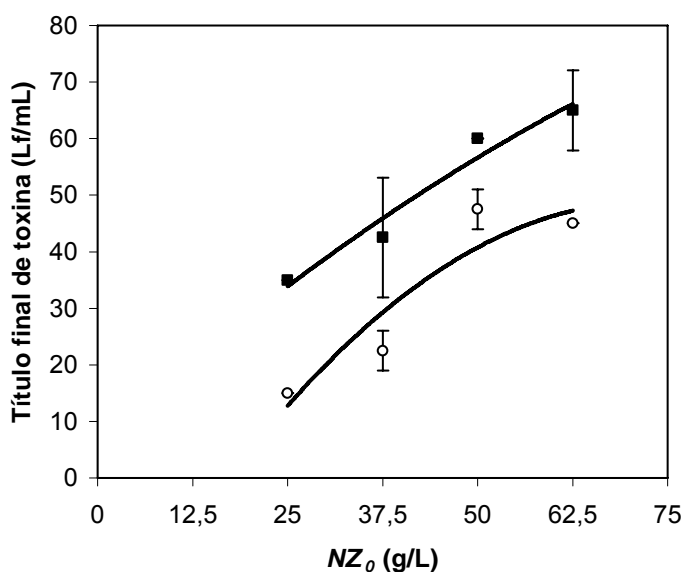


Figura 46: Título de toxina tetânica médio final em função da concentração inicial de *N-Z Case TT<sup>®</sup>* ( $NZ_0$ ): (■) experimentos realizados com a correção pré-determinada da concentração de glicose para 3,0 g/L nos instantes 16, 56 e 88 h; (○) experimentos com correção inicial da concentração de glicose para 3,0 g/L e após esta cair para 1-1,5 g/L.

Avaliando os resultados de título final de toxina tetânica obtidos nos processos descontínuos alimentados (Tabela 47) por análise de variância multivariável, foi possível avaliar simultaneamente a conduta adotada para a correção da concentração de glicose nos experimentos descontínuos alimentados, bem como o efeito da concentração inicial de *N-Z Case TT<sup>®</sup>* ( $NZ_0$ ). A conduta de correção da concentração de glicose, como já esperado pela observação da Figura 46, levou a resultados estatisticamente diferentes, pois o nível descritivo ( $p$ ) desta análise foi inferior a 0,0001, comprovando que, nas condições estudadas neste trabalho, a melhor conduta para a correção da concentração de glicose foi aquela em que esta foi corrigida para 3,0 g/L nos instantes 16, 56 e 88 horas. Da mesma forma, o valor de  $NZ_0$  foi determinante para a obtenção de maiores títulos de toxina tetânica ( $p < 0,0001$ ). Como se observa na Tabela 48, que apresenta os valores médios obtidos para cada valor de  $NZ_0$ , independentemente da conduta de correção da concentração de glicose, a comparação múltipla desses resultados mostra que a

menor concentração inicial de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> que propiciou o melhor resultado de título de toxina tetânica foi 50 g/L.

Tabela 48: Título final médio de toxina tetânica ( $TT_{fm}$ ) em função da concentração inicial de *N-Z Case TT*<sup>®</sup> ( $NZ_0$ ) obtidos nos experimentos com processo descontínuo alimentado.

$NZ_0$ (g/L)	$TT_{fm}$ (Lf/mL) *
25,0	$25,0 \pm 15,5^a$
37,5	$32,5 \pm 13,2^a$
50,0	$53,8 \pm 7,5^b$
62,5	$55,0 \pm 12,2^b$

\* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo método de Tukey, a 5% de probabilidade.

