

MILENA ALVES DE SOUZA

“Investigação sobre associações entre fonte de nitrogênio e produção de compostos bioativos por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos submersos”

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

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

ARARAQUARA
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

S719i Souza, Milena Alves de
Investigação sobre associações entre fonte de nitrogênio e produção de compostos bioativos por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos submersos / Milena Alves de Souza.
– Araraquara : [s.n.], 2017
86 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araújo

1. Biotecnologia. 2. Microbiologia industrial.
3. Fermentação. 4. Compostos bioativos. 5. Antibióticos.
I. Título.

MILENA ALVES DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 17 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Maria Lúcia Gonsales da Costa Araújo (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Profª Drª Kelly Johana Dussán Medina
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Profª Drª. Rosineide Gomes da Silva Cruz
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia / UFSCar / São Carlos - SP

DADOS CURRICULARES

Nome: Milena Alves de Souza

Nome em citações bibliográficas: SOUZA, M. A.

Nacionalidade: Brasileira

Sexo: Feminino

Nascimento: 29/10/1994 – Taquaritinga – SP

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Instituto de Química, Dpto. De Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Francisto Degni nº 55

Quitandinha – Araraquara

14800-900, SP – Brasil

Endereço eletrônico: milena.asouza@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

2014 – atual Mestrado em Biotecnologia

Instituto de Química – UNESP

Título: Investigação sobre associações entre fonte de nitrogênio e produção de compostos bioativos por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos submersos.

Orientadora: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo

Bolsista CAPES: Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2011 – 2013 Graduação em Biocombustíveis.

Instituto Federal de São Paulo, IFSP, Brasil.

Título: Transformação química de extratos de *Jatropha curcas* (Pinhão manso).

Orientador: Gisele Baraldi Messiano

Formação complementar

2014 – 2014 Escola de Adsorção (Carga horária: 6 horas) - 10º Encontro Brasileiro de Adsorção. Guarujá, SP.

2014 – 2014 Curso de Extensão: Aplicação do método Sol-Gel para a síntese de adsorventes com efeito “ footprint molecular”, visando à diminuição de impactos ambientais associados à produção de biodiesel.” (Duração: 28 horas), Instituto Federal de Educação

Ciência e Tecnologia de São Paulo, IFSP- Campus Matão. Matão, SP.

2013 – 2013 Minicurso: Briqueques de bagaço de cana: Uma alternativa tecnológica com maior rendimento energético. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo, IFSP- Campus Matão. Matão, SP.

2013 – 2013 Minicurso: Reaproveitamento de óleo. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo, IFSP- Campus Matão. Matão, SP.

Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista – Instituto de Química – UNESP Araraquara, SP.

2014 – Atual Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Mestranda em Biotecnologia. Regime: Dedicação exclusiva.

2. Instituto Federal de São Paulo - Campus Matão, IFSP - Matão, Brasil.

2014 – 2014 Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Aluna bolsista do Curso de extensão. Regime: Dedicação exclusiva.

2013 – 2014 Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Aluna de iniciação científica. Regime: Dedicação exclusiva.

Áreas de atuação

- 1.** Ciências Biológicas / Microbiologia / Microbiologia Industrial e de Fermentação.
- 2.** Ciências Biológicas / Bioquímica / Bioquímica dos Microrganismos.
- 3.** Ciências Biológicas / Microbiologia / Microalgas.
- 4.** Ciências Exatas e da Terra / Química / Biocombustíveis.

Participação em eventos

- 5° CINTEC** (Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP). Apresentação do Trabalho intitulado: Transformação química de extratos de *Jathropa curcas* e avaliação da atividade inseticida.

VI Congresso Farmacêutico da UNESP e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Apresentação do trabalho intitulado: Investigação do teor de amônio de cultivos submersos de *Streptomyces clavuligerus* utilizando dois diferentes métodos analíticos.

Dedico este trabalho a Deus que sempre guia, abençoa e ilumina o meu caminho, aos meus amigos, que são poucos, mas sem dúvida os melhores, e em especial aos meus pais Adalberto e Emília, meus irmãos Rodolfo e Amanda e meu noivo Flavio Myiaji.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me conceder o dom da vida e me presentear com discernimento e sabedoria ao longo de toda minha trajetória. Por me proteger, iluminar, abençoar e dar forças em todos os momentos, principalmente naqueles mais árduos.

Agradeço aos meus pais Adalberto Antônio Alves de Souza e Emilia Mariano de Souza, por todo suporte, apoio, e carinho. Aos meus irmãos Rodolfo Alves de Souza e Amanda Caroline Alves de Souza, por me ensinarem “na marra” a ter paciência, e por todos os abraços e encorajamento.

Ao meu noivo Flávio Yoshizo Myiaji por todo apoio, por aturar todas as minhas crises de ansiedade (que não foram poucas), enxugar todas as minhas lágrimas e sempre me aconchegar nos seus braços me tranquilizando e encorajando a nunca desistir.

Agradeço a minha orientadora Maria Lucia Gonsales da Costa Araújo por ter confiado a mim o seu projeto e por acreditar na minha capacidade mesmo quando até eu duvidava. A minha companheira de laboratório Amanda Salvador Baptista, pelas risadas, ensinamentos e paciência com as minhas loucuras.

Agradeço a minha amiga Bruna Zavati Zavitóski, por sempre confiar em mim. Por me fazer superar meus medos (fobias) me colocando dentro de elevadores e no avião. Por me mandar engolir o choro e crescer e por me ensinar a ser mais firme. Obrigada por estar sempre presente e me dar os melhores conselhos.

Obrigada as minhas amigas Cristiane Moura Oliveira, Gabriela Santana, Gabrielle Calera, Taiane Silva, Larissa Cardoso, Guilherme Leite, por tornar essa caminhada mais sutil e agradável. Por dividir os problemas, as soluções, as lágrimas e sorrisos.

Agradeço aos técnicos, Ricardo e Gabriel, que sempre socorreram quando as coisas insistiam em dar errado no laboratório, me ajudando a solucionar os problemas.

Agradeço a toda equipe, trabalhadores diretos e indiretos da Unesp.

Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”
(Theodore Roosevelt).

RESUMO

Streptomyces clavuligerus produz vários compostos bioativos importantes, como os beta-lactâmicos ácido clavulânico (AC), um inibidor de beta-lactamases utilizado em combinação com antibióticos beta-lactâmicos, e mais vinte clavamas (várias com atividade antifúngica), o antibiótico cefamicina (CefC), utilizado comercialmente para a produção de antibióticos semi-sintéticos, além de bioativos não beta-lactâmicos como tunicamicina e holomicina. Estudos têm mostrado que tanto a natureza como a concentração de fontes de nitrogênio influenciam a produção de bioativos em *S. clavuligerus*, pois muitos precursores destes biocompostos derivam de intermediários nitrogenados do metabolismo primário. Um aminoácido importante para o cultivo de *S. clavuligerus* é a lisina, que atua no metabolismo primário via cadaverina aminotransferase, e no metabolismo secundário via 1-piperideína-6-carboxilato, para a produção do raro aminoácido ácido alfa-aminoadípico, um precursor de CefC e de todos os demais antibióticos beta-lactâmicos. Outra fonte de nitrogênio de destaque é o glutamato de sódio, que apresenta efeitos positivos na produção de AC por fornecer átomos de carbono para a molécula deste biocomposto. Estudos têm relatado a produção de bioativos utilizando lisina ou glutamato de sódio nos meios de cultivo, mas não há relatos na literatura sobre a influência conjunta destes aminoácidos. Este trabalho trata da investigação de relações entre, a utilização conjunta de lisina e glutamato de sódio e a produção dos compostos beta-lactâmicos AC e CefC por *S. clavuligerus* em cultivos submersos empregando-se meios quimicamente definidos. Inicialmente foram realizadas fermentações em batelada em mesa incubadora rotativa (28°C, 260 rpm e um pH inicial de 6,5). O conjunto de resultados em frascos agitados utilizando-se uma ampla faixa de combinações de concentração dos aminoácidos mostraram que não é possível otimizar concomitantemente a produção de AC e CefC. Porém, a combinação de 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato resultou em produções finais relevantes dos bioativos, 146,6 mg/L de AC e 140,51 mg/L de CefC. Nesta condição, foram obtidos biomassa de 8,44 g/L, pH final igual a 6,8 e concentração de amônio de 487 mg/L. Esta combinação foi, então, utilizada para validação em biorreator de bancada, com controles de pH em 6,5, 1 vvm de vazão de ar, (fluxometro de massa) e de oxigênio dissolvido em 50% da saturação por meio de variação automática da agitação. Nestas condições obtiveram-se concentrações finais de 248,28 mg/L de AC, 125,54 mg/L de CefC, com biomassa máxima e concentração final de amônio de 4,96 g/L e 457 mg/L, respectivamente. Desta forma, as produções específicas dos bioativos ao final do processo em biorreator foram 200% maior de AC e 40% de CefC, quando comparadas com os resultados obtidos em frascos agitados. Foi observado também que a molécula de AC é muito mais instável a pHs alcalinos e a maiores concentrações de amônio do que a molécula de CefC. O aumento do pH mostrou-se diretamente associado ao consumo de glutamato enquanto o acúmulo de amônio manteve uma relação direta com o consumo das fontes de nitrogênio.

Palavras-chave: *Streptomyces clavuligerus*. Lisina. Glutamato de sódio. Ácido clavulânico. Cefamicina C.

ABSTRACT

Streptomyces clavuligerus produces several important bioactive compounds, such as beta-lactams, clavulanic acid (AC), a beta-lactamase inhibitor which is used in combination with beta-lactam antibiotics, and twenty more clavams with antifungal activity, the antibiotic cephamycin (CefC), of great commercial interest for the production of semisynthetic antibiotic, and the non-lactamic bioactives tunicamycin and holomicyn. Studies have shown that both the nature and the concentration of nitrogen sources influence the production of bioactives metabolites in *S. clavuligerus*, because many precursors of these biocompounds derive from nitrogenous intermediates of the primary metabolism. Lysine is an important amino acid in *S. clavuligerus*, acting on the primary metabolism via cadaverine aminotransferase, and on the secondary metabolism via 1-piperidine -6- carboxylate, for the production of the rare amino acid alpha-amino adipic acid, a precursor of CefC as also of all other beta-lactams antibiotics. Another important source of nitrogen is sodium glutamate, which in *S. clavuligerus* culture media has positive effects on the production of AC. Studies have reported the production of bioactive compounds employing lysine or sodium glutamate in culture media, but there aren't reports in the literature on the joint influence of these amino acids. In this sense, this project proposes to investigate relations between combinations of lysine and sodium glutamate and the production of beta-lactam compounds AC and CefC by *S. clavuligerus* in submerged cultures employing chemically defined media. Initially, batch fermentations were carried out in a rotating incubator at 28°C and 260 rpm, in order to select the best combination of lysine and glutamate concentrations to obtain higher final bioactives compounds yields. This combination was then validated in bioreactor. The set of results in shaken flasks in a wide range of amino acid concentration combinations showed that isn't possible to concomitantly optimize the production of AC and CefC. However the combination of 47,3 mmol/L lysine and 18 mmol/L sodium glutamate resulted in relevant final productions of the biocompounds, 146, 6 mg/L of AC and 141, 51 mg/L of CefC. In this condition, biomass of 8,44 g/L, final pH of 6,8 and ammonium concentration of 487 mg/L were obtained. This combination of lysine and sodium glutamate was then reproduced in benchtop bioreactor, with pH controlled at 6,5. The final concentration of 248,28 mg/L of AC and 125,54 mg/L of CefC with maximum biomass and final concentration of ca. 5,0 g/L and 457 mg/L, respectively, were obtained. That is, the specific productions of the bioactives at the end of the process in bioreactor were 200% higher for AC and 40% for CefC, when compared with the results obtained in shaken flasks. It has also been observed that the AC molecule is much more unstable at alkaline pH values and at higher ammonium concentrations than the CefC molecule. The increase in pH was directly associated with the consumption of glutamate, while the accumulation of ammonium has a straight relation with the consumption of nitrogen sources.

Keywords: *Streptomyces clavuligerus*. Lysine. Sodium glutamate. Acid clavulanic. Cephamycin C.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Estrutura molecular de ácido clavulânico.	25
Figura 3.2	Rota biossintética do ácido clavulânico e outros clavamas.	26
Figura 3.3	Estrutura molecular da cefamicina C.	27
Figura 3.4	Rota biossintética da CefC.	29
Figura 3.5	Agrupamento de genes que codificam enzimas de síntese de CefC (a) e de ácido clavulânico (b) .	30
Figura 4.1	Esporos de <i>S. clavuligerus</i> obtido em meio sólido proposto por Sánchez e Braña (1996) (a) suspensão de esporos preparada em solução crioprotetora de glicerol a 20% v/v e distribuídos em criotubos (b) .	34
Figura 4.2	Esquema das etapas de cultivo de <i>S. clavuligerus</i> .	37
Figura 4.3	Sobrenadante distribuído em eppendorfs para posterior análise (a) e biomassa (b) .	42
Figura 4.4	Halos de inibição medidos para determinação da concentração de CefC..	43
Figura 5.1	Experimento C1- Perfis de concentração celular de cultivos em batelada em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio em mmol/L: M-I (50), M-II (60), M-III (70); M-IV (80), M-V (90) e M-VI (100).	46
Figura 5.2	Experimento C1- Perfis de concentração de lisina (a), maltose (b) e glutamato de sódio (c) de cultivos em batelada em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio (em mmol/L): M-I (50), M-II (60), M-III (70), M-IV (80), M-I (90) e M-VI (100).	47
Figura 5.3	Experimento C1- Perfis de concentração de AC (a) e de CefC (b) de cultivos em batelada em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio (em mmol/L): M-I (50), M-II (60), M-III (70), M-IV (80), M-V (90) e M-VI (100).	48
Figura 5.4	Experimento C1- Perfis de concentração de amônio (medidas pelo método do fenato e por ISE) de cultivos em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio (em mmol/L): M-I (50) (a), M-II (60) (b), M-III (70) (c), M-IV (80) (d), M-V (90) (e), M-VI (100) (f).	49
Figura 5.5	Experimento C1 – Perfis de concentração de glutamato e de valores de pH de cultivos em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio (em mmol/L): M-I (50), M-II (60), M-III (70), M-IV (80), M-V (90) e M-VI (100).	50
Figura 5.6	Experimento P1 - Produção de AC em 72 horas: superfície de resposta (modelo quadrático ajustado a 95% de grau de confiança; coeficiente de determinação $R^2 = 0,98427$) (a) , Diagrama de Pareto (b) e gráfico de valores observados versus valores previstos pelo modelo (c)	53

Figura 5.7	Experimento P1 - Produção de CefC em 72 horas: superfície de resposta (modelo quadrático ajustado a 95% de grau de confiança; coeficiente de determinação $R^2 = 0,9064$) (a) , Diagrama de Pareto (b) e gráfico de valores observados <i>versus</i> valores previstos pelo modelo (c) .	54
Figura 5.8	Experimento P1- Gráfico de perfis para valor ótimo de CefC.	56
Figura 5.9	Experimento P1 (<i>design</i> experimental DCCR) – Perfis de concentração celular de cultivos em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato): C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30).	57
Figura 5.10	Experimento P1- (<i>design</i> experimental DCCR) – Perfis dos valores de pH (a) ; Perfis de concentração de amônio (b) de cultivos em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato): C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30).	58
Figura 5.11	Experimento P1 (<i>desing</i> experimental DCCR) – Relação, no período de 72 horas de cultivo, entre valores máximos de amônio e consumo de lisina (a) e glutamato de sódio (b) ; e relação entre valores máximos de pH e consumo de lisina (c) e glutamato de sódio (d) , em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato): C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30).	59
Figura 5.12	Experimento P1 (<i>design</i> experimental DCCR) – Perfil de concentração de amônio e de concentrações de AC e de CefC obtidas em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato) C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30).	60
Figura 5.13	Experimento P1 (<i>design</i> experimental DCCR) – Relação, no período de 72 horas de cultivo, entre AC e pH (a) ; AC e amônio (b) ; CefC e pH (c) e CefC e amônio (d) , em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato) C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30).	62
Figura 5.14	Experimento P2- Produção de AC em 72 horas: superfície de resposta (modelo quadrático ajustado a 95 % de grau de confiança; coeficiente de determinação $R^2= 0,70061$) (a) , Diagrama de Pareto (b) e gráfico de valores observados <i>versus</i> valores previstos pelo modelo (c) .	65
Figura 5.15	Experimento P2- Produção de CefC em 72 horas: superfície de resposta (modelo quadrático ajustado a 95 % de grau de confiança; coeficiente de determinação $R^2= 0,70061$) (a) , Diagrama de Pareto (b) e gráfico de valores observados <i>versus</i> valores previstos pelo modelo (c) .	66

Figura 5.16	Experimento P2 (desing experimental DCCR) – Perfis de concentração celular de cultivos em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L): C-I (19,6 : 6), C-II (19,6 : 30), C-III (39,6 : 6), C-IV (39,6 : 30), C-V (29,6 : 18), C-VI (15,5 : 18), C-VII (43,7 : 18), C-VIII (29,6 : 1), C-IX (29,6 : 35).	70
Figura 5.17	Experimento P2 (desing experimental DCCR) – Perfis dos valores de pH (a) e concentrações finais de amônio (b) de cultivos em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L): C-I (19,6 : 6), C-II (19,6 : 30), C-III (39,6 : 6), C-IV (39,6 : 30), C-V (29,6 : 18), C-VI (15,5 : 18), C-VII (43,7 : 18), C-VIII (29,6 : 1), C-IX (29,6 : 35).	71
Figura 5.18	Perfis de consumo de glutamato de sódio (a) , lisina (b) e maltose (c) .	72
Figura 5.19	Experimento B1- Perfil de crescimento celular de cultivo realizado em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio.	74
Figura 5.20	Experimento B1- Comparação entre biomassas obtidas em cultivo realizado em frascos agitados (C-VII (P2)) e em biorreator de bancada (B1), utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio.	75
Figura 5.21	Experimento B1- Perfis de produções de AC (a) e CefC (b) de cultivo realizado em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio.	75
Figura 5.22	Experimento B1- Comparação ente as produções específicas de AC (a) e CefC (b) de cultivo realizado em frascos agitados e em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio.	76
Figura 5.23	Experimento B1 – Comparação entre as concentrações de amônio de cultivo realizado em biorreator de bancada (a) e em frascos agitados (b) utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio	77
Figura 5.24	Experimento B1- Perfil de secreção de proteínas de cultivo realizado em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio	78
Figura 5.25	Experimento B1- Esquematização do balanço de massa de nitrogênio proveniente do período final (74 horas) do cultivo realizado em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Subgrupos pertencentes aos compostos beta-lactâmicos e exemplos de microrganismo produtor.	23
Tabela 4.1	Composição do meio sólido proposto por Sánchez e Braña (1996) para obtenção de esporos de <i>S. clavuligerus</i> .	35
Tabela 4.2	Composição do meio de reativação para germinação dos esporos de <i>S. clavuligerus</i> .	35
Tabela 4.3	Composição do meio de propagação de micélios de <i>S. clavuligerus</i> .	35
Tabela 4.4	Composição do meio ágar nutriente para cultivo de <i>E. coli</i> (bactéria-teste).	36
Tabela 4.5	Composição do meio de germinação.	37
Tabela 4.6	Composição do meio de preparo de inóculo principal.	38
Tabela 4.7	Composição do meio base de produção	38
Tabela 4.8	Experimento C1 – Concentração de glutamato de sódio dos meios de cultivo em batelada de <i>S. clavuligerus</i> em frascos agitados, com concentração constante de lisina igual a 50 mmol/L.	39
Tabela 4.9	Experimento P1 - planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - Concentrações de lisina e glutamato de sódio dos meios de cultivo em batelada de <i>S. clavuligerus</i> em frascos agitados.	40
Tabela 4.10	Experimento P2 – planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) – Concentrações de lisina e glutamato de sódio dos meios de cultivo em batelada de <i>S. clavuligerus</i> em frascos agitados.	40
Tabela 5.1	Experimento P1 - planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - Concentrações de lisina e glutamato de sódio (variáveis independentes) e concentrações de AC e CefC (variáveis resposta) produzidas em 72 horas de cultivo em batelada de <i>S. clavuligerus</i> em frascos agitados	51
Tabela 5.2	Experimento P1 - Análises de variância (ANOVA) a 95% de nível de confiança, para regressão dos modelos quadráticos* das produções (em 72 horas) de AC (a) e CefC (b) .	52
Tabela 5.3	Experimento P1- Triplicata da condição C-V (39,6 mmol/L de Lisina e 30 mmol/L de glutamato de sódio) do planejamento experimental do tipo Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), realizada a fim de validar modelo experimental.	56

Tabela 5.4	Experimento P2 - planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - Concentrações de lisina e glutamato de sódio (variáveis independentes) e concentrações de AC e CefC (variáveis resposta) produzidas em 72 horas de cultivo em batelada de <i>S. clavuligerus</i> em frascos agitados	64
Tabela 5.5	Experimento P2 - Análises de variância (ANOVA) a 95% de nível de confiança, para regressão dos modelos quadráticos* das produções (em 72 horas) de AC (a) e CefC (b) .	67
Tabela 5.6	Comparação entre os planejamentos experimentais Experimento P1 e Experimento P2	73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos Específicos	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1. Antibióticos beta-lactâmicos.....	22
3.1.1. A descoberta e desenvolvimento de compostos beta-lactâmicos para uso clínico.	22
3.1.2. Compostos beta-lactâmicos	23
3.1.2.1 Ácido Clavulânico	24
3.1.2.1.1 Biossíntese do AC	26
3.1.2.2. Cefamicina C	27
3.1.2.2.1 Biossíntese da CefC.....	28
3.2. <i>Streptomyces clavuligerus</i> e a produção de metabólitos secundários.	30
3.3. Influência das fontes de Nitrogênio na produção de metabólitos secundários	31
3.4. Íons amônio e sua interferência na produção de metabólitos secundários.	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1. Microrganismos e forma de estocagem	34
4.2. Condições gerais do processo fermentativo	36
4.3. Métodos Analíticos	41
4.3.1. Coleta e tratamento de amostras	41
4.3.2. Concentração Celular.....	41
4.3.3. Concentração de CefC	42
4.3.3.1 Preparo das placas de bioensaio	42
4.3.3.2. Preparo das amostras	43
4.3.3.3. Aplicação das amostras, incubação e leitura dos halos.	43
4.3.4. Concentração de ácido clavulânico	43
4.3.5. Análise de Aminoácidos	44
4.3.6. Métodos de análise de determinação de Amônio.....	44
4.3.6.1. Método do fenato	44
4.3.6.2. Eletrodo de íon seletivo (ISE).....	45
4.3.7. Análise de proteínas extracelulares.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
5.1. Cultivos em frascos agitados	46

5.1.1. Experimento C1	46
5.1.2. Planejamento Experimental 2^2 com quatro pontos axiais e replicatas no ponto central: lisina e glutamato de sódio	50
5.1.2.1. Experimento P1.....	50
5.1.2.2. Experimento P2.....	63
5.2. Cultivo em batelada realizado em biorreator	73
5.2.1. Experimento B1	73
5.2.2. Balanço de massa do Nitrogênio	77
6. CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

Em uma definição clássica os antibióticos são compostos produzidos no metabolismo secundário de microrganismos que inibem o crescimento de outros microrganismos. Os antibióticos podem ser agrupados de acordo com sua estrutura química ou mecanismo de ação. Uma importante classe de antibióticos é constituída por compostos beta-lactâmicos. Um exemplo desta classe é cefamicina C (CefC). Estes bioativos são caracterizados pela presença de um anel beta-lactâmico em sua estrutura molecular (KUMMERER, 2009).

Apesar dos antibióticos beta-lactâmicos serem efetivos no tratamento de muitos microrganismos patogênicos, algumas bactérias desenvolveram uma resistência a estes antibióticos, devido sua capacidade em produzir beta-lactamase, enzimas que clivam o anel beta-lactâmico. Para superar esta resistência, os antibióticos beta-lactâmicos são frequentemente ministrados com inibidores de beta-lactamases, como o ácido clavulânico (AC) (KURYLOWICZ, 1981).

Streptomicetos são bactérias gram-positivas do grupo dos actinomicetos que apresentam a habilidade única de produzir metabólitos secundários complexos, em grande número e variedade, muitos deles com importantes propriedades bioativas (antibióticos, antifúngicos, antitumorais). Somente a partir da década de 1970 foi sendo descoberta a capacidade deste gênero de bactérias em produzir um grande número de compostos bioativos, maior que aqueles produzidos por fungos filamentosos, os quais eram considerados, até então, os maiores produtores de biocompostos (CHALLIS; HOPWOOD, 2003).

Com a descoberta da estreptomicina, primeira droga efetiva no tratamento da tuberculose, em 1943, os actinomicetos ganharam ainda mais destaque como produtores de antibióticos e outros metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas, sendo o gênero *Streptomyces* responsáveis por 70-80% desta produção (SHARMA et al., 2014).

A espécie *Streptomyces clavuligerus* produz vários compostos bioativos de interesse, como, por exemplo, os antibióticos não-beta-lactâmicos Tunicamicina (Tun) que consiste em uma mistura de dez ou mais homólogos de nucleosídeos que interferem na formação de glicoproteínas em bactérias e eucariotos, a holomicina (Hol), um antibiótico da classe das pirrotrinas bem conhecido por inibir a síntese de RNA polimerase de bactérias resistentes à rifamicina (BASSIK; KAMPMANN, 2011;

ROBLES-REGLERO et al., 2013), além de compostos beta-lactâmicos com destaque para o antibiótico cefamicina C (CefC) e o ácido clavulânico (AC), um potente inibidor de enzimas beta-lactamases.

