

THALINE DE MATTOS CARBONARO

**“Estudo da estabilidade produtiva de compostos bioativos em linhagem
mutante de *Streptomyces clavuligerus*”**

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

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

ARARAQUARA/SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

C264d	<p>Carbonaro, Thaline de Mattos</p> <p>Estudo da estabilidade produtiva de compostos bioativos em linhagem mutante de <i>Streptomyces clavuligerus</i> / Thaline de Mattos Carbonaro. – Araraquara : [s.n], 2014 51 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Maria Lúcia Gonsales da Costa Araújo</p> <p>1. Biotecnologia. 2. Mutante. 3. Compostos bioativos. 4. Holomicina. I. Título.</p>
-------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

THALINE DE MATTOS CARBONARO

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

Araraquara, 28 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Maria Lucia G. Costa Araujo

Profª. Drª. MARIA LUCIA GONSALES DA COSTA ARAUJO (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara

Alvaro de Baptista Neto

Prof. Dr. ÁLVARO DE BAPTISTA NETO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara / UNESP / Araraquara

Rosineide Gomes da Silva Cruz

Profª. Drª. ROSINEIDE GOMES DA SILVA CRUZ
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia / UFSCar / São Carlos

DADOS CURRICULARES

Thaline de Mattos Carbonaro

Dados Pessoais

Nome Thaline de Mattos Carbonaro
Nascimento 18/07/1989 - Jardim/MS - Brasil

Formação Acadêmica/Titulação

2007 - 2010 Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado.
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - UFGD, FCBA-UFGD,
Dourados/MS, Brasil.

Formação complementar

2010 - 2010 Fungos: Morfologia, Classificação e Diversidade. (Carga horária: 80h).
Associação Brasileira de Educação a Distância.

2009 - 2010 Extensão universitária em Controle d Microrganismos na Manipulação
Alimentos. (Carga horária: 160h).
Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

2008 - 2008 Técnicas Laboratoriais Básicas em Microbiologia. (Carga horária: 8h).
Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

2008 - 2008 Entomologia Médica e Saúde Pública. (Carga horária: 8h).
Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

2008 - 2008 Zoonoses: Novos Desafios. (Carga horária: 8h).
Instituto do Meio Ambiente de Dourados.

2007 - 2007 Biologia de Anfíbios - Anuro. (Carga horária: 8h).
Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, Brasil.

2006 - 2006 Exploração do Turismo com Sustentabilidade Ambiental. (Carga horária: 4h).
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul.

2006 - 2006 RAD - Recuperação de Áreas Degradadas. (Carga horária: 4h).
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul.

Produção em C, T&A

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

1. DOLACIO, T. A.; CARBONARO, T. M.; VAINI, J. O.; GRISOLIA, A. B. Videolição do histórico de eventos relevantes para o desenvolvimento da genética e biologia molecular. In: 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. **57º Congresso Brasileiro de Genética**, 2011. p. 4-4.
2. VAINI, J. O.; CARBONARO, T. M.; CRISPIM B. A.; GRISOLIA, A. B. Análise citogenética de surubim híbrido em piscicultura de Itaporã, MS - Brasil. In: 2ª Reunião Brasileira de Citogenética, 2011, Águas de Lindóia. **2ª Reunião Brasileira de Citogenética**, 2011.
3. CARBONARO, T. M.; BONACINA, A. K. B.; DOLACIO, T. A.; ALVES Jr., V. V.; GRISOLIA, A. B. Genotypic analysis of the relationship between the size of the gland and the quantity of poison acid produced africanized bees, *Apis mellifera* l. 1758 (HYMENOPTERA, APIDADE). In: 57º Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia. **57º Congresso Brasileiro de Genética**, 2011.
4. CARBONARO, T. M.; SILVA, E. M.; SCORZA-JUNIOR, R. P.; SILVA, F. G.; GRISOLIA, A. B.; JESUS, G. J. Presença de bactérias totais em solo cultivado com cana-de-açúcar na região de Dourados-MS. In: 20º Congresso de Biólogos do CRBio-01, 2011, Corumbá. **20º Congresso de Biólogos do CRBio-01**, 2011.
5. JESUS, G. J.; CARBONARO, T. M.; GRISOLIA, A. B. Quantificação de fungo filamentosos totais em um solo cultivado com cana-de-açúcar na ausência de fipronil na região de Dourados-MS. In: XII CONGRESSO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 2010, Manaus. **Sociedade Brasileira de Microbiologia**, 2010.
6. CARBONARO, T. M.; CRISPIM B. A.; CUNHA, C. M.; CARSTILHO, K. B.; DOLACIO, T. A.; FENGLER, G.; GRISOLIA, A. B.; HOLZBACH, I.; VAINI, J. O.; ZAMPIVA, N. K.; PEGO, A. G.; ABE, A. C. T.; ARAUJO, R. P.; JESUS, G. J. Genética básica: temas em CD-ROM como metodologia de ensino. In: 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá. **56º Congresso Brasileiro de Genética**, 2010. p. 2-2.
7. CARBONARO, T. M.; SANTOS, G. M.; SILVA, A. F. L.; ROSSONI, C. Avaliação da integridade ambiental de duas nascentes da cidade de Dourados-MS. In: V Jornada Acadêmica Integrada de Biologia e V Encontro Estadual de Biologia, 2010, Campo Grande. **V Jornada Acadêmica Integrada de Biologia e V Encontro Estadual de Biologia**, 2010.