## VI. CONCLUSÕES

Nas condições estudadas para o cultivo de *C. tetani* foi possível concluir:

No processo descontínuo:

- Concentrações iniciais de *NZ Case TT<sup>®</sup>* ( $NZ_0$ ) menores ou iguais a 12,5 g/L, independentemente da concentração inicial de glicose no meio de cultivo ( $G_0$ ), levaram a resultados insatisfatórios de título de toxina tetânica, chegando no máximo a 15 Lf/mL;
- Valores iniciais de concentração de glicose ( $G_0$ ) menores ou iguais a 4,0 g/L limitaram a produção de toxina tetânica, chegando a títulos máximos de 40 Lf/mL;
- A regressão quadrática da variável título final de toxina tetânica ( $TT_f$ ) em função dos valores codificados das concentrações iniciais de glicose ( $X_1$ ) e de *NZ Case TT<sup>®</sup>* ( $X_2$ ) levou a um modelo matemático que representou satisfatoriamente os resultados experimentais obtidos. Nas condições ótimas estimadas pelo modelo ( $G_0 = 9,7$  g/l e  $NZ_0 = 43,5$  g/L), obteve-se um valor de  $TT_f$  79 % maior que o valor obtido em condição padrão.

No processo descontínuo alimentado:

- O aumento da concentração inicial de *NZ Case TT<sup>®</sup>* ( $NZ_0$ ) proporcionou uma antecipação da obtenção da concentração celular máxima;
- O aumento de  $NZ_0$  levou a um aumento do consumo de nitrogênio;
- O aumento do valor de  $NZ_0$  levou ao aumento do título final de toxina tetânica, com os maiores valores sendo obtidos com  $NZ_0 \geq 50$  g/L;
- Experimentos realizados com a correção pré-determinada da concentração de glicose para 3,0 g/L nos instantes 16, 56 e 88 h levaram a maiores valores de título final de toxina tetânica (valores máximos da ordem de 60 Lf/mL) que aqueles experimentos com correção inicial da concentração de glicose para 3,0 g/L e após esta cair para 1-1,5 g/L (valores máximos da ordem de 45 Lf/mL);

- Experimentos realizados com a correção pré-determinada da concentração de glicose para 3,0 g/L nos instantes 16, 56 e 88 h levaram a valores de título final de toxina tetânica 300% maiores que os valores obtidos em condição padrão.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARHAM, D.; TRINDER, P. An improved color reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. **Analyst**, v. 97, p. 142, 1972.
- BIRK, R.; IKAN, A.; BRAVDO, B.; BRAUN, S.; SHOSEYOV, O. Synthesis of isopropyl-1-thio(-D-Glucopyranoside (IPTGLc), an inducer of *Aspergillus niger* B1 glucosidase production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 66, p. 25-30, 1997.
- BLECK, T.P.; BRAUNER, J.S. Tetanus. In: SCELDO, W.M.; WHITELEY, R.J.; DURACK, D.T; eds. **Infections of the central nervous system**, p. 629-53. 1997.
- BOX, G.E.P.; HOLOHAN, R.; SCOTT, E. Statistic for experiments, **John Wiley & Sons New York**, p. 653, 1978.
- CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., editores, **Biotecnologia industrial**, v. 2, p. 193-204, 2001a.
- CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., editores, **Biotecnologia industrial**, v. 2, p. 205-218, 2001b.
- CARVALHO, J.C.M.; FRANCISCO, F.R.; ALMEIDA, K.A.; SATO, S. Cultivation of *Arthrospira (spirulina) Platensis* (Cyanophyceae) By Fed-Batch addition of Ammomium Chloride at Exponentially Increasing Feeding Rates. **J. Phycol.**, v. 40, p. 589-597, 2004.
- CRUZ, A.J.G.; SILVA, A.S.; ARAUJO, M.L.G.C.; GIORDANO, R.C.; HOKKA, C.O. Modelling and optimization of the cephalosporin C production bioprocess in a fed-batch bioreactor with invert sugar as substrate. **Chemical Engineering Science**, v. 54, p. 3137-3142, 1999.