A cefamicina C pertence a importante classe dos antibióticos beta-lactâmicos. Sua estrutura molecular é semelhante a das cefalosporinas, diferenciando-se pela substituição do hidrogênio por um grupo metoxila na posição 7- α do anel bicíclico. Este grupo atua como estabilizador da estrutura do anel beta-lactâmico conferindo uma maior resistência destes antibióticos a enzimas beta-lactamases (OMSTEAD et al., 1985).

O ácido clavulânico é um potente inibidor natural de beta-lactamases (enzimas que conferem resistência a antibióticos beta-lactâmicos em muitos microrganismos). A associação entre o AC e antibióticos beta-lactâmicos permite diminuir a inibição da beta-lactamase permitindo assim, que o antibiótico atue no combate a infecção (FUENTE et al., 2002).

A elucidação das rotas biossintéticas dos compostos beta-lactâmicos e dos demais bioativos produzidos por *S. clavuligerus* tem sido objeto de muitos estudos. Muitos precursores dos metabólitos secundários de *S. clavuligerus* são compostos nitrogenados, o que torna o metabolismo do nitrogênio um aspecto importante para a compreensão da dinâmica entre os metabolismos primário e secundário nesta espécie (DEMAIN; VAISHNAV, 2006).

O controle de processos microbianos pela fonte de nitrogênio é um fenômeno geral e extensivo a todos os microrganismos (AHARONOWITZ; DEMAIN, 1979; VILJOEN et al., 2013). Muitas moléculas de antibióticos são estruturadas com átomos de nitrogênio provenientes de compostos nitrogenados do metabolismo primário (DREW; DEMAIN, 1977; HODGSON, 2000).

Uma característica em *S. clavuligerus*, incomum em procariotos, é a presença do ciclo da ureia (BUSHELL et al., 2006). Esta via do metabolismo do nitrogênio fornece arginina, um dos precursores diretos da molécula de AC. A biossíntese deste composto é favorecida pela adição de ornitina ao meio, a qual é convertida em arginina. Um aminoácido importante em *S. clavuligerus* é a lisina, que atua no metabolismo primário, via cadaverina aminotranferase, e no metabolismo secundário via 1-piperideína-6- carboxilato, para a produção do raro antibiótico α -aminoadípico, um precursor de CefC e demais antibióticos beta-lactâmicos (OZCENGIZ; DEMAIN, 2013). Outro aminoácido com destaque é o glutamato de

sódio. Elson et al (1982) demonstraram a incorporação do carbono do glutamato na molécula de AC, e desde então, vários pesquisadores têm demonstrado o efeito positivo deste aminoácido na produção dos bioativos.

Apesar dos inúmeros benefícios da utilização destas fontes de nitrogênio em cultivos submersos de *S. clavuligerus* o consumo destes aminoácidos acarreta a liberação de amônio e já tem sido demonstrado que o acúmulo destes íons, em concentrações significativas no meio de cultivo afetam de forma negativa a síntese de antibióticos beta-lactâmicos produzidos tanto por fungos como por actinomicetos. Os mecanismos mais observados têm sido repressão e/ou inibição de enzimas da rota biossintética pelo amônio e de enzimas responsáveis pela síntese de precursores dos biocompostos por determinadas fontes de nitrogênio (OZCENGIZ; DEMAIN, 2013).

Em vista da importância do metabolismo do nitrogênio em *S. clavuligerus*, neste projeto investigou-se o consumo de fontes de nitrogênio, lisina e glutamato de sódio, e a evolução da concentração de íons amônio durante cultivos submersos do microrganismo, de forma a associar estes dados com a produção de compostos bioativos.

2. OBJETIVOS

Em vista da importância dos compostos nitrogenados no metabolismo secundário de *S. clavuligerus*, este trabalho apresenta como objetivo geral a investigação e associações entre produção de biocompostos e concentração das fontes de nitrogênio durante cultivo submerso do microrganismo em meios de cultura quimicamente definidos.

2.1 Objetivos Específicos

(a) Realizar cultivos submersos em frascos agitados utilizando meios contendo aminoácidos comumente empregados na produção de compostos bioativos, visando:

- Adequar o método de análise de amônio nos caldos de cultivo;
- Investigar a relação entre lisina e glutamato de sódio, adicionados no meio de cultivo em diferentes proporções, e as produções de AC e CefC;

(b) Realizar cultivo em biorreator convencional sob as melhores condições de concentração das fontes de nitrogênio, obtidas em frascos agitados;

(c) Elaborar balanços de massa para o nitrogênio utilizando os melhores dados resultantes em biorreator.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Antibióticos beta-lactâmicos

3.1.1. A descoberta e desenvolvimento de compostos beta-lactâmicos para uso clínico.

Em 1921 Alexander Fleming, bacteriologista escocês, que sofria de um resfriado comum decidiu inocular placas de ágar com sua própria secreção nasal para determinar a mudança da sua flora bacteriana nasal. Não apareceram colônias durante vários dias, sugerindo assim a presença de alguma substância difusível na secreção nasal que afetava a capacidade de crescimento das bactérias. Verificou-se que a substância, denominada lisozima, tratava-se de uma enzima capaz de dissolver a parede celular e provocar a lise em muitas bactérias gram-positivas. A descoberta da lisozima pavimentou o caminho para a descoberta da penicilina (STEFFE, 1992).

Em 1928 Fleming estudava a relação entre a morfologia das colônias *Staphylococcus* e sua virulência. Antes de partir de férias, ele inoculou placas de cultura com colônias *Staphylococcus* e as empilhou em seu laboratório. Quando voltou encontrou várias culturas contaminadas com bolores. Após examinar as placas, Fleming notou que em uma havia um molde contaminante cuja presença parecia influenciar a morfologia das colônias de *Staphylococcus*: as colônias próximas ao molde eram transparentes e pareciam estar sofrendo lise. Esta observação era uma reminiscência do que Fleming tinha visto anteriormente com a lisozima, levando-o a perceber que o molde continha uma propriedade antagônica microbiana (STEFFE, 1992).

Fleming descreveu a propriedade de crescimento do molde, elaborou um procedimento de extração e projetou um rápido ensaio antimicrobiano. As diluições em série destes extratos inibiram o crescimento de *Staphylococcus*, *Streptococcus pyrogenes* e *Pneumococcus cultures*, contudo não prejudicou *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus proteus* ou *Vibrio cholerae*. Estas experiências deram forma à fundação para purificação subsequente da penicilina e a uma técnica fácil do teste antimicrobiano que está sendo amplamente utilizado até hoje. Apesar da descoberta da penicilina ter ocorrido em 1928, seu uso

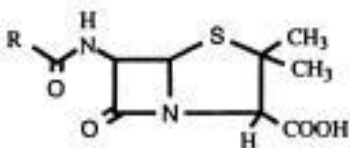
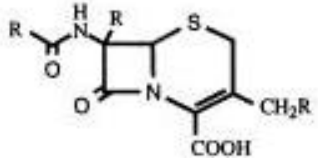
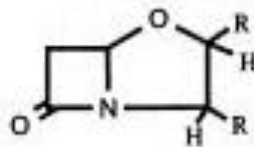
como agente terapêutico para o tratamento de infecções só aconteceu na década de 40 (KONG et al., 2010).

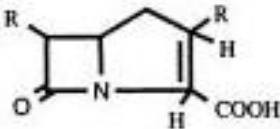
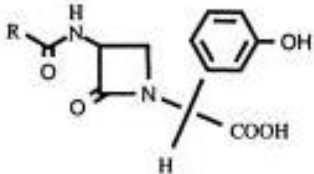
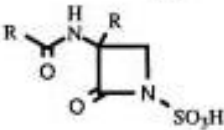
3.1.2. Compostos beta-lactâmicos

Os compostos beta-lactâmicos são produzidos no metabolismo secundário de alguns microrganismos, e são capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos. Os compostos beta-lactâmicos são amplamente utilizados no tratamento de doenças infecciosas, em virtude da sua alta eficiência e especificidade. São exemplos destes compostos penicilinas e cefalosporinas. A característica comum de todos os constituintes deste grupo é a presença do anel beta-lactâmico em sua estrutura, conferindo-lhes atividade antimicrobiana (ESSACK, 2001).

As estruturas generalizadas dos subgrupos pertencentes aos compostos beta-lactâmicos, juntamente com os seus microrganismos produtores, estão descritos na Tabela 3.1. Os tipos de substituições ligadas ao núcleo básico da molécula, ou seja, o radical (grupo "R") particular de cada molécula determina a atividade específica do composto beta-lactâmico (ESSACK, 2001).

Tabela 3.1 Subgrupos pertencentes aos compostos beta-lactâmicos e exemplos de microrganismo produtor.

Classes dos beta-lactâmicos	Antibióticos	Microrganismos produtores (Bactérias Gram +)
Penam		
	Penicilinas	<i>Penicillium crysogenum</i> <i>P. notatum</i> <i>Aspergillus nidulans</i>
Ceph-3-em		
	Cefalosporinas Cefamicinas Cefabacinas	<i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Paelomyces persinucus</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i> <i>Nocardia lactamdurans</i> <i>Flavobacterium sp.</i> <i>Lysobacter lactamgenus</i>
Clavam		
	Ácido clavulânico	<i>Streptomyces clavuligerus</i>

Carbapenem		
	Tienamicinas Ácido olivânico	<i>Streptomyces clavuligerus</i> <i>S. olivaceus</i> <i>Erwinia carotovora</i> <i>Serratia sp</i>
Monolactam		
	Nocardias	<i>Nocardia Uniformis</i> <i>Subsp. Tsoyamanensis</i>
	Monobactams	<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Pseudomonas acidófila</i>

Fonte: Brakhage, 1998

Os antibióticos beta-lactâmicos interferem na fase final da síntese da parede celular, inibindo as enzimas que catalisam as reações de síntese de peptideoglicano. O peptideoglicano é um componente essencial da parede celular bacteriana, pois protege o microrganismo da ruptura osmótica, determina a forma da célula e é essencial para o crescimento e divisão celular (SPRATT, 1994), sendo responsável assim, por manter a integridade e viabilidade celular (LIVERMORE; WOOD, 1990).

Apesar da eficiência dos antibióticos beta-lactâmicos no tratamento de muitos microrganismos patogênicos, algumas bactérias desenvolveram uma resistência a estes antibióticos, devido sua capacidade em produzir beta-lactamase, enzimas que clivam o anel beta-lactâmico. Para superar esta resistência, os antibióticos beta-lactâmicos são frequentemente ministrados com compostos inibidores de beta-lactamases, como, por exemplo, o ácido clavulânico (AC) (KURYLOWICZ et al., 1981).

3.1.2.1 Ácido Clavulânico

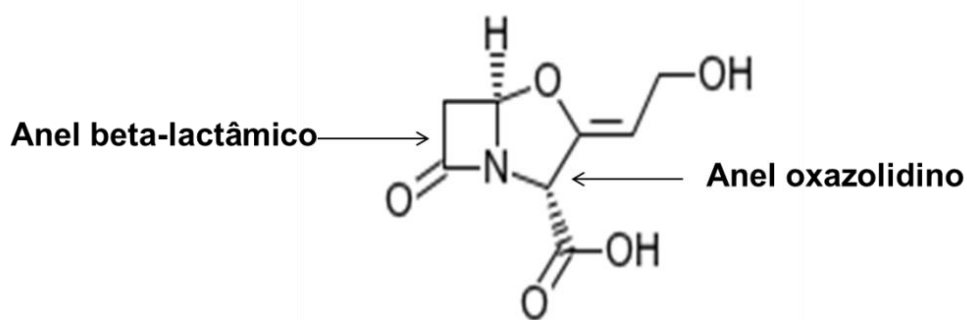
Com o crescente aumento de microrganismos resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos ao longo dos anos, faz-se necessário encontrar inibidores de beta-lactamases afim de serem utilizados juntamente com esses antibióticos no intuito de melhorar sua eficiência. Como exemplo de inibidores de beta-lactamase pode-se citar o valclavam, as clavamicinas e o ácido clavulânico, sendo todos estes

pertencentes ao subgrupo “clavam” dos compostos beta-lactâmicos (BAGGALEY et al., 1997).

O AC foi descrito pela primeira vez por Brown e seu grupo de pesquisa, em 1976. Este bioativo é um inibidor natural de beta-lactamase (enzima que confere resistência a antibióticos beta lactâmicos em muitos microrganismos) conferindo uma maior eficiência aos antibióticos beta-lactâmicos.

O AC constitui-se de um anel beta-lactâmico condensado e um anel oxazolidina (Figura 3.1). Apesar de apresentar baixa atividade antibiótica, este biocomposto é um irreversível inibidor de enzimas beta-lactamases que são produzidas por bactérias resistentes a antibióticos beta-lactâmicos (LIRAS et al., 2000).

Figura 3.1 Estrutura molecular de ácido clavulânico.



Fonte: Brown et al., 1976

A molécula de AC é amplamente utilizada em combinação com antibióticos beta-actâmicos. O exemplo de maior sucesso do uso de antibiótico beta-lactâmico sensível a beta-lactamase juntamente com um inibidor desta enzima é a combinação de AC com amoxilina. No Brasil, esta combinação é comercializada com o nome Clavulin[®] (*Smith Kline Beecham Laboratory* - Rio de Janeiro) (OLIVEIRA et al., 2009).

O mecanismo de ação do AC é bem conhecido. A molécula de AC liga-se irreversivelmente ao grupo hidroxila da serina presente no sítio ativo de beta-lactamases, produzindo um intermediário estável que inativa a enzima (GRESSER et al., 2001).

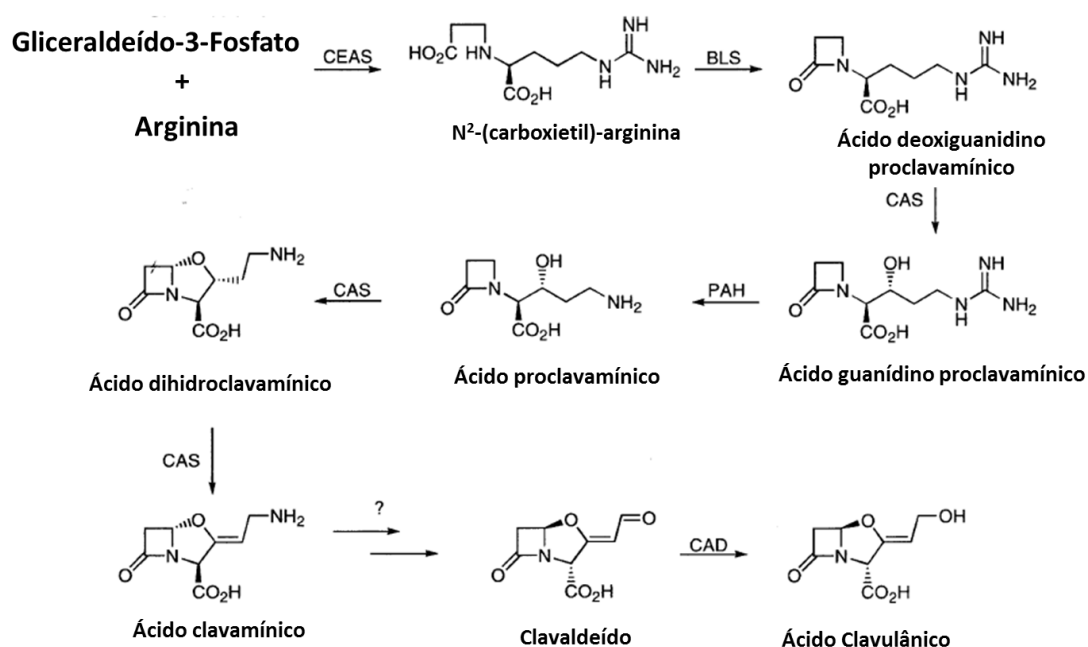
3.1.2.1.1 Biossíntese do AC

Em relação à biossíntese da molécula de AC, Butterworth et al. (1984) propôs inicialmente que o ácido clavulânico, as penicilinas e cefalosporinas teriam o mesmo intermediário comum, devido a similaridade entre as estruturas químicas destas moléculas. Porém Jensen e Paradkar (1999) demonstraram substratos específicos requeridos na rota biossintética das penicilinas e que eram incompatíveis com os precursores de AC.

Desde então, vários estudos têm sido realizados com intuito de elucidar a rota biossintética do AC. Elson et al. (1982) sugeriram a incorporação de átomos de carbono do glutamato de sódio na molécula de AC, e o glicerol como precursor do anel beta-lactâmico. Em estudos utilizando arginina, ácido glutâmico e ornitina, Romero et al. (1986) sugeriram que três carbonos do anel beta-lactâmico eram originários do glicerol e os demais carbonos seriam derivados da ornitina que pode ser sintetizada a partir do glutamato ou da arginina.

As enzimas e os precursores da biossíntese do AC conhecidos até o momento estão descritos na Figura 3.2.

Figura 3.2 Rota biossintética do ácido clavulânico e outros clavamas



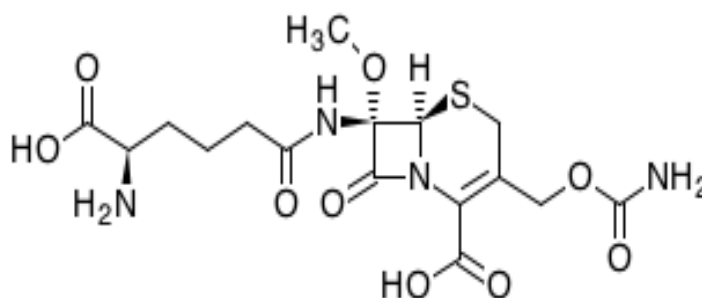
CEAS: N-carboxietilarginina sintase, BLS: beta-lactam sintase, CAS: clavaminato sintase, PAH: proclaminato amidino hidrolase, CAD: clavaldeído desidrogenase

Fonte: Elkins et al. (2002)

3.1.2.2. Cefamicina C

As cefamicinas foram isolada no início da década de 70. Em 1971, Nagarajan e seu grupo de pesquisa, isolaram o primeiro composto desta família, a CefC, que é produzida por vários actomicetos incluindo o gênero *S. clavulugerus*. As cefamicinas pertencem a importante classe de compostos com propriedades antibióticas. Sua estrutura molecular é semelhante a das cefalosporina, distinguindo-se pela substituição do hidrogênio, por um grupo metoxila na posição 7- α do anel bicíclico (Figura 3.3). Este grupo atua como estabilizador da estrutura do anel beta-lactâmico, reduzindo a sensibilidade a lactamases, tornando, assim, este antibiótico resistente a enzimas beta-lactamase (DÉVI; SHIDHAR, 1999; OMSTEAD et al., 1985).

Figura 3.3 Estrutura molecular da cefamicina C.



Fonte: Reading; Cole (1977)

CefC é eficiente no tratamento contra microrganismos gram-negativos, porém, possui baixa atividade contra organismos gram-positivos. Modificações químicas na estrutura da molécula, por meio, de alterações na cadeia lateral, proporcionou um efeito desejado, uma vez que aumentou o espectro de atividade antibiótica contra bactérias gram-positivas (OLIVEIRA et al., 2009; CAVALLIERI, 2014). Assim, apesar de CefC não ser utilizada clinicamente, é utilizada para produzir vários antibióticos semissintéticos de importância terapêutica, chamados cefâmicos.

Sua descoberta foi de extrema importância para o desenvolvimento dos antibióticos, pois sua molécula apresenta atividade antibacteriana e,

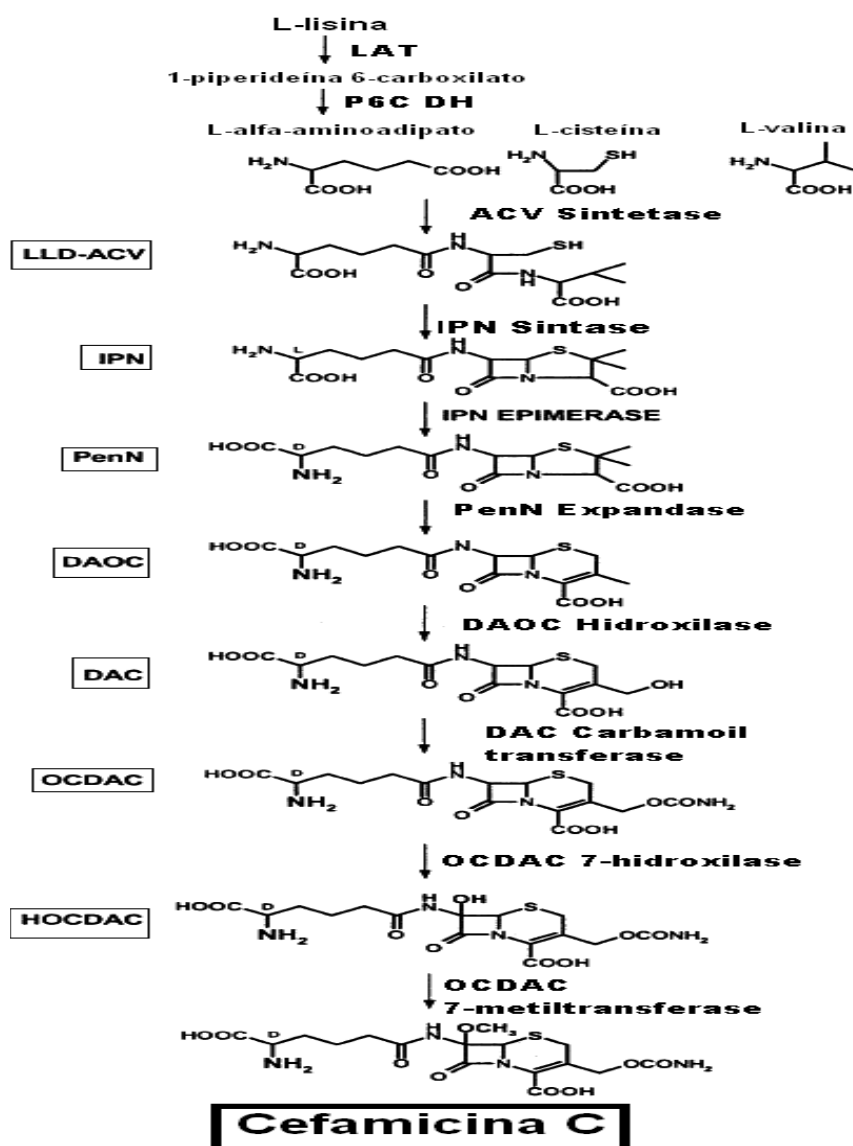
concomitantemente é resistente a enzimas beta-lactamases de bactérias gram-negativas (LIRAS et al., 2000).

Como todos os compostos beta-lactâmicos, o mecanismo de ação da CefC consiste da sua capacidade de se ligar a uma proteína receptora do microrganismo suscetível, inibindo, assim, a síntese da parede celular acarretando consequentemente a perda da viabilidade da célula afetada (OMSTEAD et al., 1985).

3.1.2.2.1 Biossíntese da CefC

São precursores da biossíntese de CefC, em *S. clavuligerus*, os aminoácidos, lisina, cisteína e valina. A Figura 3.4 descreve a rota biossintética da CefC em *S. clavuligerus*. Inicialmente a lisina é convertida a ácido α -aminoadípico através de dois passos de conversão. A conversão da lisina em 1-piperidino-6-carboxilato pela ação da enzima ϵ -aminotransferase (LAT) marca o primeiro passo da biossíntese da CefC. O ácido α -aminoadípico sofre uma reação de consensação com dois aminoácidos, valina e cisteína, em uma reação catalisada por ACV sintatase multifuncional, para formar o tripeptídeo δ - (L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV). Posteriormente uma ciclase converte o tripeptídeo ACV em isopenicilina N, composto beta-lactâmico com atividade antibiótica fraca (KHETAN et al., 1999; RIUS et al., 1997). A cadeia lateral do ácido L- α -aminoadípico (L- α -AAA) sofre uma transformação pela enzima isomerase, convertendo a isopenicilina N em penicilina N. O anel de cinco membros da penicilina N é então expandido a um anel de seis membros (comum a todas as cefalosporinas) pela ação da expandase. Finalmente, a deacetoxicefalosporina C formada, é hidroxilada pela hidroxilase para formar deacetilcefalosporina C, que é o precursor imediato da cefalosporina C. Todos os produtores de cefamicina realizam a metoxilação em C-7 que é o passo mais característico da formação destes compostos. Nos cultivos de *S. clavuligerus* a cefalosporina C é convertida em cefamicina C (LIRAS, 1999).

Figura 3.4 Rota biossintética da CefC



Fonte: Leite, 2014.

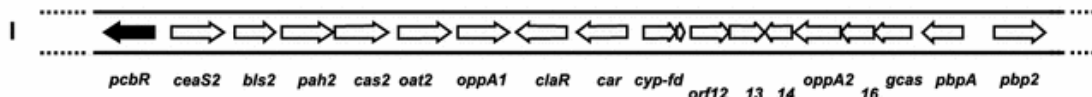
Apesar da produção dos compostos beta-lactâmicos CefC e AC ocorrerem em rotas biossintéticas totalmente distintas, suas produções ocorrem comitantemente nos processos fermentativos, isto porque ambas as rotas biossintéticas são codificados pelo mesmo elemento funcional *ccaR* ("cephamycin and clavulanic acid Regulator") codificado pelo gene *ccaR* (SANTAMARTA et al, 2002) (Figura 3.5).