Apresentações de Trabalho

1. CARBONARO, T. M.; JESUS, G. J. Impacto causado pelo plantio de soja (*Glycine max* (L.) MERRILL) em comunidades fungicas do solo. 2011. (Apresentação de trabalho/outra).

2. SILVA, A. F. L.; JESUS, G. J.; GRISOLIA, A. B.; ABREU, A. C. G.; OLIVEIRA, A. P. A.; PINHEIRO, E. C.; CARVALHO, R. M. M. C.; CARBONARO, T. M. Controle de microrganismos na manipulação dos alimentos. 2010. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

Produção técnica

Programas de computador sem registro

1. CARBONARO, T. M.; CRISPIM B. A.; CUNHA, C. M.; CARSTILHO, K. B.; ALVES Jr., V. V.; DOLACIO, T. A.; FENGLER, G.; GRISOLIA, A. B.; HOLZBACH, I.; JESUS, G. J.; PEGO, A. G.; VAINI, J. O.; ZAMPIVA, N. K. Genética Virtual. 2010.

Demais tipos de produção técnica

1. CARBONARO, T. M.; PEREIRA, Z. V. Conservação e uso sustentável da biodiversidade do cerrado e geração de renda para a comunidade do assentamento lagoa grande distrito de Ithaum Dourados, MS. 2009. (Projeto de Extensão).

2. CARBONARO, T. M.; ALVES Jr., V. V. Apicultura racional para o assentamento lagoa grande distrito de Ithaum - Dourados - MS. 2009. (Projeto de Extensão).

3. CARBONARO, T. M. Importância dos insetos para o homem e o meio ambiente. 2008. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

AGRADECIMENTOS

Dedico especial agradecimento a **Profª Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo**, pelo auxílio, disponibilidade de tempo e material. Orientadora dedicada que com sabedoria soube dirigir-me os passos e os pensamentos para o alcance de meus objetivos. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência profissional e minha gratidão pela sua amizade, por ser uma profissional extremamente qualificada e pela forma humana que conduziu minha orientação.

Aos meus pais, **Eli Brum de Mattos Carbonaro** e **Osmar Carbonaro**, e meu irmão **Hérvio de Mattos Carbonaro**, por fazerem parte da minha vida e me apoiarem sempre em minhas decisões. E que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

Aos meus amigos, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhora tudo o que tenho produzido na vida.

Aos meus colegas de laboratório, que de alguma maneira me ajudaram na realização desta pesquisa. Peço a Deus que os abençoe grandemente, preenchendo seus caminhos com muita paz, amor, saúde e prosperidade.

A **UFGD**, em especial a **FCBA**, pelos ensinamentos tanto profissionais quanto pessoais; e pelos grande e eternos amigos feitos.