---

\* As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

DE LUCA, M.M.; ABEIRO, H.D.; BERNAGOZZI, J.A.; BASUALDO, J.A. Nitrogen-Gas Bubbling during the Cultivation of *Clostridium tetani* Produces a Higher Yield of Tetanus Toxin for the Preparation of its Toxoid. **Microbiol. Immunol.**, v. 41, p. 161-163, 1997.

DING, S.; TAN, T. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1451-1454, 2006.

FAULKNER, E.; BARRETT, M.; OKOR, S.; KIERAN, P.; CASEY, E.; PARADISI, F.; ENGEL, P.; GLENNON, B. Use of Fed-Batch Cultivation for Achieving High Cell Densities for the Pilot-Scale Production of a Recombinant Protein (Phenylalanine Dehydrogenase) in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Prog.**, v. 22, p. 889-897, 2006.

FISEK, N.H.; MÜELLER, J.H.; MILLER, P.A. Muscles Extractives in the Production of Tetanus Toxin. **J. Bacteriol.**, v.67, p. 329-334, 1954.

FRATELLI, F.; PRADO, S.M.A.; VANCETTO, M.D.C.; OLIVEIRA, J.M.; HIGASHI, H.G. Toxina Tetânica: Produção e Purificação em Escala Industrial. **Arquivo Biol. Tecnológico**, v. 36, p. 709-719, 1993.

FRATELLI, F.; SIQUINI, T.J.; PRADO, S.M.A.; HIGASHI, H.G.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Effect of Medium Composition on the Production of Tetanus Toxin by *Clostridium tetani*. **Biotechnol. Prog.**, v.21, p.756-761, 2005.

GANCEDO, J.M. Carbon catabolite repression in yeast. **European Journal Biochemical**, v. 206, p. 297-313, 1992.

GERMANIER, R. Bacterial Vaccines, **Academic Press.**, p. 38-64, 1984.

GIRIDHAR, R.; SRIVASTAVA, A.K. Fed-batch cultivation of *Acetobacter suboxydans* for the microbial oxidation of D-sorbitol to L-sorbose. **Bioprocess Engineering**, v.23 p.575-577, 2000.

GOTO, E.C.; BARBOSA, P.E.; KISTNER, C.L.L.; MOREIRA, G.F.; LENARTOVICZ, V.; PERALTA, M.R. Production of amylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing -methyl-D-glycoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate. **FEMS Microbiology Letters**, v.167, p. 139-141, 1998.

GREASHAM, R.L. Media for microbial fermentations. In: REED REHM J. RG. **Biotechnology second, completely Revised edition VCH Bioprocessing**, v. 3, p. 128-156, 1993.

HAYASHI, S.; HINOTANI, T.; HAYASHI, T.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Development of medium components for the production of glucosyl-transferring enzyme by *Aureteobasidium*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 248-250, 1993.

HWANG, B.H.; KIM, J.W.; PARK, C.Y.; PARCK, C.S.; KIM, Y.S.; RYU, Y.W. High-level production of arachidonic acid by fed-batch culture of *Mortierella alpine* using  $\text{NH}_4\text{OH}$  as a nitrogen source and pH control. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 731-735, 2005.

IMAI, Y.; SUZUKI, M.; MASAMOTO, M.; NAKAYASU, K.; KISHIMOTO, M. Glucoamylase production of *Aspergillus oryzae* in fed-batch culture using a statistical regression model. **Journal of fermentation and Bioengineering**, v. 78, p. 310-4, 1994.

KARALLIEDDE, L.; CUMBERLAND, N.; ALEXANDER, C. Unfinished bussiness: adult immunization against tetanus. **World Health Forum**, v. 16, p. 374-376, 1995.

KIM, J.H.; KIM, E.J.; PARK, T.H. Fed-batch culture of insect cells with exponential feeding of amino acid and yeastolate solution. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 367-370, 2000.

KLEIST, S.; MIKSCH, G.; HITZMANN, B.; ARNDT, M.; FRIEHS, K.; FLASCHEL, E. Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with *Escherichia coli* by using different fed-batch fermentation strategies. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 61, p. 456-462, 2003.