Figura 3.5 Agrupamento de genes que codificam enzimas de síntese de CefC **(a)** e de ácido clavulânico **(b)**.

a) Cephamycin C gene cluster



b) Clusters for clavulanic acid and clavams



Fonte: Santamarta et al. (2002)

3.2. *Streptomyces clavuligerus* e a produção de metabólitos secundários.

Com a descoberta da estreptomicina, primeira droga efetiva no tratamento de tuberculose, em 1943, os actomicetos ganharam ainda mais destaque como produtores de antibióticos e outros metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas. Dentro dos actomicetos, os membros do gênero *Streptomyces*, são responsáveis por cerca de 70-80% da produção de metabólitos secundários que apresentam importantes propriedades bioativas (antifúngicos, antibacteriana, antitumorais) (CHALLIS; HOPWOOD, 2003; BÉRDY, 2005).

A espécie *Streptomyces clavuligerus* foi isolada primeiramente em 1971 por Higgens e Kastner. Trata-se de uma bactéria filamentosa, gram-positiva, mesófila (condição favorável de temperatura entre 25° - 35°C), aeróbia estrita e que apresenta um bom crescimento em uma faixa de pH entre 6,5 a 8,0. Este microrganismo se destaca pela capacidade de produzir uma gama de compostos naturais a serem estudados (ORTIZ, 2005).

O ciclo de vida deste microrganismo é bastante complexo. Inicia-se com a germinação de esporos que dão origem a um micélio vegetativo que são constituídos de hifas ramificadas. Do micélio é originado as hifas aéreas. As hifas aéreas sofrem uma mudança morfológica que pode incluir a septação e a formação de esporos. É nesta fase que é ativado o metabolismo secundário. Para o seu desenvolvimento a espécie *Streptomyces* necessita somente de uma fonte de nitrogênio orgânico ou inorgânico, de uma fonte de carbono orgânico e alguns sais minerais (ORTIZ, 2005).

S. clavuligerus produz um grande número de metabólitos secundários com atividades farmacológicas interessantes, como os antibióticos não beta-lactâmicos tunicamicina, que consiste em uma mistura de dez ou mais homólogos de nucleosídeos que interferem na formação de glicoproteínas em bactérias e eucariotos e a holomicina, um antibiótico da classe das pirroínas bem conhecido por inibir a síntese de RNA polimerase de bactérias resistentes à rifamicina (BASSIK; KAMPMANN, 2011; ROBLES-REGLERO et al., 2013), e os compostos beta-lactâmicos, como os antibióticos intermediários da rota biossintética da Cefalosporina C (penicilina N, deacetoxicefalosporina C e deacetylcefalosporina C) além do antibiótico Cefamicina C (CefC) e o inibidor de beta-lactamase ácido clavulânico (AC).

A produção de diferentes metabólitos secundários por *S. clavuligerus* é regulada por efetores intracelulares que respondem a alterações nas concentrações e composições dos constituintes do meio de cultura, ou seja, o favorecimento da produção de um determinado biocomposto pode ser possível variando-se as condições de cultivo (ROMERO et al., 1984; BELLÃO, 2013; LEITE et al., 2016).

3.3. Influência das fontes de Nitrogênio na produção de metabólitos secundários

A elucidação das rotas biossintéticas dos compostos beta-lactâmicos e dos demais bioativos produzidos por *S. clavuligerus* tem sido objeto de muitos estudos. Muitos precursores dos metabólitos secundários de *S. clavuligerus* são compostos nitrogenados, o que torna o metabolismo do nitrogênio um aspecto importante para a compreensão da dinâmica entre os metabolismos primário e secundário nesta espécie (DEMAIN; VAISHNAV, 2006).

A produção de metabólitos secundários, ocorre de forma inversamente proporcional ao crescimento celular, ou seja, sua biossíntese é favorecida por condições desfavoráveis ao pleno desenvolvimento do microrganismo. Para *S. clavuligerus* fontes orgânicas de N, como por exemplo os aminoácidos, são mais adequadas ao desenvolvimento celular do que fontes inorgânicas de N (TROVATTI et al., 2006), portanto as fontes de nitrogênio que resultam em baixas taxas de crescimento celular normalmente são mais adequadas à síntese de antibióticos e,

inversamente, as fontes que favorecem altas taxas de crescimento acarretam declínio e/ou total interrupção da produção dos bioativos.

Muitas moléculas de antibióticos são estruturadas com átomos de nitrogênio provenientes de compostos nitrogenados do metabólito primário. Um aminoácido importante em *S. clavuligerus* é lisina, que atua no metabolismo primário, via cadaverina aminotransferase, e no metabolismo secundário, via 1-piperideína-6-carboxilato, para a produção do raro aminoácido ácido alfa-aminoadípico, um precursor de CefC e de todos os demais antibióticos beta-lactâmicos. Desde o início da década de 1980, o estímulo da produção de antibióticos beta-lactâmicos por lisina exógena em cultivos de *S. clavuligerus* tem sido demonstrado, obtendo-se aumentos de até seis vezes na produção de cefalosporinas, relativamente à produção obtida com meios não suplementados com lisina (OZCENGIZ; DEMAINE, 2013). Outro aminoácido também com destaque, é o glutamato de sódio que também auxilia a produção de penicilinas, além de ser utilizado pelo microrganismo como uma boa fonte de carbono associada ao crescimento celular (DEMAINE; VAISHNAV, 2006).

3.4. Íons amônio e sua interferência na produção de metabólitos secundários.

Estudos fisiológicos, bioquímicos e/ou genéticos têm mostrado que a natureza e a concentração da fonte de nitrogênio influenciam a síntese de uma variedade de antibióticos não relacionados quimicamente, produzidos por microrganismos eucarióticos ou procarióticos como a espécie *S. clavuligerus*, entretanto o consumo destas fontes de nitrogênio causa a produção de íons de amônio, outro fato que acarreta a produção de amônio é a morte celular (DEMAINE; VAISHNAV, 2006).

Tem sido demonstrado que o acúmulo de íons amônio durante o cultivo microbiano geralmente afeta de forma negativa a síntese de antibióticos beta-lactâmicos produzidos tanto por fungos como por actinomicetos (DEMAINE; VAISHNAV, 2006). Os mecanismos mais observados têm sido repressão e/ou inibição de enzimas da rota biossintética pelo amônio e de enzimas responsáveis pela síntese de precursores dos biocompostos por determinadas fontes de nitrogênio (OZCENGIZ; DEMAINE, 2013).

Estudos realizados por Romero et al. (1984) demonstraram que íons amônio em concentrações acima de 10 mmol/L reduziram a produção de ácido clavulânico em cultivos de *S. clavuligerus*. Já Lebrihi et al. (1992) observaram a inibição da enzima valina desidrogenase por amônio na produção do antibiótico espiramicina por *Streptomyces ambofaciens*. Devido à interferência negativa dos íons amônio nas biossínteses dos biocompostos, este se faz um parâmetro de fundamental importância nas produções dos metabólitos secundários.

Diferentes métodos de se analisar amônio são encontrados na literatura, particularmente para análise de nitrogênio amoniacal em águas do meio ambiente (TZOLLAS et al., 2010; AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water & waste water**. 21 st ed. Washington, DC, 2005). Os dois principais fatores que influenciam na escolha do método de determinação de amônio em uma matriz são a concentração do íon e a presença de interferentes. A determinação de nitrogênio amoniacal presente nos caldos resultantes de processos fermentativos é dificultada, principalmente, pela presença de muitos interferentes (orgânicos e/ou inorgânicos) que inviabilizam uma quantificação confiável do íon. Ainda, dificuldades adicionais como, por exemplo, limitações físicas dos processos em frascos agitados que possibilitam coletar somente pequenas quantidades de amostra ao longo da fermentação, não permitem realizar as replicatas necessárias para validar adequadamente os resultados das análises (TZOLLAS et al., 2010).

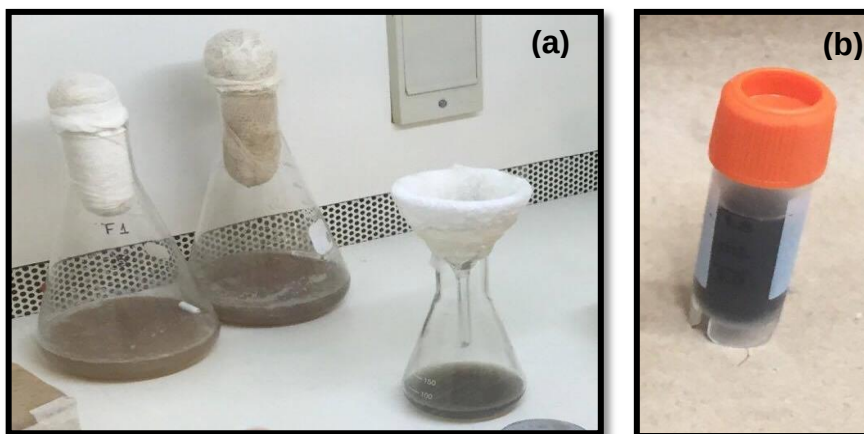
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismos e forma de estocagem

Para a produção de AC e CefC foi utilizada a linhagem selvagem de *S. clavuligerus* ATCC 27064, proveniente da American Type Culture Collection (BUTTERWORTH, 1984), adquirida da própria ATCC na forma de células vegetativas (micélios) liofilizados. Os esporos de *S. clavuligerus* foram obtidos em meio sólido (Figura 4.1a), proposto por Sánchez e Braña (1996) descrito na Tabela 4.1. O microrganismo foi cultivado no meio sólido em estufa incubadora com temperatura controlada em $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 15 dias. Após esse período, os esporos foram recolhidos em solução crioprotetora de glicerol a 20% v/v, distribuídos em criotubos (~2,0 mL) (Figura 4.1 b) e posteriormente armazenados em ultrafreezer em temperatura de -80°C .

Para a estocagem de longo prazo, adotou-se o processo de liofilização, no qual, inicialmente os esporos foram germinados no meio de reativação (Tabela 4.2) por um período de 24 horas. Após esse período, o microrganismo foi transferido para um meio de propagação de micélios (KIESER et al., 2000) (Tabela 4.3) por mais um intervalo de 24 horas. O micélio foi então recolhido, centrifugado, lavado e liofilizado. Todos os valores de pH foram ajustados com solução de HCl (2 mol/L) e NaOH (2 mol/L).

Figura 4.1 Esporos de *S. clavuligerus* obtido em meio sólido proposto por Sánchez e Braña (1996) **(a)** suspensão de esporos preparada em solução crioprotetora de glicerol a 20% v/v e distribuídos em criotubos **(b)**.



Fonte: Elaboração própria

Tabela 4.1 Composição do meio sólido proposto por Sánchez e Braña (1996) para obtenção de esporos de *S. clavuligerus*.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	5,0
Caseína hidrolisada ácida	1,0
Extrato de levedura	0,5
Extrato de carne	0,5
Tampão biológico MOPS	21
Ágar	20
pH = 7,0	

Tabela 4.2 Composição do meio de reativação para germinação dos esporos de *S. clavuligerus*.

Componentes	Concentração (g/L)
Tryptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	10,0
Tampão biológico MOPS	21,0
pH = 7,0	

Tabela 4.3 Composição do meio de propagação de micélios de *S. clavuligerus*.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	5,0
Extrato de malte	3,0
Peptona bacteriológica	10,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,75
K ₂ HPO ₄	2,5
Tampão biológico MOPS	21,0
Solução de sais (*)	1,0 mL
pH = 7,0	

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

Como microrganismo-teste foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* ESS 2235. Esta linhagem supersensível a antibióticos beta-lactâmicos, foi gentilmente cedida pela Dra. Paloma Liras (Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade de León, León, Espanha), foi estocada em criotubos (~2,0 mL) na forma de células vegetativas e armazenada em ultrafreezer a – 80°C. A bactéria-teste *E. coli* ESS 2235 foi cultivada em meio ágar nutriente, descrito na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 Composição do meio ágar nutriente para cultivo de *E. coli* (bactéria-teste).

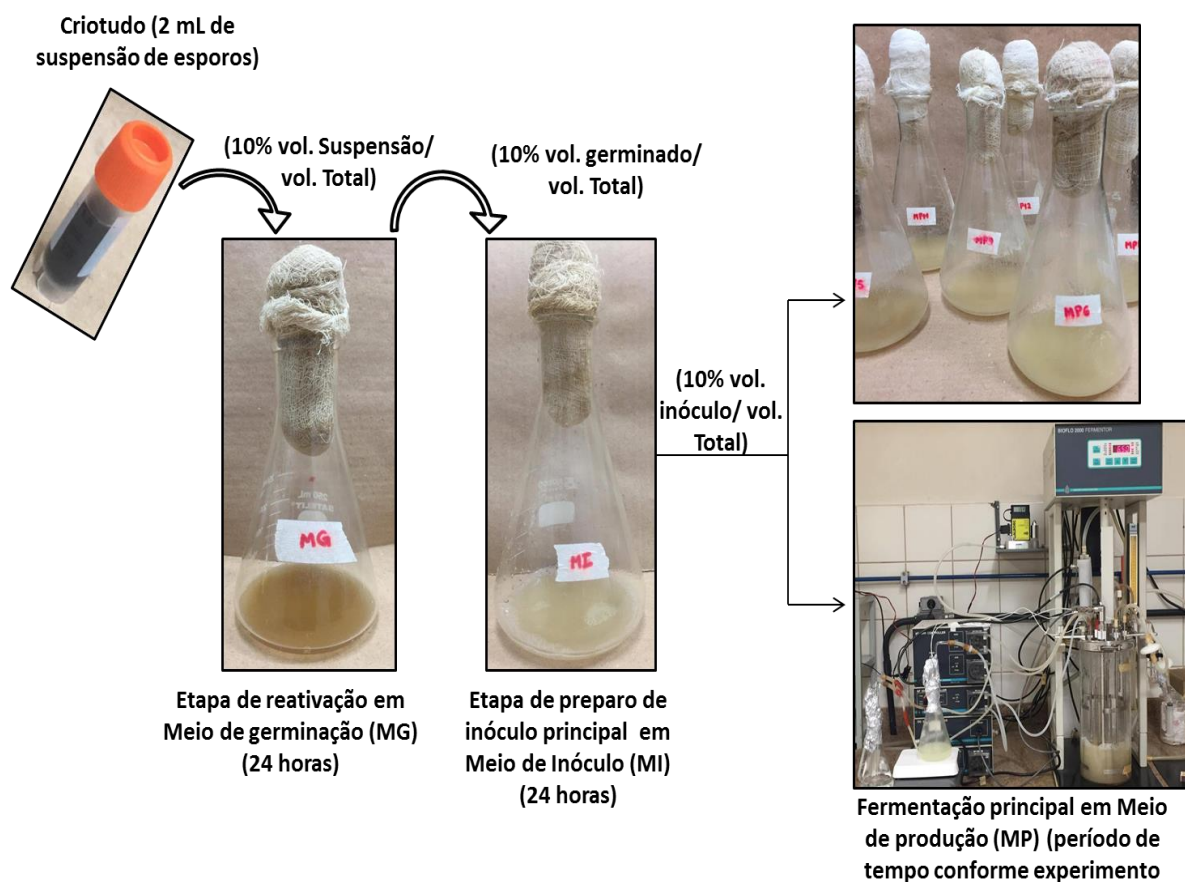
Componentes	Concentração (g/L)
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0
Ágar	15,0
pH = 6,8 ± 0,1	

4.2. Condições gerais do processo fermentativo

Todos os processos fermentativos deste trabalho foram realizados em batelada e tiveram duração de 72 ou 74 horas. As etapas dos cultivos de *S. clavuligerus* em mesa rotatória estão esquematizadas na Figura 4.2 O criotubo contendo esporos do microrganismo foi vertido no meio de germinação (Tabela 4.5) e mantido por um período de 24 horas em mesa incubadora. Após esta etapa, retirou-se uma alíquota (10% do volume total do meio de inóculo) do germinado para inocular no meio de preparo de inóculo (Tabela 4.6), o qual foi agitado novamente por mais 24 horas. Como última etapa, transferiu-se uma fração (10% do volume total do meio de produção) do inóculo principal para o meio de produção, no qual foram variadas as concentrações das fontes de nitrogênio (lisina e glutamato) de acordo com o objetivo da fermentação (Tabela 4.7).

Para cultivos realizados em mesa rotatória incubadora utilizaram-se erlenmeyers de 500 mL (com volume total de meio de no máximo 10% do volume total do frasco, a fim de não comprometer a quantidade de oxigênio) que foram agitados em uma frequência de rotação de 260 rpm e em temperatura controlada de 28 °C. O pH inicial dos meios de produção foi ajustado para o valor de 6,5 utilizando soluções de HCl (2 mol/L) e NaOH (1 mol/L).

Para o cultivo realizado em biorreator (volume de trabalho 5,0 L) foram controlados a temperatura em 28 °C, a taxa de aeração em 1 vvm, utilizando um fluxômetro de massa, o nível de O₂ dissolvido em 50% com relação à saturação por meio da variação automática da velocidade de agitação, e o pH que foi mantido em 6,5, por meio da adição de HCl (2 mol/L) ou NaOH (1 mol/L).

Figura 4.2 Esquema das etapas de cultivo de *S. clavuligerus*.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4.5 Composição do meio de germinação.

Componentes	Concentrações (g/L)
Triptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	10,0
Tampão biológico MOPS	21,0
pH= 6,8	

Tabela 4.6 Composição do meio de preparo de inóculo principal.

Componentes	Concentrações (g/L)
Maltose	10,0
Lisina	4,0
Glutamato de sódio	5,5
Extrato de Levedura	1,0
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄	0,8
Tampão biológico MOPS	21,0
Solução de sais ^(*)	10,0
Elementos traços ^(**)	2,0
pH = 6,8	

(*) Composição da solução de sais em (g/L): MnCl₂ 4H₂O (1,0), FeSO₄ 7H₂O (1,0), ZnSO₄ 7H₂O

(**) Composição dos traços em (g/L): CuSO₄ 5H₂O (0,49), CoCl₂ (0,28), Na₂MoO₄ (0,15).

Tabela 4.7 Composição do meio base de produção

Componentes	Concentrações (g/L)
Glutamato de sódio	(#)
Lisina	(#)
K ₂ HPO ₄	1,75
MgSO ₄	0,75
CaCl ₂	0,2
NaCl	2,0
Tampão biológico MOPS	21,0
Maltose	10,0
Solução de sais ^(*)	5,0
Elementos traços ^(*)	2,0
pH = 6,5	

(*) Composição da solução de sais em (g/L): MnCl₂ 4H₂O (1,0), FeSO₄ 7H₂O (1,0), ZnSO₄ 7H₂O.

(**) Composição dos traços em (g/L): CuSO₄ 5H₂O (0,49), CoCl₂ (0,28), Na₂MoO₄ (0,15).

(#) valores variados de acordo com cada experimento.

Quatro conjuntos de fermentações foram realizados. O primeiro (Experimento C1) consistiu de seis condições, em duplicatas, nas quais se variou a concentração de glutamato de sódio e se manteve a concentração de lisina

constante em 50 mmol/L (9,2 g/L) (Tabela 4.8). Com os dados obtidos neste primeiro conjunto de fermentações foi planejado o segundo conjunto de experimentos que consistiu em dois planejamentos experimentais (Experimento P1 e Experimento P2) de *design* Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Nestes conjuntos experimentais foram combinadas duas variáveis independentes (x_1 = concentração de lisina e x_2 = concentração de glutamato) em nove condições diferentes, sendo que no Experimento P1, foi realizada uma triplicata no ponto central e uma duplicata na condição mais utilizada em nosso laboratório (50 mmol/L de cada aminoácido) (Tabela 4.9), enquanto que para o Experimento P2 foi realizada quatro replicatas no ponto central (Tabela 4.10).

As faixas de concentração de cada variável independente foram definidas com base na literatura e nos resultados obtidos experimentalmente. As variáveis respostas destes planejamentos experimentais foram os compostos beta-lactâmicos AC e CefC. Os modelos quadráticos obtidos no processo de regressão apresentam a forma geral expressa pela Equação 1.

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_1^2 + a_4x_2^2 + a_5x_1x_2 \quad \text{(Equação 1)}$$

Sendo y = variável resposta (AC ou CefC), x_1 e x_2 = variáveis independentes (lisina e glutamato), a_0 = coeficiente de intersecção, a_1 e a_2 = coeficientes dos termos lineares, a_3 e a_4 = coeficientes dos termos quadráticos, a_5 = coeficiente do termo referente ao efeito conjugado das variáveis independentes (lisina e glutamato).

Tabela 4.8 Experimento C1 – Concentração de glutamato de sódio dos meios de cultivo em batelada de *S. clavuligerus* em frascos agitados, com concentração constante de lisina igual a 50 mmol/L.

Condição	Glutamato de sódio (mmol/L)
M-I	50
M-II	60
M-III	70
M-IV	80
M-V	90
M-VI	100

Tabela 4.9 Experimento P1 - planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - Concentrações de lisina e glutamato de sódio dos meios de cultivo em batelada de *S. clavuligerus* em frascos agitados.

Corrida	Condição	Variáveis independentes			
		Codificadas		Reais (mmol/L)	
		Lisina (x_1)	Glutamato (x_2)	Lisina	Glutamato
1	C-II	-1	-1	50	10
2	C-III	+1	-1	100	10
3	C-I	-1	+1	50	50
4	C-I	-1	+1	50	50
5	C-IV	+1	+1	100	50
6	C-VII	$+\sqrt{2}$	0	110,4	30
7	C-V	$-\sqrt{2}$	0	39,6	30
8	C-VI	0	$-\sqrt{2}$	75	1,7
9	C-VIII	0	$+\sqrt{2}$	75	58,3
10	C-XI	0	0	75	30
11	C-XI	0	0	75	30
12	C-IX	0	0	75	30

Tabela 4.10 Experimento P2 – planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) – Concentrações de lisina e glutamato de sódio dos meios de cultivo em batelada de *S. clavuligerus* em frascos agitados.

Corrida	Condição	Variáveis independentes			
		Codificadas		Reais (mmol/L)	
		Lisina (x_1)	Glutamato (x_2)	Lisina	Glutamato
1	C-I	-1	-1	19,6	6
2	C-II	-1	+1	19,6	30
3	C-III	+1	-1	39,6	6
4	C-IV	+1	+1	39,6	30
5	C-V	0	0	29,6	18
6	C-V	0	0	29,6	18
7	C-V	0	0	29,6	18
8	C-V	0	0	29,6	18
9	C-VI	$-\sqrt{2}$	0	15,5	18
10	C-VII	$+\sqrt{2}$	0	43,7	18
11	C-VIII	0	$-\sqrt{2}$	29,6	1
12	C-IX	0	$+\sqrt{2}$	29,6	35

O último conjunto de experimentos (Experimento B1) consistiu da reprodução em biorreator (Bioflo 2000 volume de trabalho 5L) da melhor condição resultante dos planejamentos experimentais, ou seja, a condição na qual se obtiveram as melhores concentrações dos compostos beta-lactâmicos estudados, AC e CefC. Este conjunto de experimentos foi realizado com o intuito de aumentar ainda mais a produção dos bioativos. O volume de meio de produção utilizado foi de 1,5 L. As amostras foram retiradas de 3 em 3 horas.

4.3. Métodos Analíticos

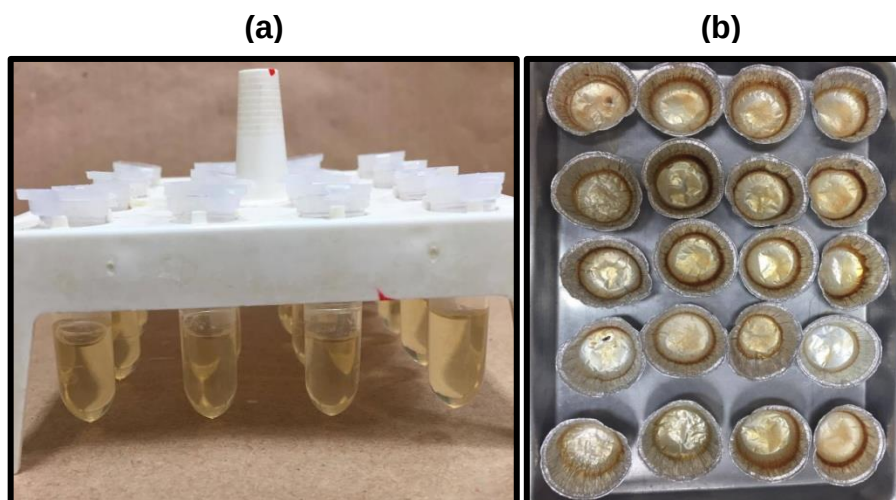
4.3.1. Coleta e tratamento de amostras

As amostras coletadas foram submetidas à análise de massa seca, consumo de substrato, quantificação de compostos beta-lactâmicos e acúmulo de amônio. Além destes parâmetros, foram realizados também monitoramento de secreção de proteínas. Os métodos utilizados estão descritos a seguir.