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

Muito Obrigada!

“As piores loucuras são as mais sensatas alegrias, o que eu fiz hoje deixei de herança para aqueles que sonham ser como eu: Louco, mas FELIZ!”

(Bob Marley)

RESUMO

Streptomyces clavuligerus produz importantes Compostos β -lactâmicos como: a holomicina (Hol), importante membro da classe pirrotina de antibióticos; cefamicina C (CefC), utilizada como matéria prima para a produção de antibióticos semi-sintéticos de amplo espectro, aplicados na prevenção de infecções pós-operatórias graves; além do ácido clavulânico (AC), inibidor de β -lactamases produzido por bactérias resistentes a penicilinas. A elevada instabilidade genética de *S. clavuligerus* resulta, com frequência, em deleções de trechos do DNA cromossomal que são, em sua maioria, associados à capacidade de esporulação e a produção de metabólitos secundários. Tais estados mutadores indesejáveis normalmente são potencializados por condições limite, como a mudanças bruscas de temperatura e pH, a presença de certos compostos, entre outros fatores, que podem ocorrer em qualquer etapa de manuseio/cultivo do microrganismo. Por outro lado, certas condições adversas ao crescimento durante a fermentação favorecem a produção de metabólitos secundários. Assim, a indústria da fermentação tem investido na busca de condições favoráveis de crescimento celular que permitam favorecer a produção. Para isto, é necessário dispor de estoque de células estáveis e produtivas, cuja integridade genética permita obter dados reprodutíveis e confiáveis. Deste modo, o presente trabalho teve por objetivo melhorar as condições de cultivo de *S. clavuligerus*, definindo-se um meio padrão de cultivo em batelada contendo nutrientes cuja presença favoreceu a produção de um determinado bioativo (CefC, AC ou Hol), tanto pela linhagem selvagem quanto pelas mutantes. Ainda, comparou-se a produção de Hol pelos mutantes utilizando-se como inóculo esporos estocados em criotubos (-80°C) e suspensão fresca de esporos.

Palavras-chave: *Streptomyces clavuligerus*. Mutante. Compostos bioativos. Holomicina.

ABSTRACT

Streptomyces clavuligerus produces important β -lactam compounds such as: holomycin (Hol), pirrotina an important member of the class of antibiotics; cephamycin C (CefC), used as raw material for the production of semi-synthetic broad-spectrum antibiotics, applied in the prevention of severe postoperative infections; lastly, clavulanic acid (AC) inhibitor, β -lactamases produced by bacteria resistant to penicillins. The high genetic instability of *S. clavuligerus* often results in chromosomal deletions of stretches of DNA that are mostly associated with the sporulation capacity and production of secondary metabolites. Mutators such undesirable states are usually exacerbated by boundary conditions, such as sudden changes in temperature and pH, the presence of certain compounds, among other factors, which may occur at any stage of handling/cultivation of the microorganism. On the other hand, certain adverse conditions promote growth during fermentation production of secondary metabolites. Thus, the present study aimed to improve the cultivation of *S. clavuligerus*, defining a means cropping pattern batch containing nutrients whose presence favored the production of a bioactive determined (CEFC, AC or Hol), both by wild type as well as the mutant strain. Still, compared to the production of Hol mutants using inoculum spores stored in cryotubes (-80 ° C) and fresh spore suspension.