KUNDU, A.K.; DAS, S., Production of amylase in liquid culture by a strain of *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology**, v. 19, p. 598-603, 1970.

LATHAM, W.C., BENT, D.F.; LEVINE, L. Tetanus toxin production in the absence of protein. **Applied Microbiology**, v. 10, p. 146-152, 1962.

LEE, P.C.; LEE, W.G.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 49-55, 1999.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N.J. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marcianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. **J. Ind. Microbiol Biotechnol**, v.32, p. 284-288, 2005.

LUNA, L.D.S.; CONVERTI, A.; TONINI, G.C.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Continuous and pulse feedings of urea as a nitrogen source in fed-batch cultivation of *Spirulina platensis*. **Aquacultural Engineering**, v.31, p. 237-245, 2004.

MARTINS, C.S.; SOUTO-MAIOR, A.M. Anthracycline Production by *Streptomyces capomus* in Batch Fermentation. **Archives of Biology and Technology**, v. 46 p. 483-488 2003.

MASROOR, K.M.; CHANDRA, S. Role of inorganic nitrogen sources on antibiotic production by *Aspergillus spp.* Antagonistic to citrus canker pathogen. **National Academy Science Letters**, v. 12, p. 43-45, 1989.

MARÉ, L. de.; ANDERSSON, P.; HAGANDER, P. Probing control of glucose feeding in *Vibrio cholerae* cultivations. **Bioprocess Biosyst Eng.**, v. 25, p. 221-228, 2003.

MÜELLER, J.H.; MILLER, P.A. Growth Requirements of *Clostridium tetani*. **J. Bacteriol.**, v. 43, p. 763-772, 1942.

MÜELLER, J.H.; MILLER, P.A. Production of Tetanal Toxin. **J. Immunol.**, v. 50, p. 377-384, 1945.

MÜELLER, J.H.; MILLER, P.A. Variable Factors Influencing the Production of Tetanus Toxin. **J. Bacteriol.**, v. 67, p. 271-277, 1954.

MÜELLER, J.H.; MILLER, P.A.; LERNER, E.M. Factors Influencing the Production of Tetanus Toxin: Gaseous Products of Growth. **J. Bacteriol.**, v. 56, p. 97-98, 1948.

NAIR, S.R.; PANDA, T. Statistical optimization of medium components for improved synthesis of pectinase by *Aspergillus niger*. **Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 169-173, 1997.



NORMAS TÉCNICAS DE FABRICAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DAS VACINAS: TRÍPLICE BACTERIANA, TOXÓIDE TETÂNICO, DUPLA ADULTO, DUPLA INFANTIL, - Portaria nº 175 – Diário Oficial nº 220 – Terça-feira, 12 Nov. 1996.

OSGOOD, D.P.; WOOD, N.P., and SPERRY, J.F. Nutritional aspects of cytotoxin production by *Clostridium difficile*. **Appl Env Microbiol**, v. 59, p. 3985-3988, 1993.

PAN, J.G.; RHEE, J.S.; LEBEAULT, J.M. Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. **Biotechnol Lett.**, v. 9, p. 89-94. 987, 1987.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, L. Glucoamylase production by *Aspergillus niger* on rice bran is improved by adding nitrogen sources. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 10, p. 348-349, 1994.

PARK, Y.C.; KIM, S.G.; PARK, K.; LEE, K. H.; SEO, J.H. Fed-batch production of D-ribose from sugar mixtures by transketolase-deficient *Bacillus subtilis* SPK1. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 66, p. 297-302, 2004.

PIRT, S.J. Principles of microbe and cell cultivation. **Oxford Blackwell scientific publication**, 1975.

POSTEN, C.H.; COONEY, C.L. Growth of microorganisms. In: Rehm H-J & Reed G (Eds.) **Biotechnology**, v. 1, p. 111-162, 1993.