4.3.2. Concentração Celular

A biomassa é separada do caldo resultante dos cultivos por centrifugação (8°C, 11000 rpm) em centrífuga Eppendorf, Modelo 5810R. A primeira centrifugação do volume conhecido de amostra é feita por 15 minutos, sendo o sobrenadante distribuído em eppendorfs, conforme demonstrado na Figura 4.3 **(a)**, e guardados em ultrafreezer para posteriores análises. A segunda centrifugação é feita com água destilada para lavar as células (10 a 12 min), o sobrenadante é descartado e é feito uma terceira lavagem com água destilada, seguida de mais uma centrifugação (10 a 12 minutos). O sobrenadante é novamente descartado e a suspensão celular resultante da terceira centrifugação segue para a estufa (105°C) por 24 horas em recipientes pré-pesados. A biomassa (Figura 4.3 **b**) é então expressa em gramas de massa seca por litro de meio reacional.

Figura 4.3 Sobrenadante distribuído em eppendorfs para posterior análise **(a)** e biomassa **(b)**



Fonte: Elaboração própria

4.3.3. Concentração de CefC

A concentração de CefC foi determinada por bioensaio de difusão em ágar de acordo com o método descrito por Liras e Martín (2005). Devido a indisponibilidade do padrão de CefC, neste método é utilizado como padrão a Cefalosporina C, devido a semelhança de halos de inibição produzidos por estes antibióticos. Desta forma, a CefC é quantificada de forma indireta e expressa em termos de Cefalosporinas totais (CepC totais, em mg/L).

4.3.3.1 Preparo das placas de bioensaio

Foi utilizado como microrganismo-teste a bactéria *E-coli* ESS 2235 (supersensível aos antibióticos beta-lactâmicos), cultivada em meio ágar nutriente. Preparou-se uma suspensão desta bactéria em solução salina 0,9% com absorbância igual a 1,000 em leitura a 600 nm. Após leitura em espectrofotômetro, adicionou-se a quantidade específica dessa suspensão ao meio ágar nutriente que então foram vertidos em placas de Petri. Após solidificação do meio, poços com 5 mm de diâmetro foram perfurados para que padrões e amostras fossem depositadas nesses orifícios.

4.3.3.2. Preparo das amostras

Para eliminar a Penicilina N que possivelmente existisse na amostra, interferindo assim nos resultados do bioensaio, adicionou-se a proporção de 25 μ L da enzima BD Difco TM Penase[®] já diluída e esperou-se a reação por um período de 20 minutos.

4.3.3.3. Aplicação das amostras, incubação e leitura dos halos.

Foram adicionados ao interior dos poços perfurados 20 μ L de amostra previamente preparada. As placas foram então encubadas a 30°C por 18 horas. Após esse período os diâmetros dos halos de inibição formados (Figura 4.4) foram medidos com paquímetro e foi quantificando assim a concentração de CefC.

Figura 4.4 Halos de inibição medidos para determinação da concentração de CefC.



Fonte: Elaboração própria

4.3.4. Concentração de ácido clavulânico

O AC foi quantificado pelo método espectrofotométrico proposto por Bird et al. (1982). Neste método a amostra é derivatizada com imidazol (60 g/L) por 12 minutos a uma temperatura de 30°C, após esse período a solução é resfriada em recipiente contendo água e gelo. O produto da reação é então determinado através de leitura em espectrofotômetro UV em um comprimento de onda de 312 nm, quantificando assim a concentração de AC.

4.3.5. *Análise de Aminoácidos*

O consumo dos substratos foi monitorado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu LC-20AT). A concentração de maltose foi monitorada utilizando um detector de índice de refração (Modelo RID-10^a/Shimadzu). O método foi isocrático, tendo como fase móvel 100% de ácido acético (10 mmol/L) com fluxo de 0,8 mL/min, adotando-se uma coluna Shim-PackSCR-102H (7,9 mm x 30 cm), em forno a 40°C.

A concentração de aminoácidos (lisina e glutamato) foi determinada utilizando-se uma coluna Shim-Pack AminoNa a 60°C e um detector de índice de refração. Para lisina, a programação da fase móvel consistiu de: borato de sódio 0,05 M (solvente A), NaOH 0,1 M (solvente B), com fluxo constante de 0,6 mL/min utilizando a seguinte condição de eluição para a quantificação: 0-25 min 100% A, 25 – 30 min 100 % de B, 30 – 35 min B, 35 – 40 min 0-100% A e 40-55 min 100% A. Já para o glutamato a programação da fase móvel constituiu-se de: citrato de sódio 0,07 M (solvente A), NaOH 0,1 M (solvente B), com fluxo constante de 0,6 mL/min com a seguinte condição de eluição: 0 – 10 min 100% A, 10 -15 min 100% B, 15 – 25 min 100% B, 25 – 30 min 0 – 100% A e 30 – 50 min 100% A (CAVALLIERI et al., 2016)

4.3.6. *Métodos de análise de determinação de Amônio*

4.3.6.1. Método do fenato

Este método consiste na reação entre amônia com fenato e hipoclorito que, na presença de um catalisador (nitroprussiato de sódio, por exemplo), forma um composto azul denominado indofenol. A tonalidade azul mais escura do indofenol está associada a maiores concentrações amoniacal na amostra (TZOLLAS et al., 2010; AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water & waste water**. 21 st ed. Washington, DC, 2005).

As amostras foram diluídas de acordo com o período da fermentação. Uma alíquota de 1 mL de amostra diluída foi transferida para o tubo de ensaio no qual foram adicionados 40 µL de solução fenol (P 89%) preparada em solvente etanol (95%), 40 µL de nitroprussiato de sódio (0,5% v/v – 50 mg de nitroprussiato de sódio

em 10 mg de água deionizada) e 100 µL de solução oxidativa (composta 2 mL de citrato alcalino e 0,5 mL de hipoclorito de sódio). Os todos foram então cobertos com filme plástico e deixados em ambiente contendo luz difusa, 24°C, por uma hora. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Vis, comprimento de onda de 640 nm). A faixa de leitura para este método é de 0,1 a 1,6 ppm.

4.3.6.2. Eletrodo de íon seletivo (ISE)

Utilizou-se o equipamento multi-parâmetros Orion 5 Star, marca Thermo Scientific. A medição por íon seletivo é uma técnica eletrolítica na qual se utiliza um potenciômetro e um arranjo de dois eletrodos (indicador e referência). Quando os dois eletrodos são imersos em uma solução, uma pequena célula galvânica é formada e a diferença de potencial é medida. A diferença de potencial foi medida em mV. A faixa de leitura para este método é de 1,8 a 1800 ppm.

4.3.7. *Análise de proteínas extracelulares*

Foi utilizado o método proposto por Lowry et al. (1959) e modificado por Hartree (1972) para quantificar as proteínas secretadas no meio de cultivo. Como padrão para esta análise, foi utilizado a soroalbumina bovina. As proteínas totais lidas neste método foram expressas em g/L.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Cultivos em frascos agitados

5.1.1. Experimento C1

Os resultados da Figura 5.1 mostram que houve um aumento evidente da biomassa com o aumento da concentração de glutamato de sódio. Isto ocorreu porque este aminoácido também atua como uma excelente fonte de carbono para o crescimento celular (BRAÑA et al., 1986; DEMAİN; VAISHNAV, 2006). Nos meios contendo as menores concentrações deste aminoácido (meios M-I a M-III), houve um decréscimo da biomassa após o período de 60 horas, uma vez que a maltose e o glutamato já haviam sido totalmente consumidos (Figura 5.2). Observa-se que a velocidade de consumo do glutamato é maior que a de lisina, ou seja, o glutamato foi preferencialmente consumido pelo microrganismo. Dados da literatura têm mostrado que a lisina é consumida primordialmente para a produção de proteínas e bioativos (CAVALLIERI et al., 2016). Entretanto, em combinação com concentrações crescentes de glutamato, observou-se que a lisina foi quase que exclusivamente utilizada para o crescimento celular.

Figura 5.1 Experimento C1- Perfis de concentração celular de cultivos em batelada em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio em mmol/L: M-I (50), M-II (60), M-III (70); M-IV (80), M-V (90) e M-VI (100).

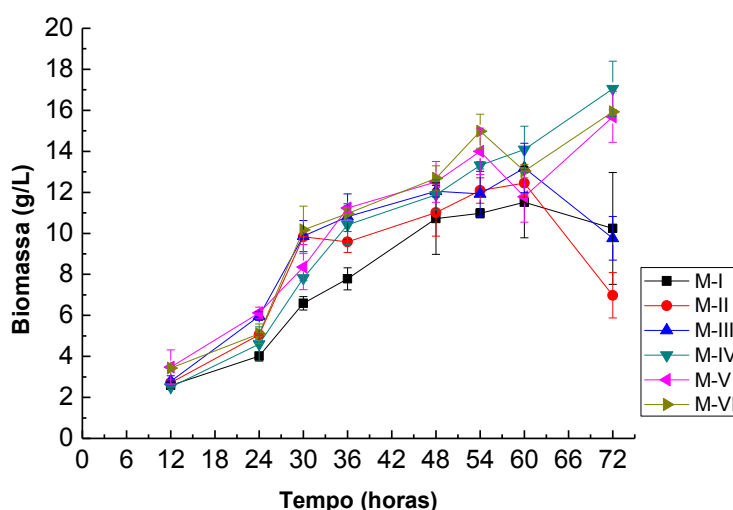
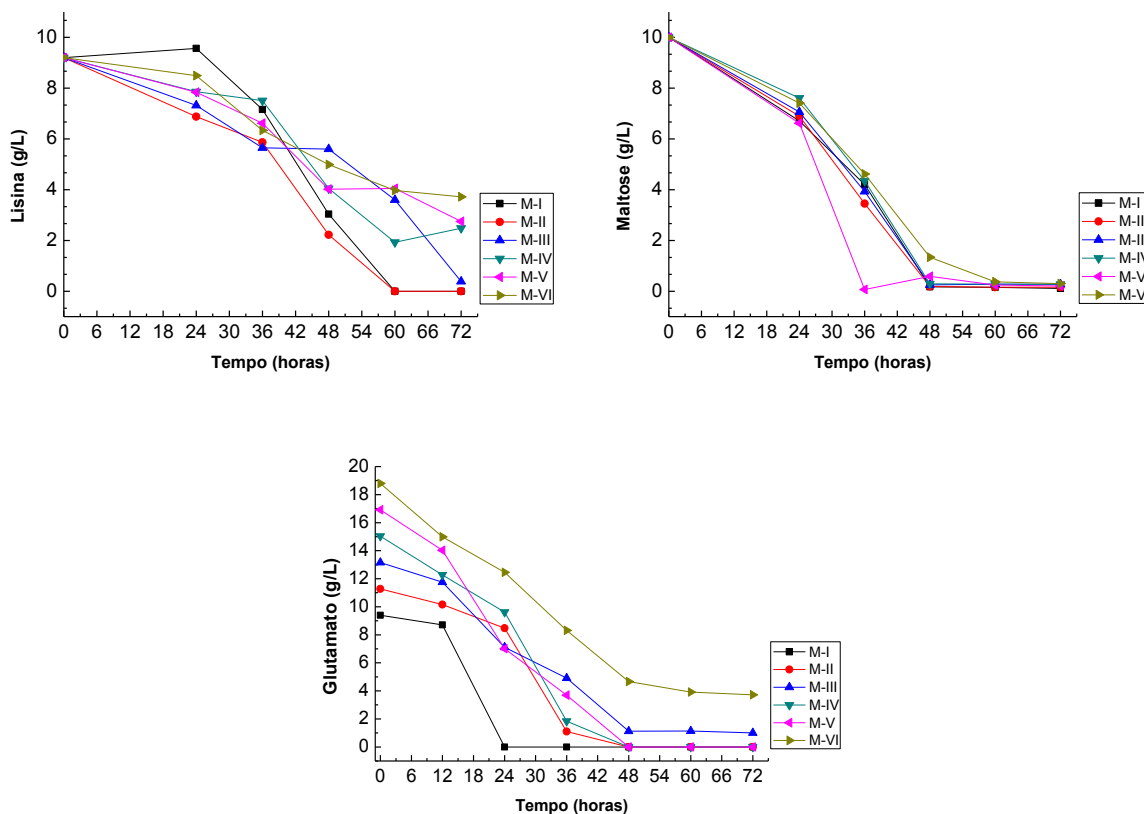
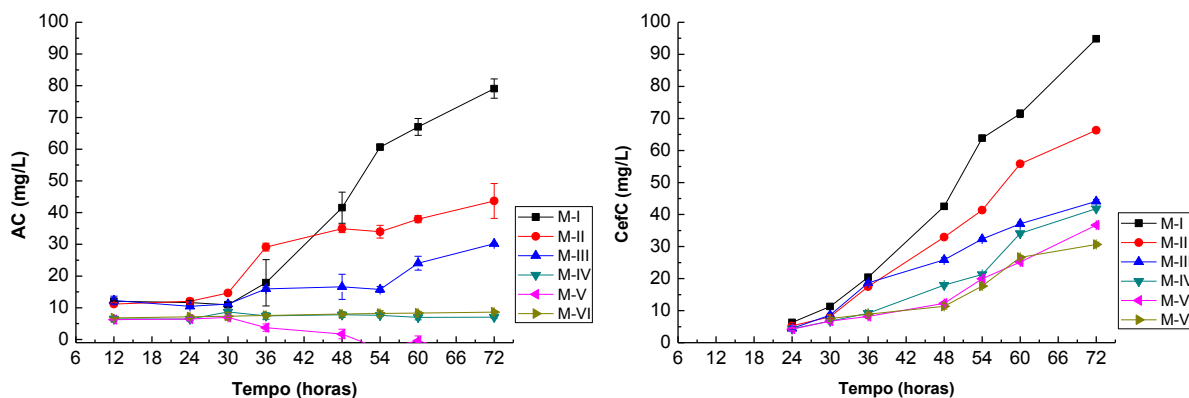


Figura 5.2 Experimento C1- Perfis de concentração de lisina (a), maltose (b) e glutamato de sódio (c) de cultivos em batelada em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio (em mmol/L): M-I (50), M-II (60), M-III (70), M-IV (80), M-I (90) e M-VI (100).



Desta forma, o metabolismo primário foi favorecido pela presença de altas concentrações de glutamato de sódio, o qual se mostrou uma fonte de carbono facilmente metabolizável pelo microrganismo afetando, assim, negativamente a produção de ambos os compostos beta-lactâmicos (AC e CefC). Nos meios em que a lisina foi totalmente consumida (M-I, M-II e M-III), observaram-se as maiores concentrações de bioativos (Figura 5.3). No entanto, pode-se observar a redução de CefC e a total inibição de AC nos meios contendo concentrações iniciais mais altas de glutamato de sódio.

Figura 5.3 Experimento C1- Perfis de concentração de AC (a) e de CefC (b) de cultivos em batelada em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio (em mmol/L): M-I (50), M-II (60), M-III (70), M-IV (80), M-V (90) e M-VI (100).



O acúmulo de amônio durante os cultivos estão apresentados na Figura 5.4. Foram observados valores de amônio da mesma ordem de grandeza utilizando-se o método do fenato e o ISE, ressaltando a eficiência de ambos na análise dos caldos fermentativos, que são matrizes altamente complexas em termos de íons interferentes. Concentrações de amônio entre 20 a 50 mmol/L (350 a 900 ppm) já afetam a biossíntese de compostos beta-lactâmicos (BRANÑA et al., 1986). A menor concentração de amônio (~580 ppm) foi observada no meio M-I, com o qual se obteve a maior concentração de CefC e AC. Nos demais meios (M-II a M-VI), a concentração de amônio não aumentou com a concentração de glutamato de sódio, mantendo-se entre 700 e 800 ppm. Provavelmente essa faixa estreita e aproximadamente constante de amônio esta associada a razão C:N dos meios, mantida constante uma vez que a concentração de C e N da molécula de glutamato mantém-se inalterável. Assim, foram obtidos valores máximos de biomassa também em uma faixa relativamente estreita (entre 11,5 e 14 g/L) até 60 horas de cultivo. A concentração dos biocompostos decresceu gradativamente com o aumento de glutamato no meio, conforme já mencionado. Uma das explicações para este último caso é o valor crescente de pH promovido pelo consumo de concentrações crescentes de glutamato (Figura 5.5), sendo AC mais susceptível em soluções aquosas de pH alcalino (pH > 6,2) do que CefC (BERSANETTI et al., 2005; MERCK AND COMPANY, 1976). Em contrapartida aumento de pH, assim como o de íons amônio, não afetou o crescimento celular.

Figura 5.4 Experimento C1- Perfis de concentração de amônio (medidas pelo método do fenato e por ISE) de cultivos em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio (em mmol/L): M-I (50) (a), M-II (60) (b), M-III (70) (c), M-IV (80) (d), M-V (90) (e), M-VI (100) (f).

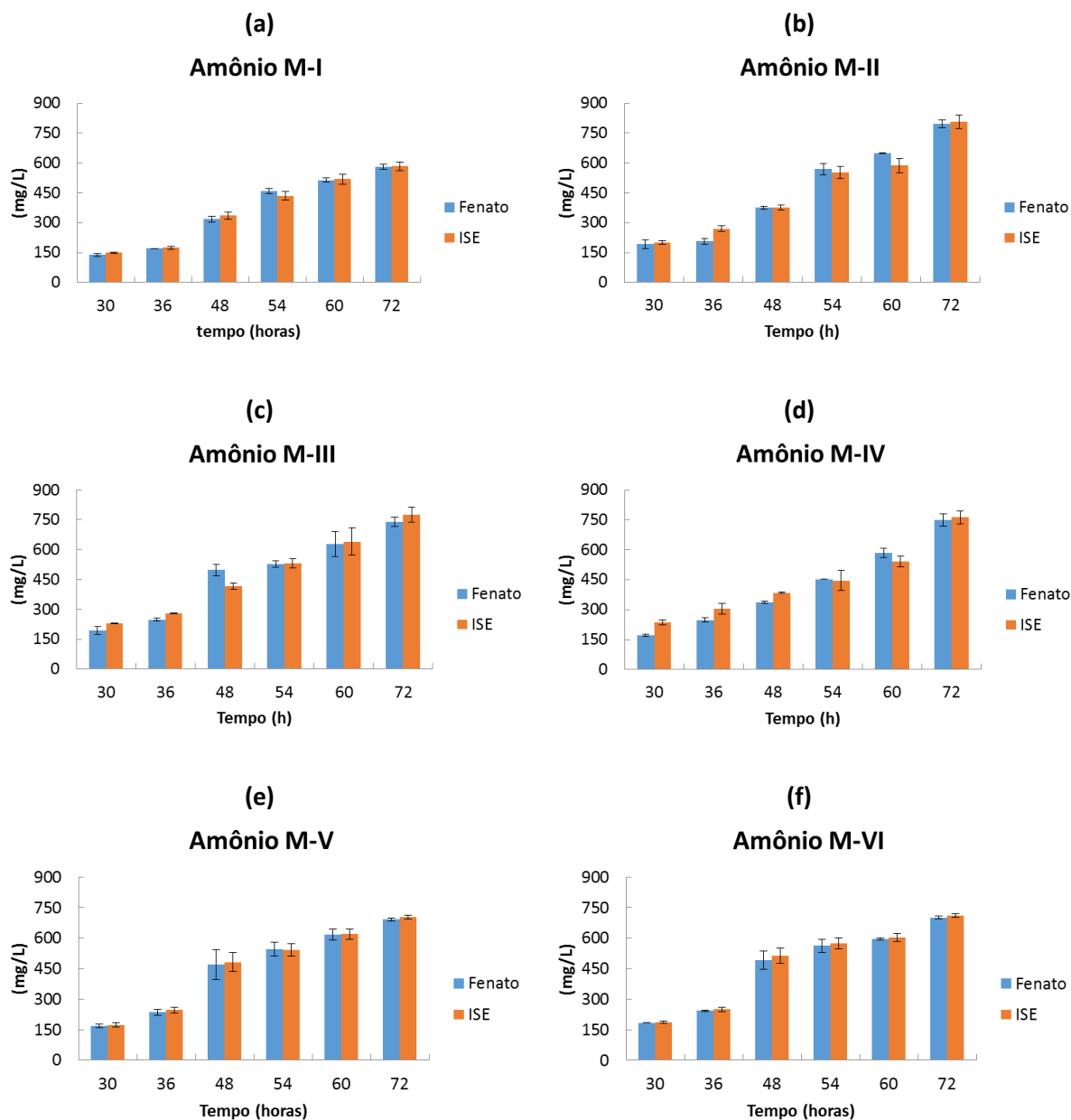
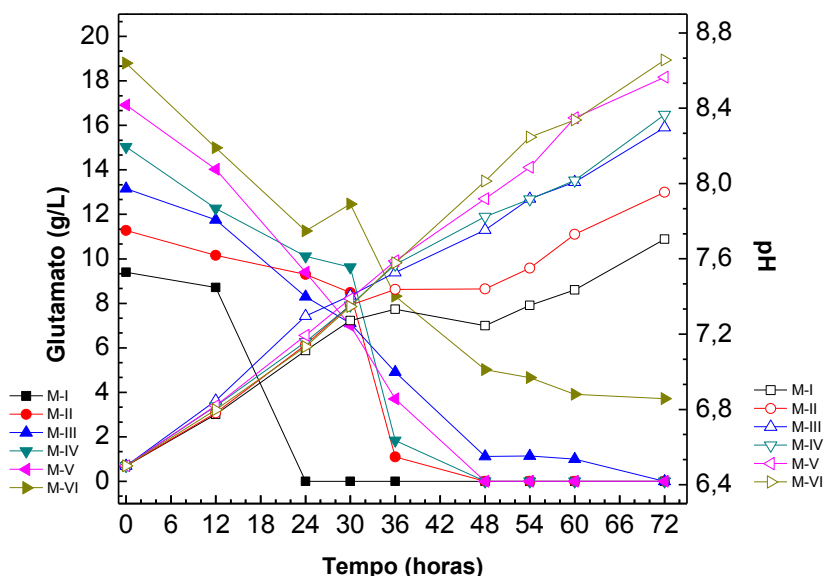


Figura 5.5 Experimento C1 – Perfis de concentração de glutamato e de valores de pH de cultivos em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio (em mmol/L): M-I (50), M-II (60), M-III (70), M-IV (80), M-V (90) e M-VI (100).



5.1.2. Planejamento Experimental 2² com quatro pontos axiais e replicatas no ponto central: lisina e glutamato de sódio

As condições do Experimento P1 e P2 foram estabelecidas conforme metodologia de planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Nestes planejamentos, foram selecionadas faixas de concentração de lisina e de glutamato de sódio de forma a se investigar os efeitos, individuais e combinados, destas variáveis independentes (x_1 = lisina e x_2 = glutamato de sódio) nas produções dos compostos beta-lactâmicos AC e CefC (variáveis resposta).

5.1.2.1. Experimento P1

No Experimento P1 as faixas de concentração dos aminoácidos foram selecionadas com base nos resultados obtidos no Experimento C1. Realizou-se uma triplicata no ponto central e uma duplicata na condição mais utilizada em nosso laboratório (50 mmol/L de lisina e 50 mmol/L de glutamato de sódio). A Tabela 5.1 apresenta os intervalos e os níveis das concentrações dos dois aminoácidos (variáveis independentes) e as concentrações de AC e CefC (variáveis resposta) ao final do cultivo em batelada (72 horas). Foi escolhido este período (72 horas) para

analisar a produção tanto de AC quanto de CefC pois no final do cultivo, observaram-se os máximos valores de CefC e a maior parte das maiores produções de AC. Somente alguns valores máximos de AC já haviam sido atingidos em 48 horas, porém permaneceram aproximadamente constantes até o final do cultivo.

Tabela 5.1 Experimento P1 - planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - Concentrações de lisina e glutamato de sódio (variáveis independentes) e concentrações de AC e CefC (variáveis resposta) produzidas em 72 horas de cultivo em batelada de *S. clavuligerus* em frascos agitados

		Variáveis independentes				Variáveis Resposta (mg/L)	
		Codificadas		Reais (mmol/L)		AC	CefC
Corrida	Condição	Lisina (x_1)	Glutamato (x_2)	Lisina	Glutamato		
1	C-II	-1	-1	50	10	149	71,7
2	C-III	+1	-1	100	10	120	52,0
3	C-I	-1	+1	50	50	70	99,2
4	C-I	-1	+1	50	50	72	101,2
5	C-IV	+1	+1	100	50	6	48,0
6	C-VII	$+\sqrt{2}$	0	110,4	30	52	45,2
7	C-V	$-\sqrt{2}$	0	39,6	30	113	117,8
8	C-VI	0	$-\sqrt{2}$	75	1,7	132	66,9
9	C-VIII	0	$+\sqrt{2}$	75	58,3	6	37,0
10	C-IX	0	0	75	30	82	94,3
11	C-IX	0	0	75	30	89	86,7
12	C-IX	0	0	75	30	94	90,9

Os resultados deste experimento permitiram obter modelos quadráticos para as produções de AC e CefC em função das variáveis lisina e glutamato de sódio. As análises de regressão resultaram na Equação 2 para AC e na Equação 3 para CefC, sendo as variáveis independentes expressas em seus valores codificados e as respostas (concentrações dos biocompostos beta-lactâmicos em 72 horas) expressas em mg/L. Os modelos matemáticos foram ajustados a um grau de confiança de 95% e foram simplificados eliminando-se os termos estatisticamente não significativos.

$$C_{AC} = 88,35(\pm 2,88) - 22,87(\pm 1,69) x_1 - 45,9(\pm 1,69) x_2 - 6,8(\pm 2,08) x_2^2 - 9,71(\pm 2,29) x_1 x_2$$

Equação (2)

$$C_{CefC} = 90,64(\pm 1,86) - 22,34(\pm 1,09) x_1 - 18,75(\pm 1,34) x_2^2 - 8,68(\pm 1,48) x_1 x_2$$

Equação (3)

De acordo com as análises de variância (ANOVA) resultantes dos processos de regressão quadrática (Tabela 5.2), os modelos explicam bem o comportamento dos cultivos, pois como pode se observar os valores de p são bem inferiores ao nível de significância considerado (5%) e os valores de F calculados para os modelos são maiores os F tabelados, sendo que para o AC $F_{calculado}$ (109,53) é aproximadamente vinte e sete vezes maior que o $F_{tabelado}$ (4,7; 0,05) (4,12) enquanto que a CefC o $F_{calculado}$ (25,84) é aproximadamente seis vezes maior que o $F_{tabelado}$ (3,8; 0,05) (4,07).