Keywords: *Streptomyces clavuligerus*. Mutant. Bioative Compounds. Holomycin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Estrutura química do anel β -lactâmico.	21
Figura 3.2 - Subgrupos dos antibióticos β -lactâmicos.	22
Figura 3.3 - Fórmula molecular: (A) ácido clavulânico; (B) cefamicina C; (C) holomicina; (D) cefalosporina C.	22
Figura 4.1 - Procedimentos do protocolo de confecção de ampolas.	30
Figura 4.2 - Procedimentos do protocolo de confecção de criotubos.	31
Figura 4.3 - Etapas de cultivo de <i>S. clavuligerus</i> em frascos agitados.	32
Figura 5.1 - Biomassa das linhagens selvagem e Mut0 obtida durante o processo de fermentação em meios sintético e complexo contendo Lisina, com 48 e 72 horas de processo.	36
Figura 5.2 - Comparação da produção de Hol pelas linhagens selvagem e Mut0, em meios sintético e complexo contendo Lisina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.	36
Figura 5.3 - Comparação da produção de CefC pelas linhagens selvagem e Mut0, em meios sintético e complexo contendo Lisina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.	37
Figura 10.4 - Comparação da produção de AC pelas linhagens selvagem e Mut0, em meios sintético e complexo contendo Lisina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.	37
Figura 5.5 - Biomassa de Mut0 obtida durante o processo de fermentação em meio sintético contendo Lisina, com (A) ou sem (B) a adição de tiosulfato, em 48 e 72 horas de processo.	38
Figura 5.6 - Comparação da produção de CefC por Mut0, em meio sintético contendo Lisina, com (A) ou sem (B) a adição de tiosulfato, em 48 e 72 horas de processo.	39
Figura 5.7 - Comparação da produção de AC por Mut0, em meio sintético contendo Lisina, com (A) ou sem (B) a adição de tiosulfato, em 48 e 72 horas de processo.	39
Figura 5.8 - Comparação da produção de Hol por Mut0, em meio sintético contendo Lisina, com (A) ou sem (B) a adição de tiosulfato, em 48 e 72 horas de processo.	40
Figura 5.9 - Biomassa de Mut0, Mut1 e Mut2 obtida durante o processo de fermentação em meio sintético contendo Lisina, com 48 e 72 horas de processo.	41
Figura 5.10 - Comparação da produção de Hol pelas linhagens Mut0, Mut1 e Mut2 em meio sintético contendo Lisina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.	41

Figura 5.11 - Comparação da produção de CefC pelas linhagens Mut0, Mut1 e Mut2, em meio sintético contendo Lisina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.	42
Figura 5.12 - Comparação da produção de AC pelas linhagens Mut0, Mut1 e Mut2, em meio sintético contendo Lisina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.	42
Figura 5.13 - Biomassa das linhagens selvagem e Mut1 obtida durante o processo de fermentação em meios sintético e complexo contendo Arginina, com 48 e 72 horas de processo.	44
Figura 5.14 - Comparação da produção de Hol pelas linhagens selvagem e Mut1, em meios sintético e complexo contendo Arginina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.	44
Figura 5.15 - Biomassa de Mut0, Mut1 e Mut2, provenientes de esporos em criotubos (-80°C) obtida durante o processo de fermentação em meios sintético contendo Lisina, com 48 horas de processo.	46
Figura 5.16 - Biomassa de Mut0, Mut1 e Mut2, provenientes de suspensão fresca de esporos, obtida durante o processo de fermentação em meios sintético contendo Lisina, com 48 horas de processo.	46
Figura 5.17 - Comparação da produção de Hol por Mut0, Mut1 e Mut2, provenientes de criotubos(-80°C), em meio sintético contendo Lisina, com 48 horas de processo.	47
Figura 5.18 - Comparação da produção de Hol por Mut0, Mut1 e Mut2, provenientes de suspensão fresca de esporos, em meio sintético contendo Lisina, com 48 horas de processo.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Composição do meio agar nutriente (Difco 0001).	25
Tabela 4.2 - Composição do meio de esporulação.	26
Tabela 4.3 - Composição do meio de reativação.	26
Tabela 4.4 - Composição do meio de germinação (MG).	27
Tabela 4.5 - Composição geral dos meios de preparo do inóculo, sintético e complexo.	27
Tabela 4.6 - Composição geral dos meios de fermentação principal, sintético e complexo.	28