RAMACHANDRAN, N.; SREEKANTIAH, K.R.; MURTHY, V.S. Influence of media composition on the production of amylase and amyloglucosidase by a strain of *Aspergillus niger*. **Staerke**, v. 31, p. 134-138, 1979.

SINKAIR, V.P.; LEWIS, F.N. Increased glucoamylase production using agricultural by products. **Journal of Food Biochemistry**, v. 4, p. 159-168, 1980.

SUN, X.; GOH, P.E.; WONG, K.T.K.; MORI, T.; YAP, M.G.S. Enhancement of transient gene expression by fed-batch culture of HEK 293 EBNA1 cells in suspension. **Biotechnol Lett.**, v. 28, p. 843-848, 2006.

THOMSON, R.O. A Semi-Continuous Method for the Large-Scale Production of Tetanus Toxin. **Nature**, v. 180, p.1126-1127, 1957.

TONG, CH-CH.; BAJENDRA, K. Effect of carbon and nitrogen sources on the growth and production of cellulase Enzymes of a Newly isolated *Aspergillus sp.* **Pertanika**, v. 15, p. 45-50, 1992.

VANCETTO, M.D.C.; OLIVEIRA, J.M.; PRADO, S.M.A.; FRATELLI, F.; HIGASHI, H.G. Tetanus Toxoid Purification: A Case Study. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 807-808, 1997.

VISWANATHAN, P.; KULKARNI, P.R. Full factorial design to study fermentative production of inulinase using inulin from kuth (*Saussurea lappa*) root powder by *Aspergillus niger* van teighem UVII mutant. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 117-121, 1995.

WANG, D.I.C.; COONEY, C.L.; DEMAIN, A.L.; DUNNILL, P.; HUMPHREY, A.E.; LILLY, M.D. Fermentation and Enzyme Technology. **New York, John Wiley & Sons**, p. 1-56, 1979.

WASSILAK, S.G.F.; ROPER, M.H.; MURPHY, T.V.; ORENSTEIN, W.A. Tetanus Toxoid. **Vaccines**, p. 745-781, 2003.

WEN, S.; ZHANG, T.; TAN, T. Maximizing production of glutathione by amino acid modulation and high-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2424-2428, 2006.

WIND, R.D.; BUITELAAR, R.M.; EGGINK, G.; HUIZING, H.J.; DIJKHUIZEN, L. Characterization of new *Bacillus stearothermophilus* isolate: a highly thermostable (-amylase-producing strain). **Applied Microbial Biotechnology**, v. 41, p. 155-162, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Manual for the production and control of vaccines: *tetanus toxoids*. **BLG/UNDP/77.2 Rev. 1**, Geneva, 1977.

YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Feed-batch techniques in microbial processes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 30, p. 148-94, 1984.

YOON, S.K.; KANG, W.K. Fed-batch operation of recombinant *Escherichia coli* contendo trp promoter with controlled specific growth rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p. 995-9, 1994.

YOSHIDA, F.; YAMANE, T.; NAKAMOTO, K.I. Fed-batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, p. 257-70, 1973.

XIE, L.; WANG, D.L.C. Fed-batch cultivation of animal cell using different medium design concepts and feeding strategies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p. 1175-89, 1994.

ZACHARIAS, B.; BJÖRKLUND, M. Continuous production of *Clostridium tetani* toxin. **Appl. Microbiol.**, v.16, p. 69-72, 1968.

ZHANG, M.; SHI, M.; ZHOU, Z.; YANG, S.; YUAN, Z.; YE, Q. Production of *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase in *Bacillus subtilis* WB600 (pMA5) fed with partially hydrolyzed starch. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 555-560, 2006.

ZHEREBTSOV, N.A.; NASONOVA, L.V. Influence of carbon and nitrogen sources on biosynthesis of proteinases with keratin-digesting activity. **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**, v. 25, p. 508-512, 1989.