Tabela 5.2 Experimento P1 - Análises de variância (ANOVA) a 95% de nível de confiança, para regressão dos modelos quadráticos* das produções (em 72 horas) de AC **(a)** e CefC **(b)**.

(a)

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F_{modelo}	$F_{tabelado}$	P
Regressão	21932,47	4	5483,12	109,53	4,12	$2,17 \times 10^{-6}$
Resíduos	350,45	7	50,06			
Total	22282,92	11	2025,72			

*Coeficiente de determinação $R^2=0,98427$, SQ: Soma dos quadrados, GL: Grau de liberdade, MQ: Média dos quadrados.

(b)

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F_{modelo}	$F_{tabelado}$	P
Regressão	6812,14	3	2270,71	25,84	4,07	0,0002
Resíduos	703,11	8	87,89			
Total	7515,25	11	683,20			

*Coeficiente de determinação $R^2=0,9064$, SQ: Soma dos quadrados, GL: Grau de liberdade, MQ: Média dos quadrados.

Pelas equações 2 e 3, pode-se observar que os valores das médias de produção de AC e CefC, e também os parâmetros referentes aos efeitos linear de

lisina e conjugados dos dois aminoácidos sobre os bioativos são da mesma ordem de grandeza. As superfícies de resposta representativas dos modelos quadráticos estão apresentadas nas Figuras 5.6 e 5.7.

Figura 5.6 Experimento P1 - Produção de AC em 72 horas: superfície de resposta (modelo quadrático ajustado a 95% de grau de confiança; coeficiente de determinação $R^2 = 0,98427$) **(a)**, Diagrama de Pareto **(b)** e gráfico de valores observados *versus* valores previstos pelo modelo **(c)**.

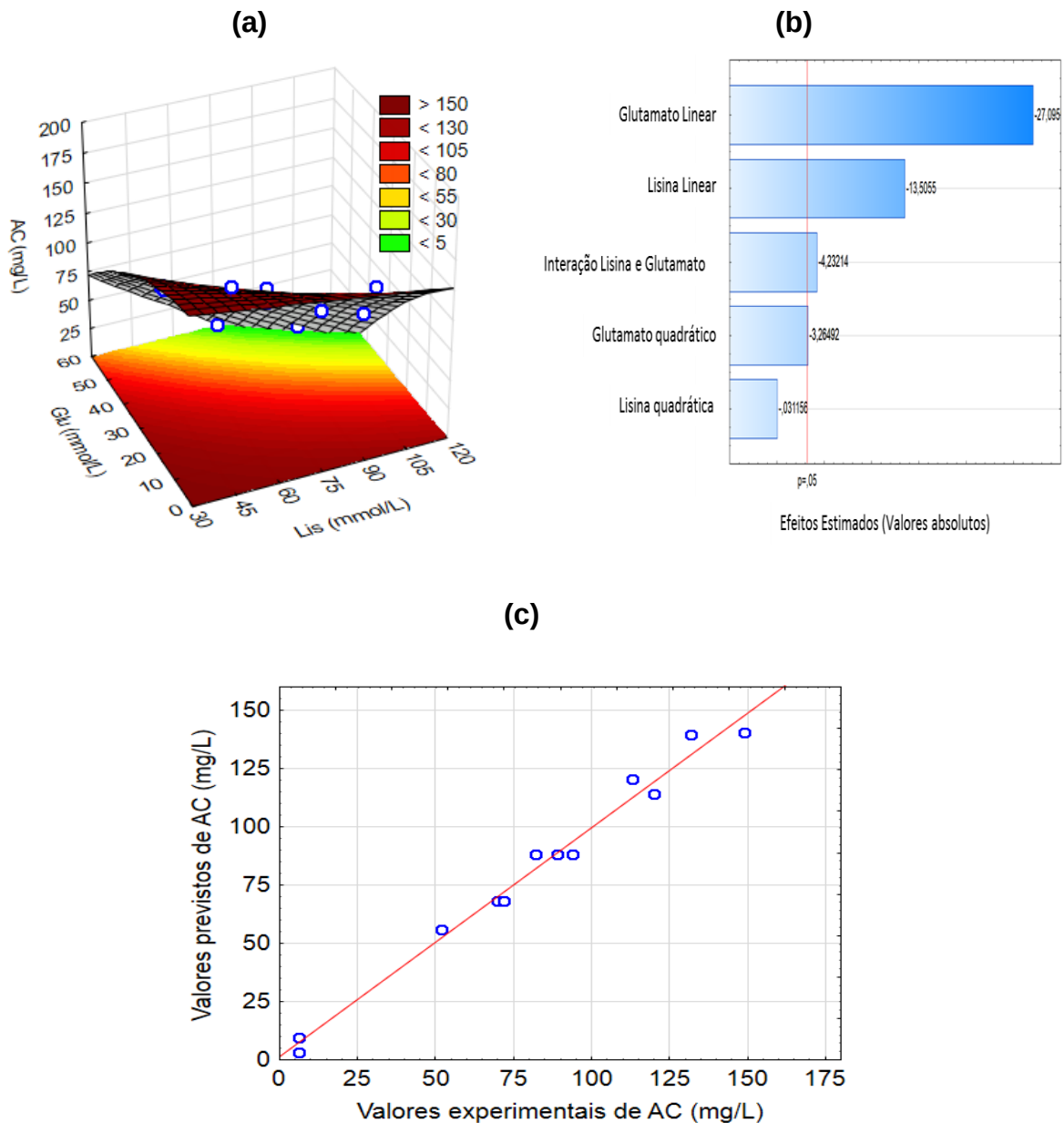
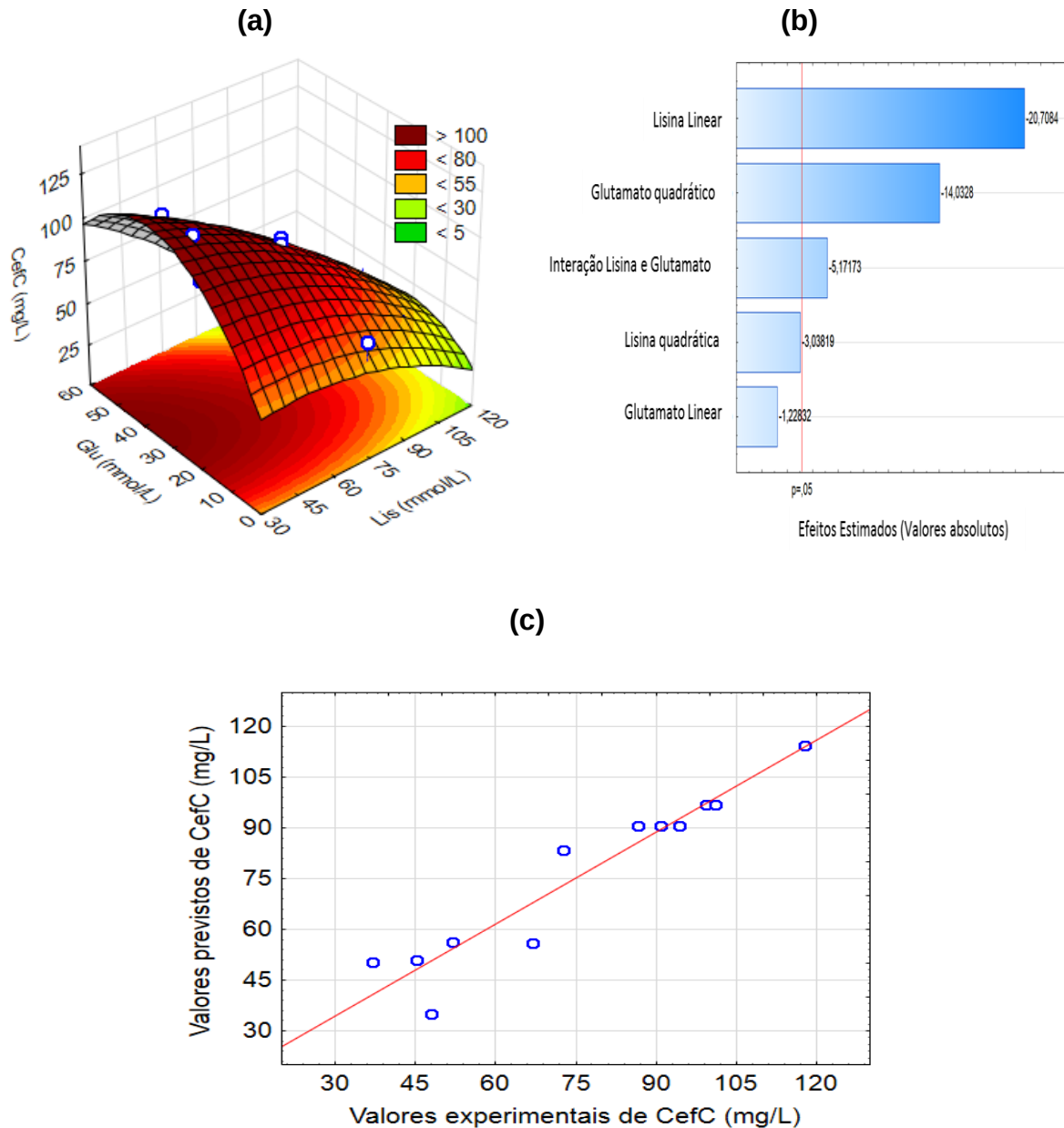
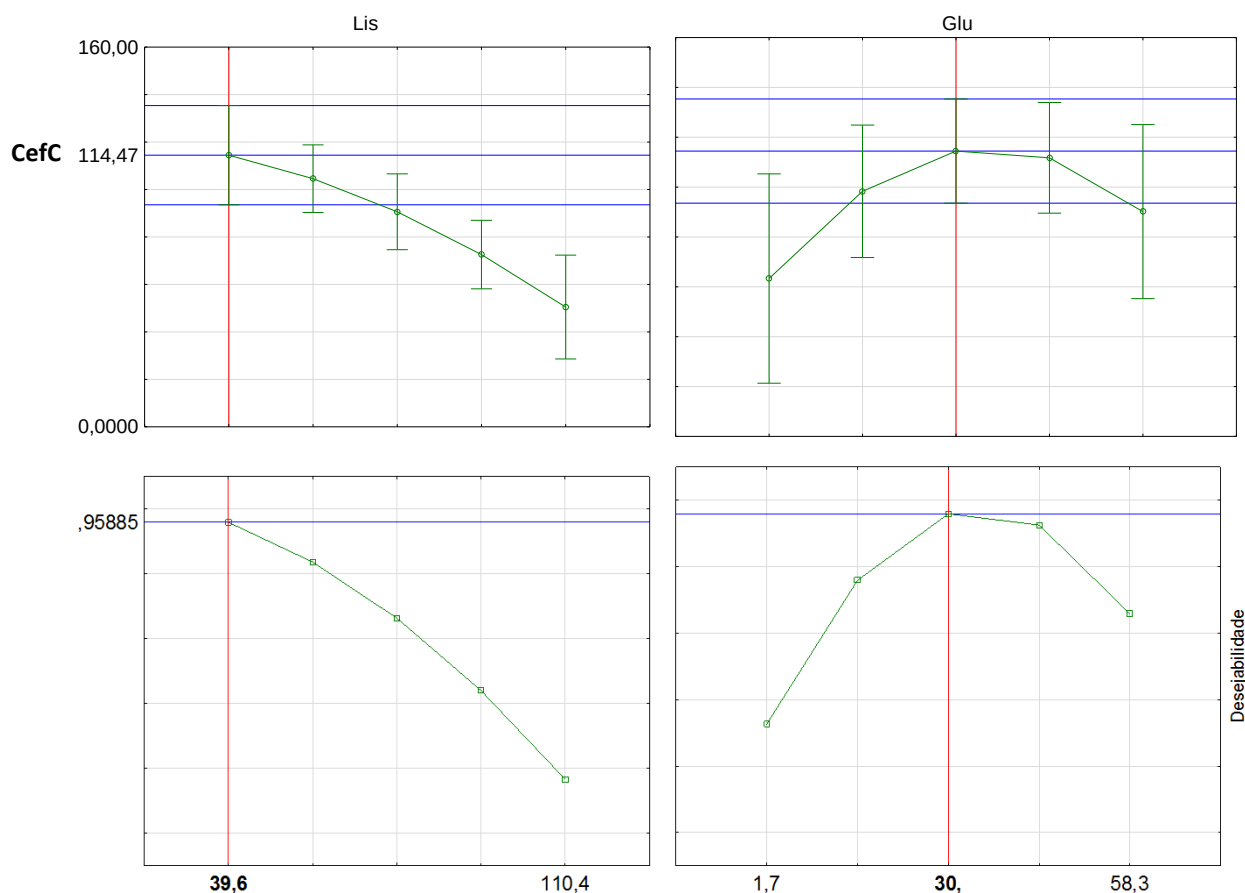


Figura 5.7 Experimento P1 - Produção de CefC em 72 horas: superfície de resposta (modelo quadrático ajustado a 95% de grau de confiança; coeficiente de determinação $R^2 = 0,9064$) **(a)**, Diagrama de Pareto **(b)** e gráfico de valores observados *versus* valores previstos pelo modelo **(c)**



Cultivos em batelada em biorreator convencional (Volume 5L) realizados anteriormente em nossos laboratórios utilizando-se maltose (10 g/L) como principal fonte de carbono e energia e lisina (40 mmol/L) como única fonte de nitrogênio, em um pH $6,8 \pm 0,1$, resultaram em concentrações máximas médias entre 80 e 100 mg/L para ambos, AC e CefC (CAVALLIERI et al., 2016). No presente experimento, realizado em frascos agitados, foram obtidas concentrações máximas maiores, cerca

de 150 mg/L de AC e 120 mg/L de CefC, porém em concentrações distintas de lisina e glutamato. Assim, segundo os resultados do presente experimento, não existe uma combinação teórica possível destes aminoácidos que permita a obtenção concomitante dos valores máximos dos biocompostos. Um valor teórico máximo de 155 mg/L de AC é previsto pelo modelo eliminando-se o glutamato do meio e utilizando uma concentração de lisina um pouco abaixo da mínima investigada (cerca de 39 mmol/L). Entretanto estudos já comprovaram a incorporação de átomos de carbono do glutamato de sódio na molécula de AC e, desde então vários pesquisadores têm demonstrado que a presença de glutamato em meios de cultivo de *S. clavuligerus* em concentrações de nitrogênio limitante, apresenta efeito positivo na produção do biocomposto (IVES; BUSHELL, 1996; PARADKAR et al., 2013). Com relação à CefC, o modelo indica que o máximo valor teórico (cerca de 125 mg/L) poderia ser obtido eliminando-se lisina do meio e utilizando-se uma concentração de glutamato de sódio em torno de 45 mmol/L. Porém, vários trabalhos têm enfatizado que a utilização da lisina em concentrações acima de 50 mmol/L é responsável por aumentos consideráveis na produção deste bioativos em meios de cultivo de *S. clavuligerus* (FANG et al., 1996; LEITE et al., 2013). Apesar de não ser possível a obtenção das máximas concentrações dos bioativos estudados, a condição C-V (39,6 mmol/L de lisina e 30 mmol/L de glutamato) apresentou resultados interessantes, já que tornou possível se obter uma concentração considerável de ambos os biocompostos de interesse, 113 mg/L de AC e 117,8 mg/L de CefC. Segundo o gráfico de perfis para valores previstos e desejabilidade seria possível obter-se uma concentração de 114,46 mg/L de CefC (Figura 5.8), e uma concentração de AC de 120,8 mg/L (este resultado foi obtido substituindo as variáveis x_1 = lisina e x_2 = glutamato de sódio em seus valores codificados, ou seja, $-\sqrt{2}$ e 0, respectivamente na Equação 2), justamente na condição específica de interesse (C-V). Portanto com o intuito de validar experimentalmente o modelo e comprovar os resultados obtidos, uma triplicata desta condição foi realizada. Os resultados das triplicatas estão apresentados na Tabela 5.3

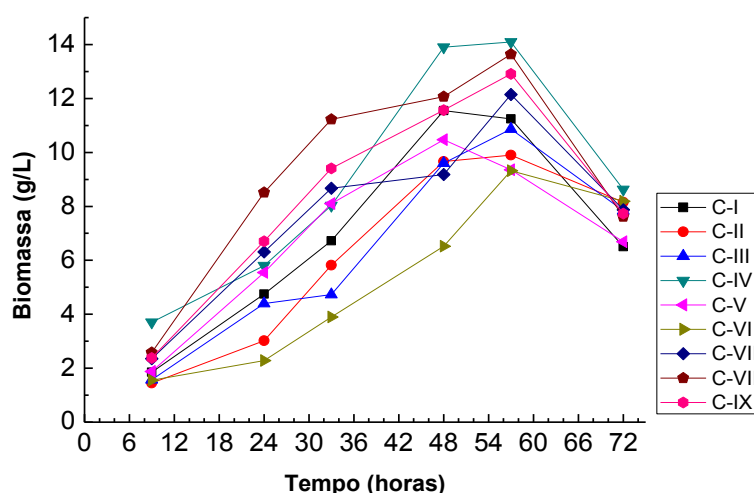
Figura 5.8 Experimento P1- Gráfico de perfis para valor ótimo de CefC.**Tabela 5.3** Experimento P1- Triplicata da condição C-V (39,6 mmol/L de Lisina e 30 mmol/L de glutamato de sódio) do planejamento experimental do tipo Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), realizada a fim de validar modelo experimental.

	CefC (mg/L)	AC (mg/L)
T-I	134,45	111,78
T-II	123,41	113,74
T-III	129,6	107,2
Média	129,15	110,91
Valor ótimo	114,46	120,8
Desvio	7,35	4,95

Com esses resultados, o modelo foi comprovado experimentalmente com um desvio médio de 7,35 para a CefC e 4,95 para o AC. Ou seja, pode-se afirmar que o modelo se adequou aos resultados obtidos experimentalmente.

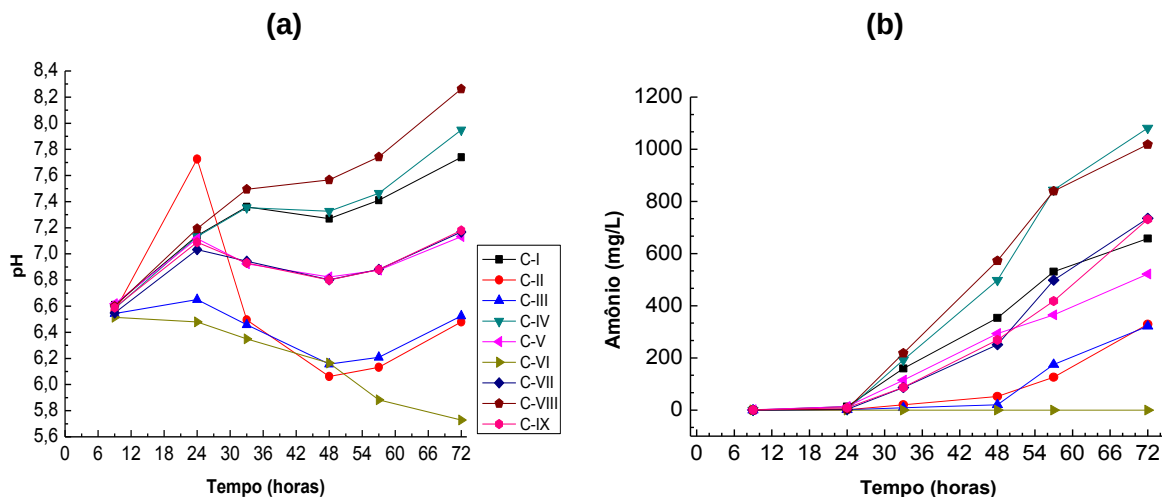
Todas as combinações dos aminoácidos testadas, associadas a um valor de pH inicial adequado ao desenvolvimento celular (pH = 6,5), favoreceram a obtenção de concentrações celulares máximas de 9 a 14 g/L, entre 48 e 57 horas. Este ótimo crescimento pode ser atribuído as maiores concentrações de glutamato (30 a 58,3 mmol/L). Também se pode observar que a associação de médias a altas concentrações de lisina (75 mmol/L a 110 mmol/L) e de glutamato (30 mmol/L a 58,3 mmol/L) possivelmente fez com que a lisina fosse utilizada para o favorecimento do metabolismo primário, uma vez, que foram essas condições que resultaram os mais altos valores de biomassa. A partir de 57 horas, houve um acentuado decréscimo de biomassa em todas as condições (Figura 5.9).

Figura 5.9 Experimento P1 (*design* experimental DCCR) – Perfis de concentração celular de cultivos em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato): C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30).



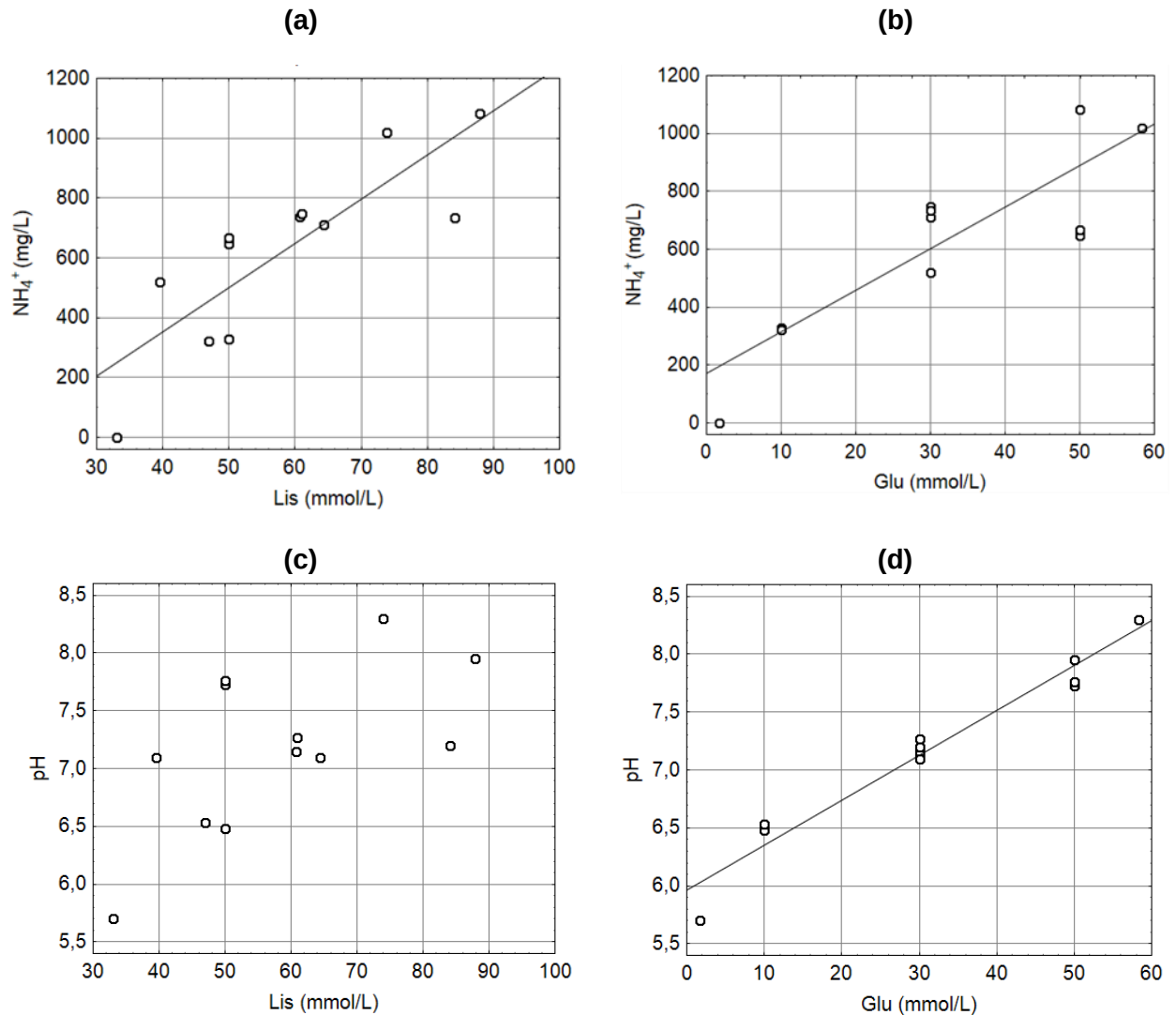
Foram monitorados também os valores de pH, variável esta que não é controlada em cultivos realizados em frascos agitados (Figura 5.10 a), e concentração de amônio no meio de cultura (Figura 5.10 b). Foi observado que as condições contendo as maiores concentrações de aminoácidos (lisina e glutamato de sódio) foram as condições com os maiores valores pH e de amônio finais. Estas condições resultaram em menores concentrações dos bioativos, principalmente o AC, e altos valores de biomassa. Isso indica que os bioativos são susceptíveis a maiores valores de pH e acúmulo de amônio enquanto que a biomassa apresenta uma boa correlação com estes.