LISTA DE ABREVIATURAS

Hol – Holomicina

AC – Ácido clavulânico

CefC – Cefamicina C

CPC – Cefalosporina C

SB – Meio de esporulação

RC – Meio de reativação

MG – Meio de germinação

MI – Meio de inóculo

MP – Meio de produção

Mut 0 – *S. clavuligerus* 45

Mut 1 – *S. clavuligerus* 45.41, *screening* de Mut0

Mut 2 – colônia de *S. clavuligerus* 45.41 (Mut1) melhor produtora de Hol

Sint – Meio sintético

Comp – Meio Complexo

Arg – Arginina

Lis – Lisina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. <i>STREPTOMYCES CLAVULIGERUS</i>	20
3.2. COMPOSTOS BIOATIVOS	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. MATERIAIS	25
4.1.1. Microrganismos	25
4.1.2. Bactéria-teste	25
4.2. MEIOS DE CULTURA	25
4.2.1. Meio sólido de cultivo de bactéria-teste	25
4.2.2. Meio de esporulação de <i>S. clavuligerus</i> (SB)	26
4.2.3. Meio de reativação de <i>S. clavuligerus</i> (RC)	26
4.2.4. Meio de germinação de esporos e de micélios (MG)	27
4.2.5. Meios utilizados para preparo de inóculo (MI)	27
4.2.6. Meios utilizados para produção de antibióticos (MP)	28
4.3. EQUIPAMENTOS	28
4.4. MANIPULAÇÃO, PREPARO E ESTOCAGEM DAS LINHAGENS DE <i>S. CLAVULIGERUS</i>	29
4.4.1. Obtenção de células/esporos do microrganismo	29
4.4.1.1. Reativação de células liofilizadas	29
4.4.1.2. Obtenção de esporos	29
4.4.2. Armazenamento das células/esporos obtidas	29
4.4.2.1. Preparação de células para a liofilização	29
4.4.2.2. Preparação de esporos para criogenia	30
4.4.3. Condições gerais dos cultivos submersos para a produção de compostos bioativos	31
4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	32
4.5.1. Coleta e armazenamento das amostras	32
4.5.2. Determinação da biomassa	32
4.5.3. Determinação de CefC através de bioensaio de difusão em agar	33

4.5.4. Determinação de AC	34
4.5.5. Determinação de Hol	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1. FORMULAÇÃO DE MEIO PADRÃO PARA A PRODUÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	35
5.1.1. Comparação da produção de bioativos em meios sintético e complexo	35
5.1.2. INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO OU NÃO DE TIOSSULFATO DE SÓDIO NO MEIO DE PRODUÇÃO	38
5.1.3. Comparação da capacidade produtiva de bioativos entre as linhagens mutantes	40
5.1.4. Influência da Arginina como fonte de nitrogênio no meio de cultura	42
5.2. COMPARAÇÃO DA ESTABILIDADE PRODUTIVA DE HOL PELAS LINHAGENS MUTANTES, COM ESPOROS RECÉM-CULTIVADOS E ESTOCADOS EM SOLUÇÃO CRIOPROTETORA	45
6. CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

Muitos metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de microrganismos, como antibióticos e antitumorais, são agentes quimioterápicos que, sob diversos mecanismos e em baixas concentrações, têm a capacidade de destruir ou inibir o crescimento de outros microrganismos.

A capacidade de produzir vários destes compostos é uma característica peculiar de bactérias do gênero *Streptomyces* que as torna, atualmente, as fontes naturais mais abundantes de agentes bioativos e compostos de interesse clínico (CHALLIS; HOPWOOD, 2003).

A espécie *S. clavuligerus* produz uma grande parte destes metabólitos, como os antibióticos β -lactâmicos penicilina N, deacetilcefalosporina C, deacetoxicefalosporina C, cefalosporina C (CPC) e cefamicina C (CefC) (OMSTEAD; HUNT; BUCKLAND, 1985; BRAKHAGE et al., 2005); produz ainda, o Ácido Clavulânico (AC) (PRUES; KELLETT, 1983; BRUNDTLAND, 2000), um potente inibidor de β -lactamases, dentre outras vinte clavamas; além de outros antibióticos não β -lactâmicos, como holomicina (Hol), n-propionil-holotina e tunicamicina (LIRAS; RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2000).