Figura 5.10 Experimento P1- (*design* experimental DCCR) – Perfis dos valores de pH **(a)**; Perfis de concentração de amônio **(b)** de cultivos em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato): C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30).



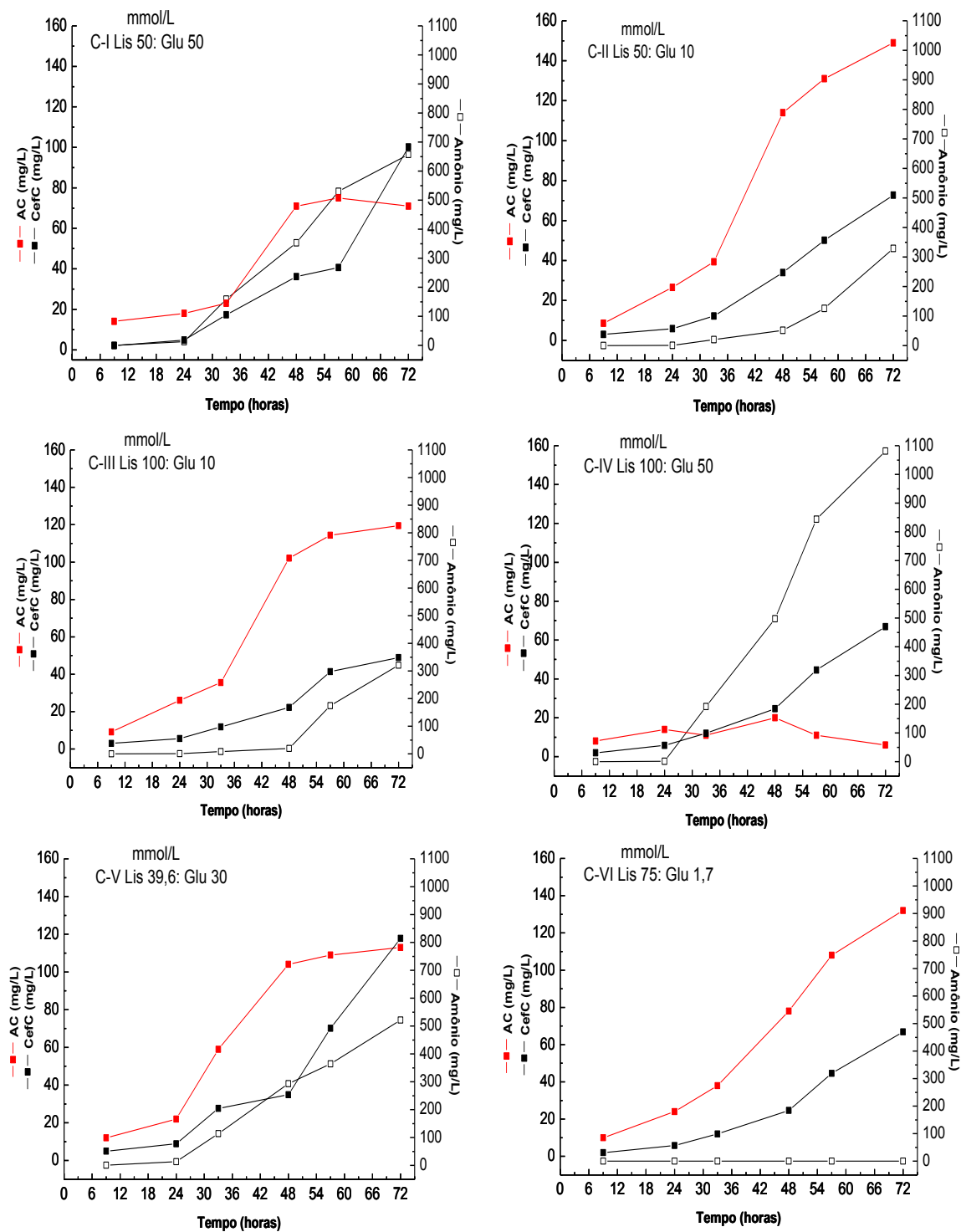
Foram apresentados as relações entre os valores máximos de amônio e de pH com consumo de lisina e glutamato (Figura 5.11). Pode-se observar que há uma boa correlação entre o consumo de ambas as fontes de nitrogênio e o acúmulo de amônio, ou seja, o consumo de lisina e glutamato acarreta um aumento da concentração de amônio. Já em relação aos valores de pH, o aumento de pH apresenta uma relação linear apenas com o aminoácido glutamato de sódio, ou seja, o consumo deste aminoácido apenas, esta diretamente relacionado com o aumento do pH.

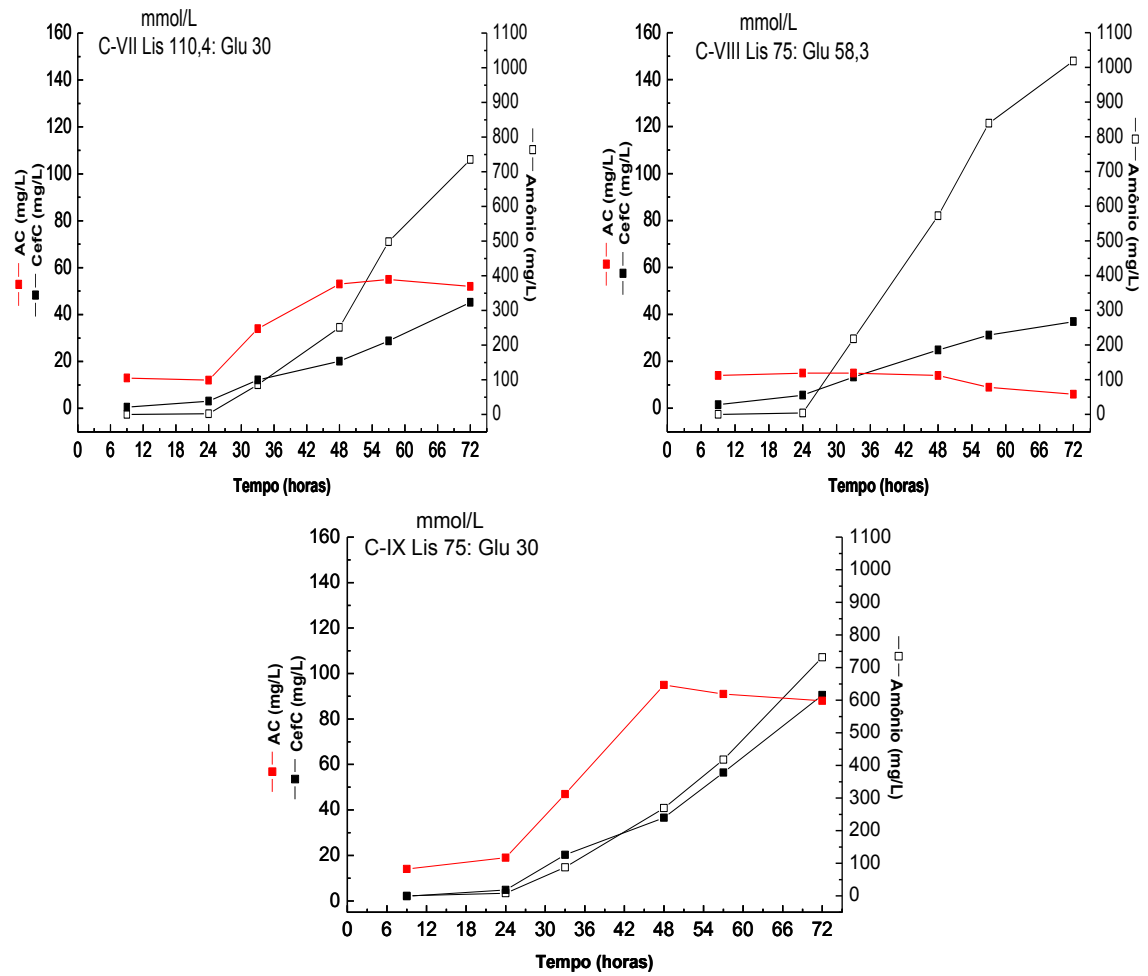
Figura 5.11 Experimento P1 (*desing experimental DCCR*) – Relação, no período de 72 horas de cultivo, entre valores máximos de amônio e consumo de lisina **(a)** e glutamato de sódio **(b)**; e relação entre valores máximos de pH e consumo de lisina **(c)** e glutamato de sódio **(d)**, em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato): C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30).



O efeito do acúmulo de amônio nas produções de AC e CefC é apresentado na Figura 5.12.

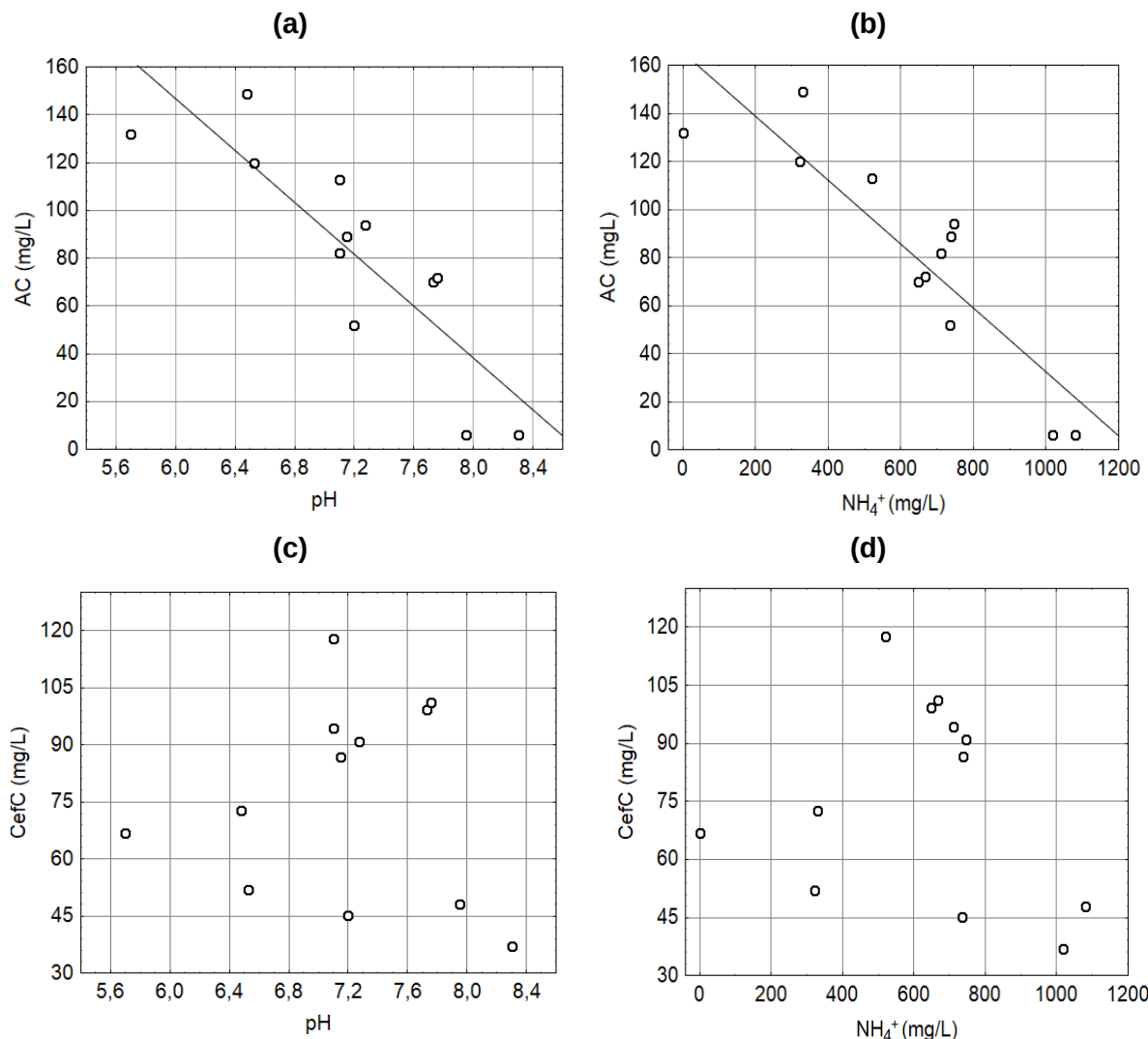
Figura 5.12. Experimento P1 (*design* experimental DCCR) – Perfil de concentração de amônio e de concentrações de AC e de CefC obtidas em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato) C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30).





O cenário geral dos efeitos de pH e amônio nas produções de AC e CefC obtidas em 72 horas em todas as condições de lisina e glutamato pode ser melhor visualizado na Figura 5.13.

Figura 5.13 Experimento P1 (*design* experimental DCCR) – Relação, no período de 72 horas de cultivo, entre AC e pH **(a)**; AC e amônio **(b)**; CefC e pH **(c)** e CefC e amônio **(d)**, em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato) C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30).



A produção de AC foi afetada em concentrações de amônio acima de 500 mg/L e as maiores concentrações do biocomposto foram obtidas em $\text{pH} < 6,6$. Como mencionado, AC é instável em soluções aquosas de $\text{pH} > 6,2$, tornando-se ainda mais susceptível à degradação quando se encontra em caldos de cultivo, devido à presença de substâncias como, por exemplo, o amônio resultante do metabolismo microbiano (BERSANETTI et al., 2005).

A produção de CefC não apresentou padrões de comportamento em relação ao pH. Foram observados baixos valores de concentração do bioativo em toda a faixa de concentrações de amônio e os maiores valores de CefC entre 500 e 700

mg/L do íon. Na literatura são encontrados muitos dados referentes aos efeitos negativos de altas concentrações de amônio na produção de compostos beta-lactâmicos (ROMERO et al. 1984, DEMAÏN; VAISHNAV, 2006).

5.1.2.2. Experimento P2

As condições do Experimento P2 foram estabelecidas a partir dos resultados obtidos pelo Experimento P1, elaborando-se, assim, mais um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Neste planejamento, foram realizadas quatro replicatas no ponto central. As novas faixas de lisina e glutamato de sódio utilizadas foram selecionadas na tentativa de diminuir os valores finais de pH e amônio que, como tem sido observado no presente trabalho e na literatura disponível, são fatores relevantes na produção dos compostos beta-lactâmicos AC e CefC.

A Tabela 5.4 apresenta as faixas de concentrações selecionadas para as variáveis independentes (x_1 = lisina e x_2 = glutamato de sódio) e concentrações de AC e de CefC (variáveis resposta) no final do cultivo em batelada (72 horas), período em que foram observados na maioria das condições estudadas, as maiores concentrações de AC e CefC.

Tabela 5.4 Experimento P2 - planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - Concentrações de lisina e glutamato de sódio (variáveis independentes) e concentrações de AC e CefC (variáveis resposta) produzidas em 72 horas de cultivo em batelada de *S. clavuligerus* em frascos agitados

Corrida	Condição	Variáveis independentes				Variáveis Resposta (mg/L)	
		Codificadas		Reais (mmol/L)		AC	CefC
		Lisina (x ₁)	Glutamato (x ₂)	Lisina	Glutamato		
1	C-I	-1	-1	19,6	6	149,7	80,4
2	C-II	-1	+1	19,6	30	126,7	85,9
3	C-III	+1	-1	39,6	6	156,7	88,4
4	C-IV	+1	+1	39,6	30	113,4	122,5
5	C-V	0	0	29,6	18	137,7	72,8
6	C-V	0	0	29,6	18	130,5	68,6
7	C-V	0	0	29,6	18	134,6	68,6
8	C-V	0	0	29,6	18	134	68,9
9	C-VI	$-\sqrt{2}$	0	15,5	18	105,5	56,2
10	C-VII	$+\sqrt{2}$	0	43,7	18	146,6	140,51
11	C-VIII	0	$-\sqrt{2}$	29,6	1	124,1	105
12	C-IX	0	$+\sqrt{2}$	29,6	35	60,6	193,2

As superfícies de resposta representativas dos modelos quadráticos ajustados a 95% de grau de confiança para AC e CefC estão representadas nas Figuras 3 e 4 respectivamente. Para o AC a superfície de resposta apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,7 e para CefC um coeficiente de determinação (R^2) de 0,8. Apesar dos coeficientes de determinação inferiores aos do Experimento P1, foi possível se observar as tendências das produções obtidas experimentalmente, a partir das superfícies de resposta.

Em relação ao AC, de acordo com o diagrama de Pareto, foi possível observar que para o nível de significância considerado (5%), apenas o parâmetro da lisina quadrática não foi significativo para o modelo matemático, sendo que o único efeito positivo na produção do biocomposto foi a lisina linear, indicando assim, que para estas faixas de aminoácidos estudadas no Experimento P2 apenas a adição deste aminoácido aumenta a produção de AC (Figura 5.14). Já para a CefC todos os parâmetros foram significativos sendo o parâmetro quadrático para o glutamato o mais evidente, seguido de valores semelhantes entre glutamato linear e lisina linear

(Figura 5.14). Isto indica que ambos os aminoácidos causaram efeito positivo, ao aumento das concentrações de CefC, tanto isoladamente como em combinação.

Figura 5.14 Experimento P2- Produção de AC em 72 horas: superfície de resposta (modelo quadrático ajustado a 95 % de grau de confiança; coeficiente de determinação $R^2= 0,7$) **(a)**, Diagrama de Pareto **(b)** e gráfico de valores observados *versus* valores previstos pelo modelo **(c)**.

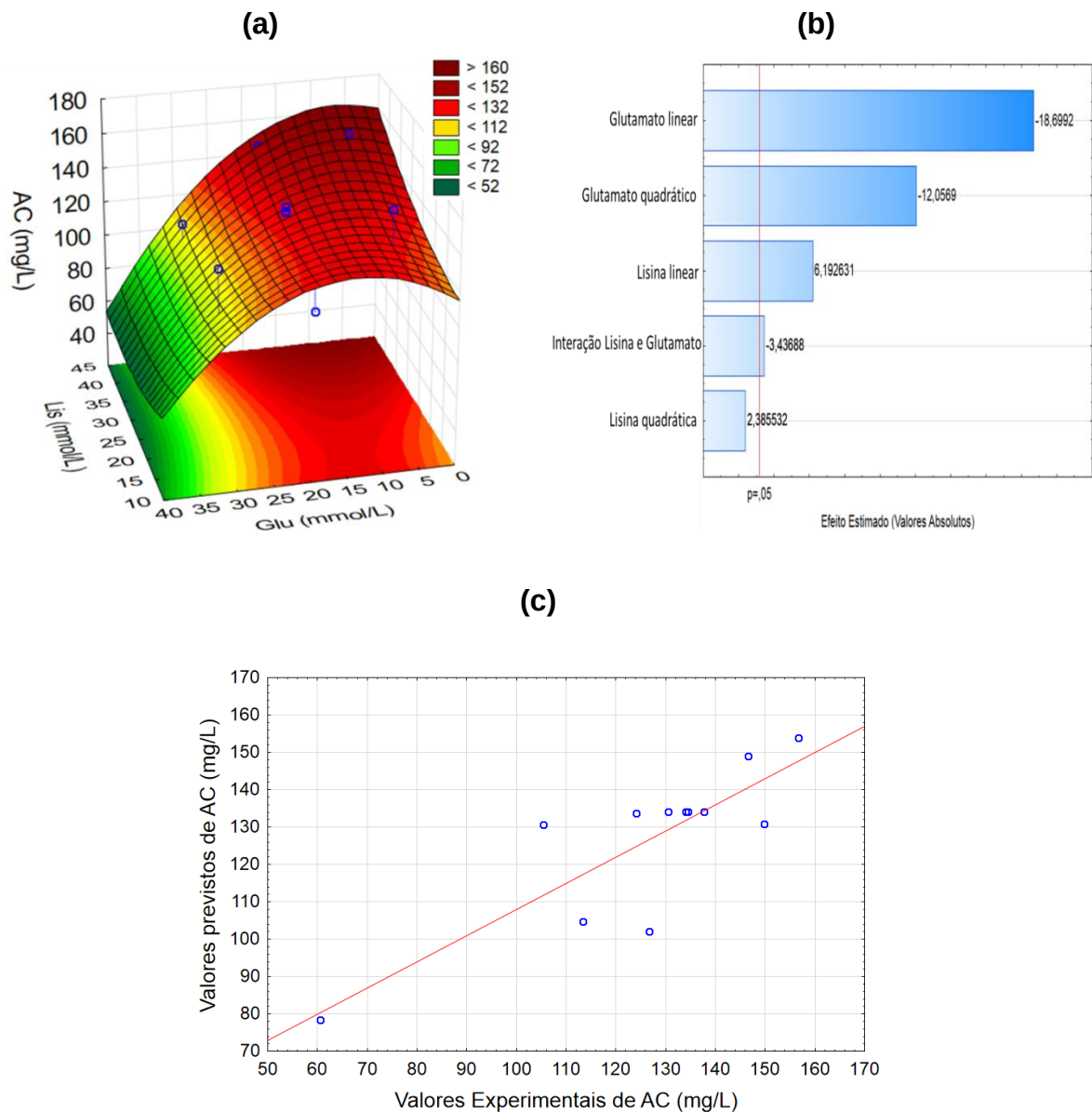
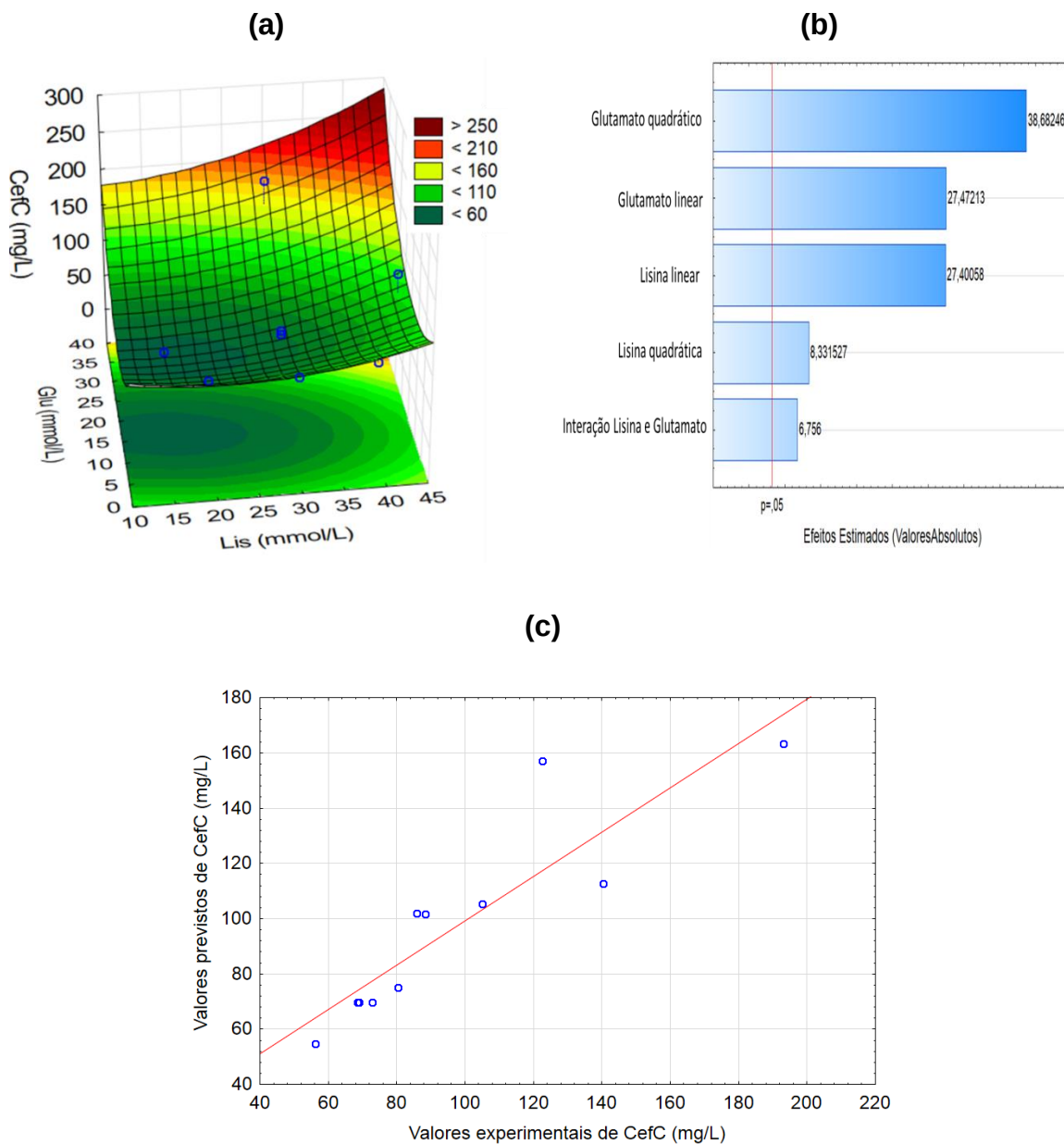


Figura 5.15 Experimento P2- Produção de CefC em 72 horas: superfície de resposta (modelo quadrático ajustado a 95 % de grau de confiança; coeficiente de determinação $R^2=0,8$) **(a)**, Diagrama de Pareto **(b)** e gráfico de valores observados *versus* valores previstos pelo modelo **(c)**.



As análises de regressão resultaram na Equação 4 para AC e na Equação 5 para CefC, sendo as variáveis independentes expressas em seus valores codificados e as respostas (concentrações dos bioativos em 72 horas) expressas em mg/L. Os modelos matemáticos foram ajustados a um grau de confiança de 95% e foram simplificados eliminando-se os termos estatisticamente não significativos.

$$C_{AC} = 134,2 (\pm 1,47) + 6,46 (\pm 1,04) x_1 - 19,52 (\pm 1,04) x_2 - 14,07 (\pm 1,17) x_2^2 - 5,07 (\pm 1,47) x_1 x_2$$

Equação (4)

$$C_{CefC} = 69,72 (\pm 1,06) + 20,48 (\pm 0,75) x_1 + 20,54 (\pm 0,75) x_2 + 6,96 (0,84) x_1^2 + 32,33 (\pm 0,84) x_2^2 - 7,14 (\pm 1,06) x_1 x_2$$

Equação (5)

De acordo com as análises de variância (ANOVA) pode-se concluir que os modelos matemáticos propostos para as produções de AC e CefC se ajustaram razoavelmente aos dados experimentais, pois como pode se observar os valores de p dos modelos são inferiores ao nível de significância considerado (5%) e os valores de F calculados para os modelos são maiores os F tabelado. Para o AC $F_{\text{calculado}} = 5,84 > F_{\text{tabelado}} (4,7; 0,05) = 4,12$ enquanto que para a CefC o $F_{\text{calculado}} 4,88 > F_{\text{tabelado}} (3,8; 0,05) = 4,39$ (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 Experimento P2 - Análises de variância (ANOVA) a 95% de nível de confiança, para regressão dos modelos quadráticos* das produções (em 72 horas) de AC **(a)** e CefC **(b)**.

(a)

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F_{modelo}	F_{tabelado}	p
Regressão	4963,97	4	1771,29	5,84	4,12	0,021
Resíduos	2121,198	7	303,03			
Total	7085,168	11	644,11			

*Coeficiente de determinação $R^2=0,7$, SQ: Soma dos quadrados, GL: Grau de liberdade, MQ: Média dos quadrados.

(b)

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{modelo}	F _{tabelado}	p
Regressão	13626,25	5	2725,25	4,88	4,39	0,037
Resíduos	3347,9	6	557,98			
Total	16974,15	11	1543,1			

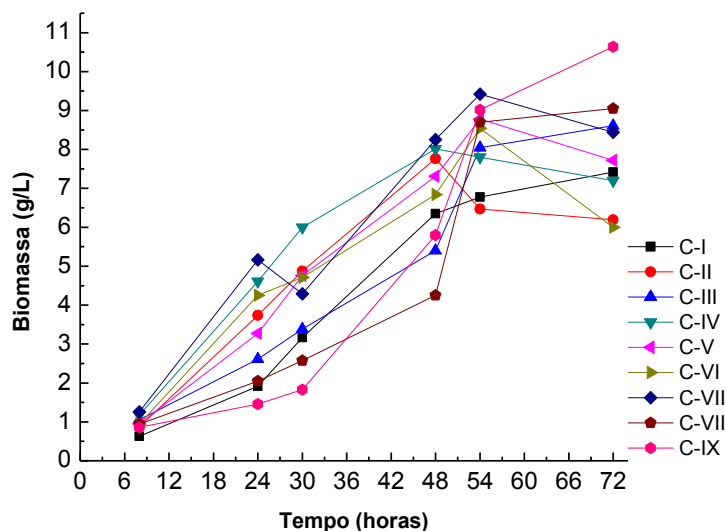
*Coeficiente de determinação $R^2=0,8$, SQ: Soma dos quadrados, GL: Grau de liberdade, MQ: Média dos quadrados.

O modelo matemático indicou um valor teórico máximo de 160,76 mg/L de AC com a adição 43,74 mmol/L de lisina e 9,51 mmol/L de glutamato de sódio. Uma produção de AC de 156,7 mg/L, próxima ao valor teórico máximo previsto pelo modelo, foi obtida na condição C-III, utilizando 39,6 mmol/L de lisina e 6 mmol/L de glutamato. Estes valores de concentração dos aminoácidos são concordantes com a literatura, na qual tem sido demonstrado que a utilização da lisina em uma faixa de 30 a 100 mmol/L, juntamente com fontes de carbono adequadas para o crescimento como maltose ou o glicerol, favorece a obtenção de aumentos de produção de AC (CAVALLIERI et al., 2016). Romero et al. (1986), observaram que a presença de glutamato afeta negativamente a formação de AC, apesar da constatação de átomos de carbono deste aminoácido serem incorporados à molécula do bioativo, conforme mencionado (ELSON et al., 1982; IVES; BUSHELL, 1996). No presente trabalho, foi observado que a presença de glutamato em concentrações bem baixas, em torno de 6 mmol/L, foi mais positiva para a produção do biocomposto do que a sua ausência no meio de cultura. Já para CefC a produção máxima prevista pelo modelo, foi de 220,6 mg/L utilizando-se 43,74 mmol/L de lisina e 34,97 mmol/L de glutamato. Uma produção de 193,2 mg/L foi obtida na condição C-IX, na qual, foram utilizados 29,6 mmol/L de lisina e 35 mmol/L de glutamato. Como visto anteriormente o efeito positivo da lisina exógena na produção de CefC por *S. clavuligerus* foi enfatizado por vários autores. Mendelovitz e Aharonowitz (1982) foram pioneiros nesta descoberta, equanto Fang et al. (1996) também observaram aumentos de 50-100% na produção do antibiótico com a adição de lisina em concentrações de 10- 20 mmol/L. Romero et al. (1984) constataram que a presença de altas concentrações de glutamato exerce um efeito inibitório na produção de CefC. Entretanto neste trabalho, a

associação de glutamato com lisina nas condições de maiores concentrações destes aminoácidos, dentro das faixas estudadas, resultaram em boas produções de CefC (máximo de 193,2 mg/L). O conjunto de dados obtido neste trabalho permite concluir que, em quaisquer faixas de concentração de glutamato e lisina, não é possível obter simultaneamente máximas produções de ambos os bioativos, pois a produção máxima de cada um destes é obtida em combinações distintas de concentrações dos aminoácidos estudados. Ainda assim, pode-se destacar os resultados relevantes de produção dos dois biocompostos obtidos na condição C-VII do Experimento P2 (146,6 mg/L de AC e 140,51 mg/L de CefC) que superaram as produções obtidas na condição C-V do Experimento P1 (113 mg/L de AC e 117,8 mg/L de CefC). Portanto a condição C-VII do Experimento P2 foi escolhida para ser reproduzida em biorreator, cujos resultados serão apresentados mais adiante.

As melhores produções finais dos bioativos do Experimento P2 quando comparadas com aquelas obtidas no Experimento P1 podem ser justificadas pelas novas faixas utilizadas de concentrações dos aminoácidos. Demain e Vaishnav (2006) comprovaram que maiores produções de compostos beta-lactâmicos ocorrem em condições subótimas de crescimento. Ao se comparar as concentrações celulares obtidas nos dois planejamentos (Experimento P1 e Experimento P2), observou-se que a limitação das fontes de nitrogênio de algumas condições do Experimento P2 conduziu a menores valores máximos de biomassa. Enquanto, estes valores ficaram na faixa de 7,5 a 10,5 g/L entre 48 e 54 horas, no Experimento P1 foram obtidos valores máximos de biomassa entre 9 e 14 g/L, entre 48 e 57 horas. O menor crescimento contribuiu para obtenção de maiores produções dos bioativos comparativamente ao Experimento P1. Após 54 horas, na maioria das condições do Experimento P2 houve um decréscimo da biomassa, sinalizando a morte celular (Figura 5.16).

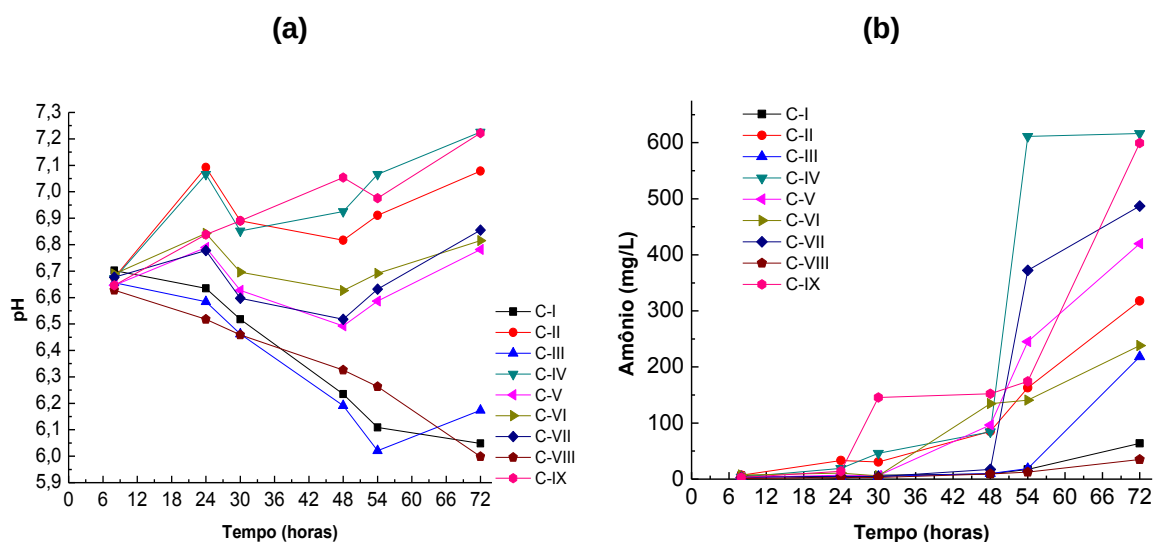
Figura 5.16 Experimento P2 (desing experimental DCCR) – Perfis de concentração celular de cultivos em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L): C-I (19,6: 6), C-II (19,6 : 30), C-III (39,6 : 6), C-IV (39,6 : 30), C-V (29,6 : 18), C-VI (15,5 : 18), C-VII (43,7 : 18), C-VIII (29,6 : 1), C-IX (29,6 : 35).



Outros fatores importantes que podem justificar as maiores produções obtidas dos compostos beta-lactâmicos foram os valores finais de pH e amônio (Figura 5.17 **a** e **b**, respectivamente) que também foram menores no Experimento P2 com relação ao experimento P1. Estudos têm demonstrado que grande parte dos compostos beta-lactâmicos é mais estável em soluções com valores de pH próximos da neutralidade. A molécula de AC é altamente instável em valores de pH inferiores a 5 e superiores a 7, sendo a máxima estabilidade atingida em valores de pH próximos a 6,2 (ALMEIDA et al., 2003; BERSANETTI et al., 2005). A molécula de CefC apresenta suas melhores produções em valores de pH entre 6 e 8 (MERCK AND COMPANY, 1977). Quanto ao amônio, há vários estudos na literatura demonstrando seu efeito negativo na produção dos compostos beta-lactâmicos (AHARONOWITZ, 1980; ROUBOS, 2002; OZCENGIZ; DEMAIN, 2013). Nota-se que as condições com as maiores concentrações de ambos os aminoácidos apresentaram os maiores valores finais de pH e amônio. O consumo das fontes de nitrogênio acarreta liberação de amônio para o meio de cultivo. Romero et al. (1984) observaram que meios contendo altas concentrações de glutamato pareciam exercer um maior efeito inibidor na síntese de CefC do que na de AC, porém, como o aumento nos valores de pH está diretamente relacionado com o consumo de glutamato, neste trabalho obteve-se menor produção de AC em meios contendo maiores concentrações de glutamato do que o antibiótico CefC. Provavelmente,

houve uma maior degradação de AC nestes meios (BERSANETTI et al., 2005) do que de CefC, de forma que a produção de AC foi mais prejudicada.

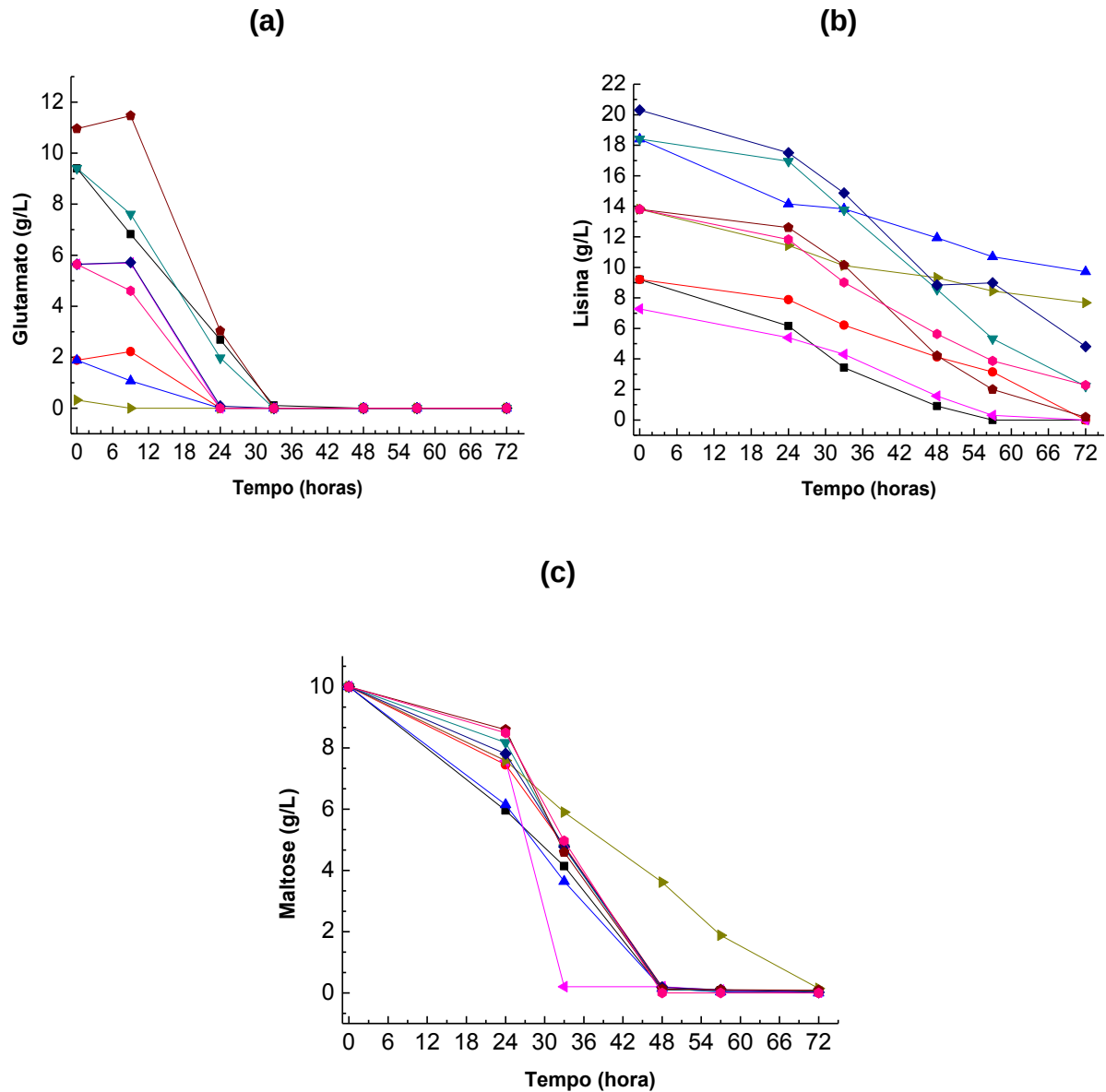
Figura 5.17 Experimento P2 (desing experimental DCCR) – Perfis dos valores de pH **(a)** e concentrações finais de amônio **(b)** de cultivos em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L): C-I (19,6 : 6), C-II (19,6 : 30), C-III (39,6 : 6), C-IV (39,6 : 30), C-V (29,6 : 18), C-VI (15,5 : 18), C-VII (43,7 : 18), C-VIII (29,6 : 1), C-IX (29,6 : 35).



As análises de substratos de ambos os planejamentos (Experimento P1 e Experimento P2) demonstraram uma tendência no consumo dos substratos. Glutamato de sódio foi consumido mais rapidamente pelo microrganismo do que maltose ou lisina, esgotando-se no período entre 24 e 36 horas. Em seguida, o *S. clavuligerus* consumiu maltose, em uma taxa menor, e por último lisina foi consumida bem mais lentamente do que os outros dois nutrientes analisados (Figura 5.18). A literatura relata que fontes de carbono e de nitrogênio de lenta assimilação (como por exemplo, a lisina) favorecem a produção de metabólitos secundários (DREW; DEMAIN, 1977; OMSTEAD et al., 1985; BELLÃO, 2010). No metabolismo primário, a lisina é transaminada a alfa cetoglutarato gerando duas moléculas de glutamato. Desta forma, a adição de glutamato no meio poderia suprir a demanda de nitrogênio do catabolismo permitindo que a lisina fosse utilizada no metabolismo secundário para produção de ambos compostos beta-lactâmicos (MADDURI et al., 1989). Oliveira (2009) observou que a utilização de meios contendo maltose, como principal fonte de carbono, quando comparados a meios contendo glicerol, apresenta um menor rendimento de biomassa, porém em meios no qual a maltose é

associada ao glutamato de sódio há um favorecimento do crescimento celular, em detrimento das produções dos compostos beta-lactâmicos AC e CefC.

Figura 5.18 Perfis de consumo de glutamato de sódio **(a)**, lisina **(b)** e maltose **(c)**.



A tabela 5.6 descreve a comparação entre os planejamentos experimentais Experimento P1 e Experimento P2, de acordo com as faixas das variáveis independentes (x_1 = Lisina e x_2 = Glutamato de sódio) e as concentrações finais das variáveis resposta (AC e CefC).

Tabela 5.6 Comparação entre os planejamentos experimentais Experimento P1 e Experimento P2.

		Experimento P1					Experimento P2				
Codificadas		Legenda	Reais (mmol/L)		mg/L		Legenda	Reais (mmol/L)		mg/L	
Lis	Glu	Cond.	Lis	Glu	AC	CefC	Cond.	Lis	Glu	AC	CefC
-1	-1	C-II	50	10	149	71,7	C-I	19,6	6	149,7	80,4
-1	+1	C-I	50	50	71	100,2	C-II	19,6	30	126,7	85,9
+1	-1	C-III	100	10	120	52	C-III	39,6	6	156,7	88,4
+1	+1	C-IV	100	50	6	48	C-IV	39,6	30	113,4	122,5
0	0	C-IX	75	30	88,3	90,6	C-V	29,6	18	134,2	65,6
-√2	0	C-V	39,6	30	113	117,8	C-VI	15,5	18	105,5	56,2
+√2	0	C-VII	110,4	30	52	45,2	C-VII	43,7	18	146,6	140,5
0	-√2	C-VI	75	1,7	132	66,9	C-VIII	29,6	1	124,1	105
0	+√2	C-VIII	75	58,3	6	37	C-IX	29,6	35	60,6	193,2

A condição C-V (39,6 mmol/L de lisina e 30 mmol/L de glutamato de sódio) do Experimento P1 foi repetida no Experimento P2. Observou-se que foram obtidas concentrações finais dos bioativos em valores da mesma ordem de grandeza, validando esta condição do Experimento P1. Foi possível perceber um aumento significativo nas produções finais dos compostos beta-lactâmicos no Experimento P2, isto porque as novas faixas de aminoácidos utilizadas, neste experimento, limitaram o nitrogênio diminuindo assim as máximas concentrações finais da biomassa e íons amônio, além de resultarem em menores valores de pH. Com isso, a condição C-VII (43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato) do Experimento P2 se destacou com produções consideráveis de ambos os bioativos (146,6 mg/L de AC e 140,5 mg/L de CefC) e foi escolhida para ser reproduzida em biorreator de bancada.

5.2. Cultivo em batelada realizado em biorreator

5.2.1. Experimento B1

O cultivo em biorreator foi realizado com o intuito de, além de validar o resultado em frascos agitados, aumentar a produção dos compostos beta-lactâmicos de interesse, pois este equipamento permite controlar a temperatura, (também controlada em frascos agitados), a concentração de oxigênio dissolvido no meio, por

meio da agitação automática da agitação, e o pH que, como já salientado neste trabalho, é uma variável chave para a obtenção de maiores concentrações dos bioativos estudados, principalmente o AC.

O perfil do crescimento celular está representado na Figura 5.19. Nas condições do cultivo a concentração celular atingiu um máximo de 5,5 g/L em 57 horas de cultivo, com um pequeno decréscimo após esse período. Na Figura 5.20 são comparados os crescimentos celulares dos experimentos realizados em biorreator (Experimento B1) e em frasco agitado (condição C-VII do Experimento P2). Como era de esperar a velocidade de crescimento foi a mesma, embora a biomassa máxima obtida no biorreator tenha sido cerca de 58% menor. Ambos os resultados de biomassa foram satisfatórios, salientando-se, porém que o crescimento celular exacerbado pode afetar negativamente o metabolismo secundário (DEMAIN; VAISHNAV, 2006). De fato, como será discutido adiante a produção específica em biorreator foi maior para ambos os biocompostos, que a resultante em frasco agitado.

Figura 5.19 Experimento B1- Perfil de crescimento celular de cultivo realizado em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio.

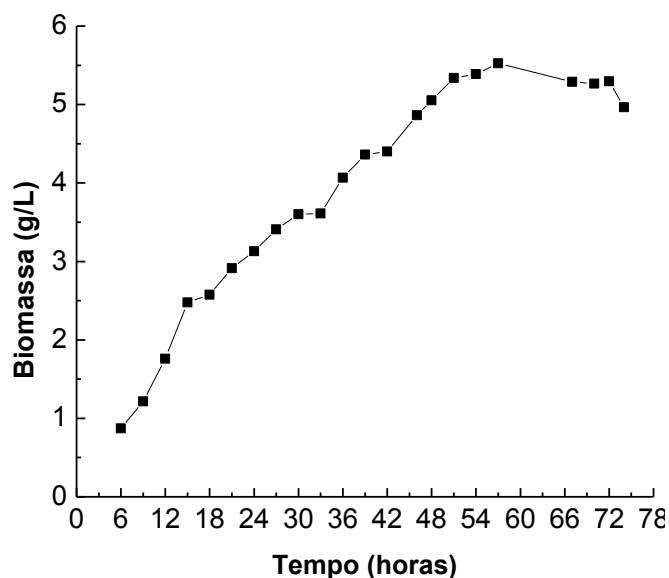
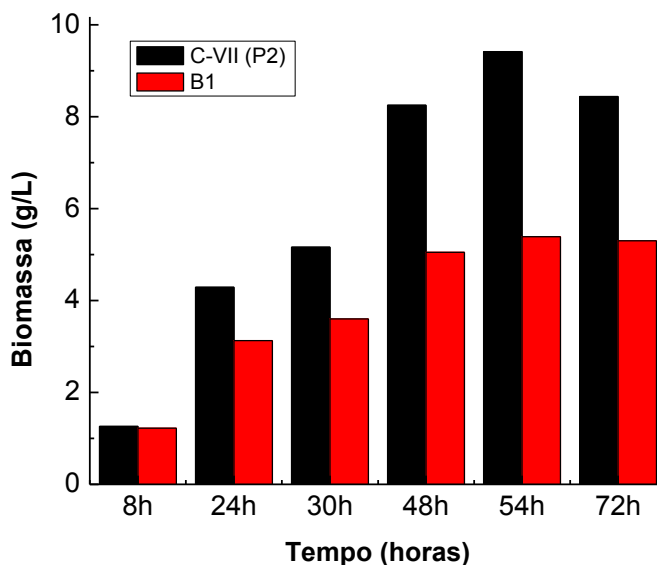
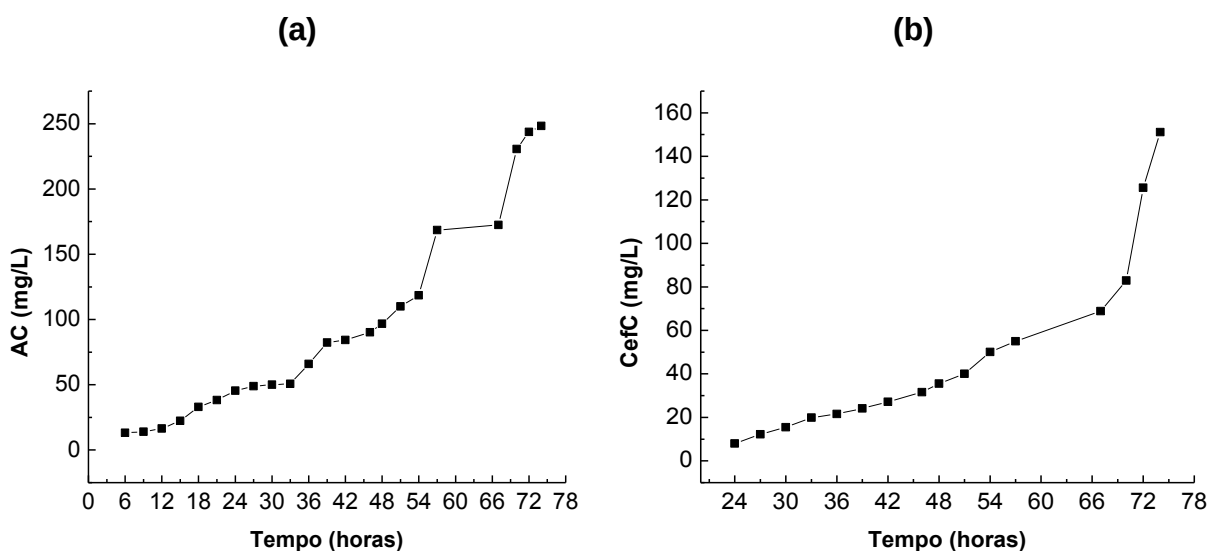


Figura 5.20 Experimento B1- Comparação entre biomassas obtidas em cultivo realizado em frascos agitados (C-VII (P2)) e em biorreator de bancada (B1), utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio.