Linhagens industriais de *S. clavuligerus*, com alta capacidade produtiva, assim como outras espécies de streptomicetos de interesse comercial, ainda são obtidas por procedimentos empíricos como seleção ("*screening*") e mutagênese clássica (métodos químicos e/ou físicos). Devido à aleatoriedade da mutagênese clássica, mutações secundárias que não contribuem para aumentar a produtividade, somadas à elevada instabilidade genética naturalmente presente em praticamente todas as espécies do gênero, podem tornar-se dominantes nas culturas e, assim, causar o colapso do ciclo produtivo (CHEN, 1995).

O DNA cromossomal de *Streptomyces* é susceptível a muitas deleções em trechos geneticamente instáveis, dentre os genes mais afetados estão os responsáveis pela formação de hifas aéreas e esporos, produção de pigmentos e enzimas extracelulares e biossíntese de antibióticos. A perda da capacidade de esporulação, por exemplo, afeta os procedimentos de preservação da linhagem de obtenção do inóculo para a fermentação. A manutenção da integridade dos esporos é de suma importância para perpetuar as características da linhagem, uma vez que esse tipo de morfologia detém toda a informação genética do

microrganismo, tanto no que diz respeito à continuidade da espécie (metabolismo primário) como à produção de compostos bioativos (metabolismo secundário) (DARY et al., 1999; BUSSARI et al., 2009).

Fenótipos indesejáveis decorrentes de altos graus de deleção no DNA cromossomal são inerentes à modulação genética do gênero *Streptomyces* em resposta ao ambiente e podem ser intensificados por condições-limite como gradientes bruscos de pH, temperatura, e por condições de estocagem das células. Tais condições adversas podem ocorrer em qualquer etapa (manejo, cultivo e armazenamento do microrganismo) e sempre acarretam perdas irreversíveis na capacidade produtiva. Por outro lado, deleções de mais de 25% dos genes de *Streptomyces* podem muitas vezes não comprometer a sobrevivência do microrganismo e, por isso, dificultam o reconhecimento imediato da deterioração da capacidade produtiva da linhagem (DARY et al., 1999; MEDEMA et al., 2010).

Em contraposição, há muito se sabe que condições estressantes também podem favorecer a produção de metabólitos secundários (OMSTEAD; HUNT; BUCKLAND, 1985; STANBURY; WHITAKER; HALL, 1999; CHALLIS; HOPWOOD, 2003). Neste sentido, a indústria da fermentação tem criado programas de desenvolvimento de bioprocessos em busca de condições favoráveis de crescimento celular que permitam favorecer a produção. Isto representa um grande desafio para geneticistas e engenheiros industriais de fermentação, uma vez que, como exposto acima, a instabilidade genética de *Streptomyces* resulta, frequentemente, na perda total ou quase total da capacidade produtiva e/ou de esporulação (CHEN, 1995; DARY et al., 1999; ELANDER, 2003; MEDEMA et al., 2010).

No presente trabalho, verificou-se a capacidade de produção de compostos bioativos por linhagens mutantes de *S. clavuligerus* obtidas em nosso laboratório e pela linhagem selvagem (ATCC). Para tal, investigou-se o comportamento do mutante em meios contendo compostos que, segundo a literatura, influenciam a produção de bioativos (Hol, CefC e AC) em linhagens do microrganismo e, ainda, comparou-se a produção de Hol utilizando-se esporos do mutante estocados de formas diferentes.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo melhorar as condições de cultivo de *S. clavuligeru* , pelos nutrientes existentes no meio de cultura, a fim de definir meios de cultivo, para o processo em batelada, diferenciados de forma a favorecer a produção de CefC, AC ou Hol, tanto pela linhagem selvagem quanto pelas mutantes. Além disto, foi avaliada a capacidade produtiva de Hol das linhagens mutantes utilizando-se como inóculo esporos estocados na forma de criotubos (a -80°C) e suspensão fresca de esporos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Streptomyces clavuligerus*

Taxonomicamente, o gênero *Streptomyces* pertence à família Streptomycetaceae, membros da ordem Actinomycetales, dentro da classe Actinobactéria, como proposto por Garrity, Bell e Lilburn (2004): Domínio Bacteria; Filo B XIV “Actinobacteria”; Classe I Actinobacteria; Subclasse V Streptomycineae; Família I Streptomycetaceae; Gênero I *Streptomyces*.

As bactérias do grupo Actinobactérias, também conhecidas como Actinomicetos, são com frequência erroneamente classificadas como fungos, devido a sua semelhança a estes, e por produzirem cadeias de esporos semelhantes a conídios; além de desenvolverem micélio estável formado por filamentos ramificados chamados hifas (LECHEVALIER, 1989). Porém, ao contrário dos fungos, são microrganismos procariotos, em sua grande maioria aeróbios e gram-positivos

Em 1964, o Projeto Internacional *Streptomyces* (ISP), estabeleceu critérios e metodologias para caracterizar e auxiliar a identificação do gênero. Esta tentativa de caracterização inclui características morfológicas, como ramificações das hifas, presença de hifas sob o substrato e hifas aéreas, arranjo da cadeia de esporos, superfície do esporo, características bioquímicas e fenotípicas. Enfim, sua classificação está baseada em características morfológicas, químicas, nutricionais ou fisiológicas.

S. clavuligerus é uma bactéria estritamente aeróbia e habitante do solo, capaz de degradar resíduos de plantas e animais, porém não consegue assimilar glicose (ZHANG; DEMAIN, 1992). É considerada uma espécie importante para as indústrias farmacêuticas, pois produz múltiplos compostos, dos quais muitos já foram caracterizados quanto à estrutura e funcionalidade (NAGARAJAN et al., 1971).

Foi isolada pela primeira vez por Nagarajan e colaboradores (1971), a partir de um trabalho no qual selecionaram microrganismos produtores de compostos β -lactâmicos resistentes às enzimas β -lactamases. Atualmente esta bactéria encontra-se depositada no banco da ATCC sob número 27064, e no banco da NRRL sob numeração 3585.

3.2. Compostos Bioativos

O metabolismo secundário em microrganismos é resultado de um crescimento desbalanceado e, por isto, gera compostos que, por não serem aparentemente essenciais ao desenvolvimento celular, acumulam-se no meio fermentativo. Até meados do século XX imperou o conceito de que estes metabólitos eram uma produção de material de refugo sem significado. Atualmente sabe-se que estes compostos são resultados da especialização celular, e que se manifestam logo que a fase de crescimento esteja completa (PHAFF, 1981).

A biossíntese destes metabólitos é realizada por rotas metabólicas específicas do organismo, que se interconectam com o metabolismo primário, o qual fornece moléculas que são utilizadas como precursoras na síntese de metabólitos secundários. Essas moléculas são espécies químicas como aminoácidos, polímeros, ácidos graxos e açúcares, essenciais a todos os organismos vivos. Há várias teorias sobre os possíveis papéis desses compostos nos organismos que os produzem, porém estudos comprovam que estes estão associados de alguma forma a funções de sobrevivência e de adaptação às condições ambientais.

A espécie *S. clavuligerus* produz cerca de 21 metabólitos secundários (ROMERO, 1984), principalmente antibióticos pertencentes à família dos β -lactâmicos. Os antibióticos β -lactâmicos, assim denominados por possuírem em comum um anel β -lactâmico em sua estrutura química (Figura 3.1), se dividem em 5 subgrupos, de acordo com suas características estruturais: Penams, Cefems, Clavams, Carbapenems e Monobactams (Figura 3.2).

Figura 3.1 - Estrutura química do anel β -lactâmico.