Os perfis de produções dos bioativos AC e CefC estão apresentados na Figura 5.21.

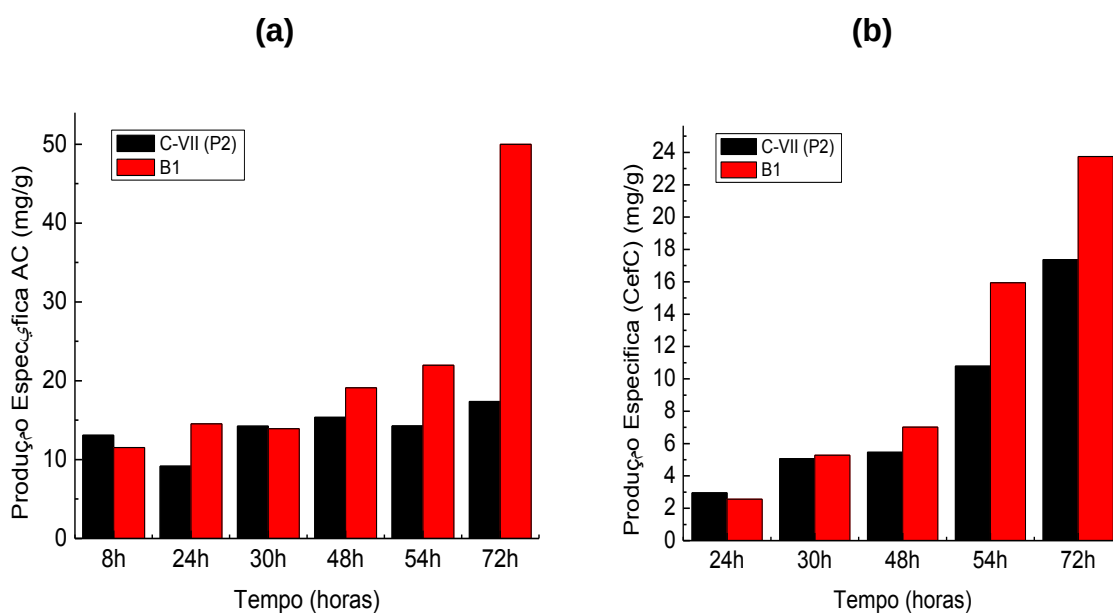
Figura 5.21 Experimento B1- Perfis de produções de AC (a) e CefC (b) de cultivo realizado em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio.



Os dados de produção específica apresentados na Figura 5.22 indicam que os valores para AC e CefC no final do cultivo, foram respectivamente, cerca de

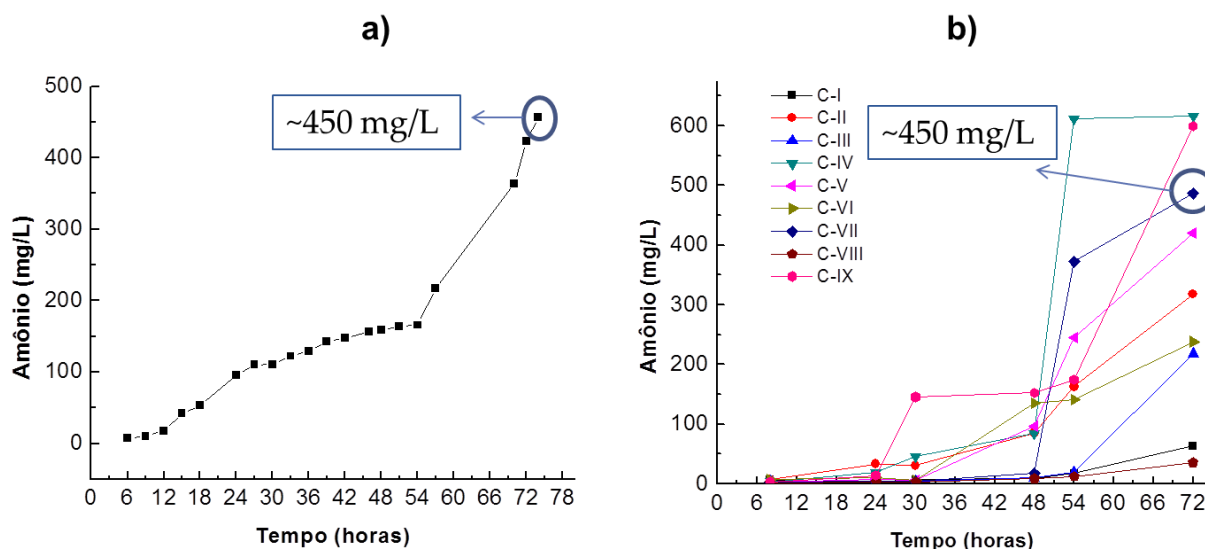
200% e 40% maiores no processo em biorreator. Esses resultados positivos podem ser atribuídos, principalmente, à manutenção do pH 6,5 reforçando a importância desta variável para obtenção de aumentos significativos nas produções dos bioativos.

Figura 5.22 Experimento B1- Comparação entre as produções específicas de AC **(a)** e CefC **(b)** de cultivo realizado em frascos agitados e em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio.



Por último, foi realizada a análise da concentração de amônio do cultivo realizado em biorreator (Figura 5.23). Os valores finais de amônio foram bastante semelhantes aos do cultivo realizado em frascos agitados em condições de meio de cultura equivalentes, uma vez que o acúmulo de amônio resulta do consumo das fontes de nitrogênio, ou seja, mais precisamente do catabolismo proteico (ROMERO, 1984; COSTA, 2014).

Figura 5.23 Experimento B1 – Comparação entre as concentrações de amônio de cultivo realizado em biorreator de bancada **(a)** e em frascos agitados **(b)** utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio.

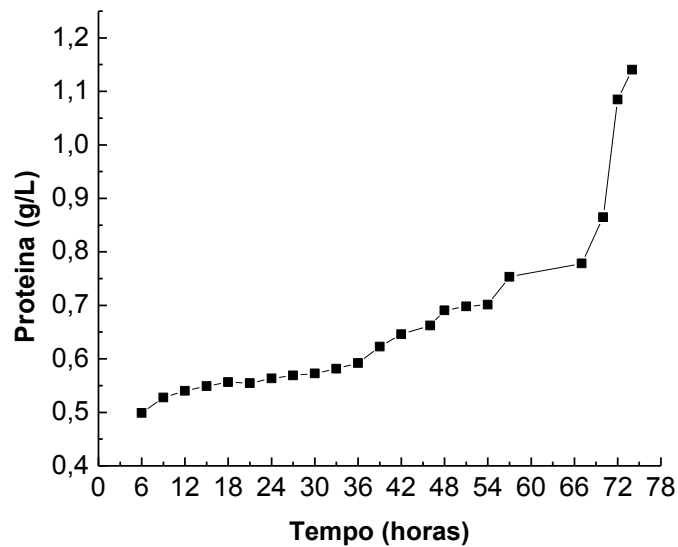


5.2.2. *Balanço de massa do Nitrogênio*

Com os resultados provenientes do cultivo realizado em biorreator de bancada, elaborou-se um balanço de massa do nitrogênio com o intuito de comparar a porcentagem do nitrogênio proveniente do amônio acumulado com o nitrogênio total produzido. Para isto, além das análises que foram também realizadas para os cultivos em frascos agitados, foram quantificadas as proteínas excretadas do cultivo realizado em biorreator (Figura 5.24).

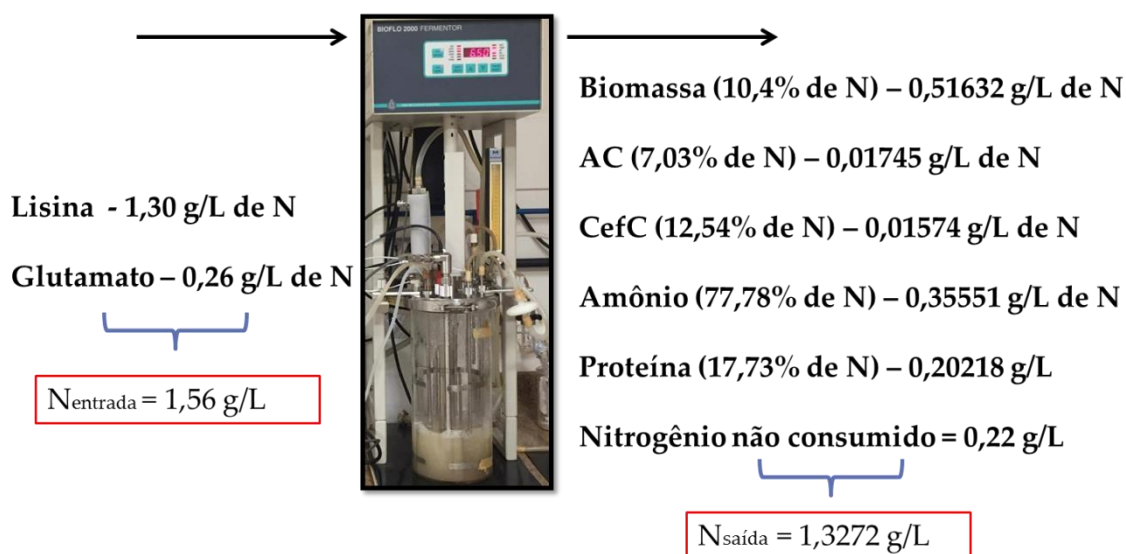
Observou-se que durante quase todo o cultivo as proteínas foram excretadas de forma gradual mantendo uma faixa de 0,5 – 0,7 g/L até 54 horas de cultivo. Após esse período, coincidindo com a exaustão dos nutrientes, houve um aumento na excreção de proteínas, atingindo uma concentração máxima de aproximadamente 1,2 g/L em 74 horas.

Figura 5.24 Experimento B1- Perfil de secreção de proteínas de cultivo realizado em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio.



O balanço de massa do nitrogênio está esquematizado na Figura 5.25. Sendo o meio de produção utilizado um meio sintético, é sabido que o nitrogênio de entrada foi proveniente apenas dos aminoácidos lisina (1,30 g/L) e glutamato de sódio (0,26 g/L). O nitrogênio de saída é proveniente dos produtos do cultivo (biomassa, amônio, proteínas e os bioativos: AC e CefC), além do residual dos aminoácidos. As porcentagens de nitrogênio na biomassa e nas proteínas de *S. clavuligerus* foram estimadas de acordo com a literatura (BUSHELL; FRYDAY, 1983; WILLIAMS et al., 2013; CAVALLIERI et al., 2016).

Figura 5.25 Experimento B1- Esquemática do balanço de massa de nitrogênio proveniente do período final (74 horas) do cultivo realizado em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio.



Fonte: Elaboração própria

Apenas a concentração do nitrogênio proveniente da biomassa foi maior do que a do nitrogênio proveniente do amônio, sendo o amônio responsável por ~27% do nitrogênio total de saída. O balanço fechou em cerca de 85% com relação ao nitrogênio inicial. Este valor pode ser justificado pela presença de outros compostos nitrogenados não analisados, como outros bioativos que podem ter sido produzidos pela rota biossintética da CefC, produtos de degradação dos biocompostos analisados, além da uréia. Este último composto pode estar presente, uma vez que Romero et al. (1986) demonstraram a presença do ciclo da ureia em *Streptomyces clavuligerus*. Ainda, Mendz e Hazell (1996) verificaram que a bactéria utiliza o ciclo da ureia para excretar o excesso de nitrogênio do interior de suas células.

Apesar deste mecanismo do microrganismo, que possibilita a transformação do amônio em uma substância menos tóxica à bactéria, a ureia; a degradação de altas concentrações dos aminoácidos ainda resulta em altas concentrações de íons amônio que interferem negativamente nas rotas biossintéticas dos compostos beta-lactâmicos, reprimindo as enzimas envolvidas na assimilação de fontes de nitrogênio e da ureia (WHITE, 1995).

6. CONCLUSÃO

- Tanto o método do fenato como a utilização de eletrodo de íon seletivo (ISE) foram eficazes para analisar a concentração de amônio presente no sobrenadante das amostras coletadas durante os cultivos submersos de *S. clavuligerus*, obtendo-se resultados da mesma ordem de grandeza com ambos os métodos.
- A interação entre as fontes de nitrogênio lisina e glutamato de sódio, juntamente com a maltose como fonte de carbono principal, mostrou-se promissora, obtendo-se maiores aumentos nas produções dos compostos beta-lactâmicos AC e CefC em condições limitantes de nitrogênio, ou seja, em menores razões carbono:nitrogênio, considerando-se o carbono dos aminoácidos.
- Os modelos matemáticos resultantes dos planejamentos experimentais apresentaram bons ajustes aos dados experimentais de produção de AC e CefC, porém, indicaram a impossibilidade de se otimizar a produção de ambos os bioativos em um mesmo cultivo, uma vez que o valor ótimo de cada biocomposto está associado a concentrações distintas de lisina e glutamato de sódio; apesar disso, algumas condições específicas dos planejamentos experimentais (condições C-V do Experimento P1 e C-VII do Experimento P2) resultaram em produções relevantes e da mesma ordem de grandeza para ambos os biocompostos simultaneamente.
- O aumento do pH observado nos experimentos em frascos agitados afetou negativamente a produção dos bioativos, com destaque para o AC; neste contexto, o cultivo realizado em biorreator na condição C-VII do Experimento P2 (43, 7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio) com controle de pH em 6,5, resultou em aumentos de 200% e 40% de AC e CefC respectivamente, com relação ao cultivo em frascos agitados.
- Altas concentrações de amônio afetam negativamente a produção dos bioativos, sendo o AC muito mais suscetível do que a molécula de CefC. As maiores concentrações de íons foram obtidas em condições com maiores concentrações de aminoácido, uma vez que o acúmulo de amônio está diretamente associado com o consumo das fontes de nitrogênio.

REFERÊNCIAS

- AHARONOWITZ, Y. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 34, p. 209-233, 1980.
- AHARONOWITZ, Y.; DEMAİN, A. L. Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 61-67, Jan. 1979.
- ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O. Continuous clavulanic acid adsorption process. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 867-879, 2003.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water & waste water**. 21st ed. Washington, DC, 2005.
- BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Natural Products Reports**, v. 14, n. 4, p. 329-333, Aug. 1997.
- BASSIK, M. C.; KAMPMANN, M. Knocking out the door to tunicamycin entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 29, p. 11731-11732, July 2011.
- BELLÃO, C. **Produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em batelada e batelada alimentada**. 2010. 78 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites (review article). **Journal of Antibiotic**, v. 58, p. 1-26, Jan. 2005.
- BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O. Kinect studies on clavulanic acid degradation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 31-36, Mar. 2005.
- BIRD, A. E.; BELLIS, J. M.; GASSON, B. C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. **The Analyst**, v. 107, n. 1279, p. 1241-1245, Jan. 1982.
- BRAKHAGE, A. A. Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 547-585, 1998.
- BRAÑA, A. F.; PAIVA, N.; DEMAİN, A. L. Pathways and regulation of ammonium assimilation in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 1305-1317, 1986.
- BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J. D.; READING, C.; ROLINSON, G. N. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. **The Journal of the Antibiotic**, v. 29, n. 6, p. 668-669, June 1976.

BUSHELL, M. E.; FRYDAY, A. The application of materials balancing to the characterization of sequential secondary metabolite formation in *Streptomyces cattleya* NRRL 8057. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 1733-1741, 1983.

BUSHELL, M. E.; KIRK, S.; ZHAO, H. J.; ROSA, C. A. A. Manipulation of the physiology of clavulanic acid biosynthesis with the aid of metabolic flux analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 149-157, June 2006.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: VANDAMME, E. J. (Ed.). **Biotechnology of industrial antibiotics**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 3-31.

CAVALLIERI, A. P. **Estudo de fluxos metabólicos na produção de CefC por *Streptomyces clavuligerus***. 2014. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

CAVALLIERI, A. P.; BAPTISTA, A. S.; LEITE, C. A.; ARAUJO, M. L. G. C. A case study in flux balance analysis: lysine, a cephamycin C precursor, can also increase clavulanic acid production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 42-53, Aug. 2016.

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

COSTA, C. L. L. **Estratégia para melhoria da produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***. 2014. 131f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

DEMAIN, A. L.; Inhibition of penicillin formation by lysine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 67, p. 244-246, Mar. 1957.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Involvement of nitrogen-containing compounds in β -lactam biosynthesis and its control. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 67-82, June 2006.

DÉVI, S.; SRIDHAR, P. Optimization of critical parameters in immobilization of *Streptomyces clavuligerus* on alginate gel matrix for cephamycin C production. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 185-192, 1999.

DREW, S. W.; DEMAIN, A. L. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. **Annual Review Microbiology**, v. 31, p. 343-356, Oct. 1977.

ELKINS, J. M.; CLIFTON, I. J.; HERNANDEZ, H.; DOAN, L. X.; HEWITSON, K. S. Oligomeric structure of proclavaminic acid amidino hydrolase: evolution of a hydrolytic enzyme in clavulanic acid biosynthesis. **Biochemical Journal**, v. 366, p. 423-434, 2002.

ELSON, S. W.; OLIVER, R. S.; BYCROFT, B. W.; FARUK, E. A. Studies on the biosynthesis of clavulanic acid III. Incorporation of DL-[3,4-¹³C₂] glutamic acid. **The Journal of Antibiotics**, v. 35, n. 1, p. 81-86, Feb. 1982.

ESSACK, S. The development of beta-lactam antibiotics in response to evolution of beta-lactamases. **Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 1391-1399, 2001.

FANG, A.; KEABLES, P.; DEMAINE, A. L. Unexpected enhancement of beta-lactam antibiotic formation in *Streptomyces clavuligerus* by very high concentrations of exogenous lysine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 705-709, Feb. 1996.

FUENTE, A.; LORENZANA, L. M.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible crossregulation of two unrelated secondary metabolic pathways. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6559-6565, Dec. 2002.

GRESSER, U. Amoxillin acid therapy maybe associated with severe side effects – review of the literature. **European Journal of Medicinal Research**, v. 20, n. 4, p. 139-149, Apr. 2001.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HIGGENS, C. E.; KASTNER, R. E. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a beta-lactam antibiotic producer. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 21, p. 326-331, Oct. 1971.

HODGSON, D. A. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. **Advances in Microbial Physiology**, v. 42, p. 47-238, 2000.

IVES, P. R.; BUSHELL, M. E. Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. **Microbiology**, v. 143, p. 3573-3579, Nov. 1996.

JENSEN, S. E.; PARADKAR, A. Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 123-133, 1999.

KHETAN, A.; MALMBERG, L. H.; KYUNG, Y. S.; SHERMAN, D. H.; HU, W. S. Precursor and cofactor as a check valve for cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 1020-1027, 1999.

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

KONG, K. F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiotics to resistance and bacteriology. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 118, p. 1-36, Jan. 2010.

KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment- a review- part I. **Chemosphere**, v. 75, p. 417-434, Jan. 2009.

KURYLOWICZ, W. **Antibióticos**: uma revisão crítica. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1981. 341 p.

LEBRIHI, A.; LAMSAIF, D.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P. Effect of ammonium ion on spiramicyn biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 382-387, 1992.

LEITE, C. A. **Avaliação do processo de produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus***. 2014. 104 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

LEITE, C. A.; CAVALLIERI, A. P.; ARAUJO, M. L. G. C. Enhancing effect of lysine combined with other compounds on cephamycin C production in *Streptomyces clavuligerus*. **BMC Microbiology**, v. 13, Dec. 2013. doi:10.1186/1471-2180-13-296.

LEITE, C. A.; CAVALLIERI, A. P.; BAPTISTA, A. S.; ARAUJO, M. L. G. C. Dissociation of cephamycin C and clavulanic acid biosynthesis by 1,3-diaminopropane in *Streptomyces clavuligerus* **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, 2016. doi:10.1093/femsle/fnv215.

LIRAS, P. Byosynthesis and molecular genetics of cephamycins. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 102-124, 1999.

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

LIRAS, P.; RODRÍGUEZ-GARCIA, A. Clavulanic acid, a beta-lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 467-475, Oct. 2000.

LIVERMORE, D. M.; WOOD, M. J. Mechanism and clinical significance of resistance to new beta-lactam antibiotics. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 44, n 4, p. 252-258, Oct. 1990

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. A rapid method for quantifying small amounts of protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1959.

MADDURI, K.; STUTTARD, C.; VINING, L. C. Lysine catabolism in *Streptomyces* spp. is primarily through cadaverine: β -lactam producers also make alpha-aminoadipate. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 1, p. 299-302, Jan. 1989.

MENDELOVITZ, S.; AHARONOWITZ, Y. A. I. R. Regulation of cephamycin C synthesis, aspartokinase, dihydrodipicolinic acid synthetase, and homoserine dehydrogenase by aspartic acid family amino acids in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 21, p. 74-84, 1982.

MENDZ, G. L.; HAZELL, S. L. The urea cycle of *Helicobacter pylori*. **Microbiology**, v. 142, p. 2959-2967, Oct. 1996.

MERCK AND COMPANY (United States). E. Inamine; J. Birnbaum. **Cephameycin C by fermentation**. US3977942, 21 Nov. 1975, 31 Aug. 1976.

NAGARAJAN, R.; BOECK, L. D.; GORMAN, M.; HAMILL, R. L.; HIGGENS, C. E.; HOEHN, M. M.; STARK, W. M.; WHITNEY, J. G. Beta-lactam antibiotics from *Streptomyces*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 2308-2310, 1971.

OLIVEIRA, J. H.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M.; TRSIC, M. Clavulanic acid and cephamycin C: a perspective of the biosynthesis, isolation and action mechanism. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2142-2150, 2009.

OMSTEAD, D. R.; HUNT, G. H.; BUCKLAND, B. C. Commercial production of cephamycin antibiotics. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive biotechnology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 3, chap. 9, p. 187-210.

ORTIZ, S. C. A. **Estudo da produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em diferentes concentrações de lipídeos e de fontes complexas de nitrogênio**. 2005, 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

OZCENGİZ, G.; DEMAİN, A. L. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 287-311, Apr. 2013.

PARADKAR, A. Clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*: biogenesis, regulation and strain improvement. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 7, p. 411-420, July 2013.

READING, C.; COLE, M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 852-857, May 1977.

RIUS, N.; DEMAİN, A. L. Regulation of lysine ϵ -aminotransferase by carbon source and lack of control by phosphate in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p. 735-737, 1997.

ROBLES-REGLERO, V.; SANTAMARTA, I.; ÁLVAREZ-ÁLVAREZ, R.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of the Biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 69-76, Jan. 2013.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326 p.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 318-325, Nov. 1984.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTIN, J. F. Utilization of ornithine and arginine as specific precursors of clavulanic acid. **Applied Environment Microbiology**, v. 52, p. 892-897, 1986.

ROUBOS, J. A.; KRABBEN, P.; DE LAAR, W. T. A. M.; BABUSKAA, R.; HEIJEN, J. J. Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 3, p. 451-457, June 2002.

SÁNCHEZ, L.; BRAÑA, A. F. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Microbiology**, v. 142, p. 1209-1220, 1996.

SANTAMARTA, I.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, A.; PÉREZ-REDONDO, R.; LIRAS, P. CcaR Is an autoregulatory protein that binds to the *ccaR* and *cefD-cmcl* promoters of the cephamycin C - clavulanic acid cluster in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 11, p. 3106-3113, June 2002.

SHARMA, A.; KUMARI, N.; MENGHANI, E. Bioactive secondary metabolites: an overview. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 5, n. 4, p. 1395-1407, 2014.

SPRATT, B. G. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. **Science**, v. 264, p. 388-393, Apr. 1994.

STEFFE, C. H. Alexander Fleming and penicillin. The chance of a lifetime? **North Carolina Medical Journal**, v. 53, n. 6, p. 308-310, June 1992.

TROVATTI, E.; BADINO, A. C.; HOKKA, A. C.; ARAUJO, M. L. G. C. Influence of free amino acids on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in synthetic medium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 173-179, 2006.

TZOLLAS, N. M.; ZACHARIADIS, G.; ANTHEMIDIS, A.; STRATIS, J. A. A new approach to indophenol blue method for determination of ammonium in geothermal waters with high mineral content. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 90, n. 2, p. 115-126, 2010.

VILJOEN, A. J.; KIRSTEN, C. J.; BAKER, B.; VAN HELDEN, P. D.; WIID, I. J. F. The role of glutamine oxoglutarate aminotransferase and glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Mycobacterium bovis* BCG. **PLoS One**, v. 8, n. 12, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0084452.

WILLIAMS, W. M.; MOUGHAN, P. J.; FULLER, M. F. Comparison of three markers for the determination of bacterial protein in terminal ileal digesta in the growing pig. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p. 951-959, 2013.