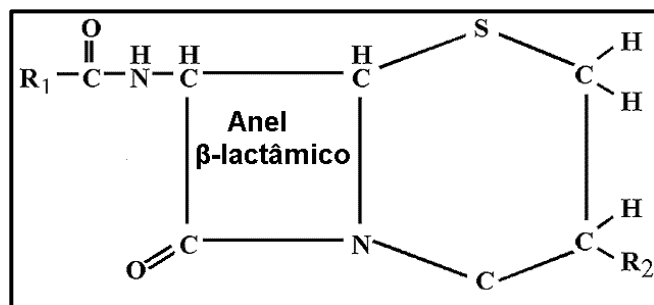
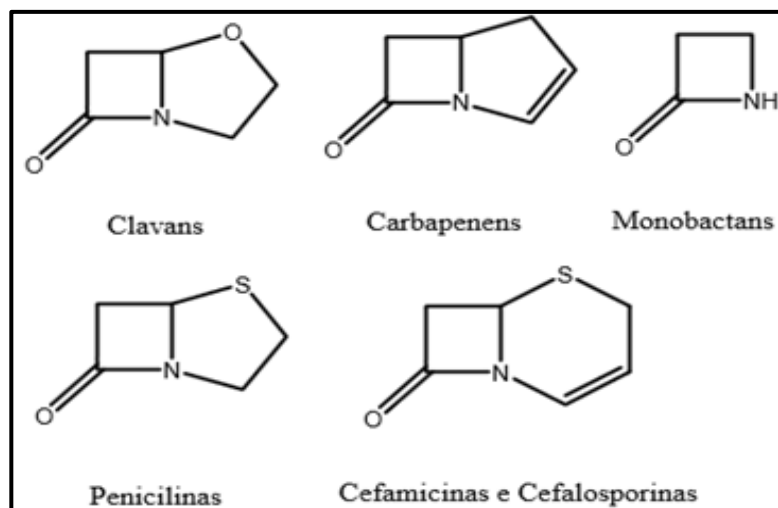
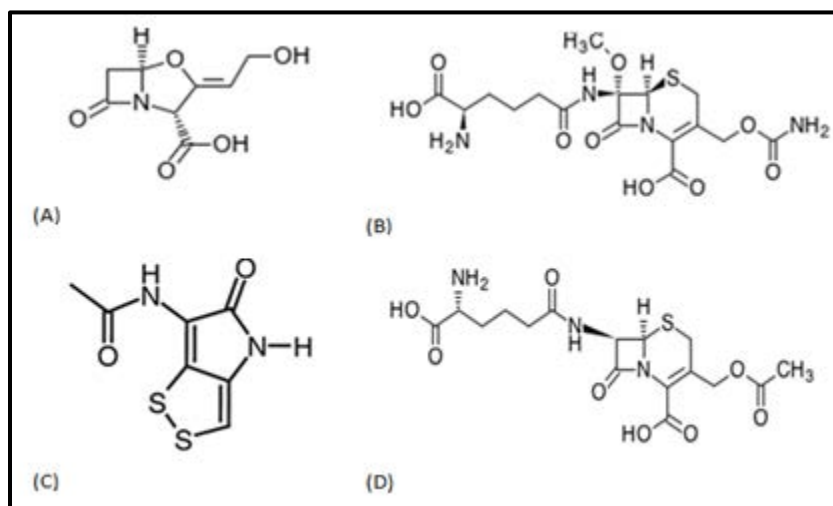


Figura 3.2 - Subgrupos dos antibióticos β -lactâmicos.



Dentre os compostos bioativos produzidos por linhagens de *S. clavuligerus* podemos citar os antibióticos CefC (Figura 3.3B), penicilina N, CPC (Figura 3.3D), desacetoxicefalosporina C, Hol (Figura 3.3C), além do AC (Figura 3.3A) (LIRAS, 1999; BRAKHAGE et al., 2005).

Figura 3.3 - Fórmula molecular: (A) ácido clavulânico; (B) cefamicina C; (C) holomicina; (D) cefalosporina C.



Todos os antibióticos β -lactâmicos interferem na síntese da parede celular bacteriana, para impedir a ação destes antibióticos, as bactérias produzem enzimas, as β -lactamases, que agem clivando o anel β -lactâmico. Ao longo dos anos, as bactérias foram adquirindo resistência a esses antibióticos, sendo necessário encontrar inibidores que impeçam a ação dessas enzimas, com o ácido clavulânico. O AC (PRUES; KELLETT, 1983; BRUNDTLAND, 2000) é um composto pertencente ao subgrupo clavam, produzido por *S. clavuligerus*, e é um potente inibidor de várias β -lactamases comumente encontradas em microrganismos resistentes a penicilinas e cefalosporinas (REDING; COLE, 1977). Atua se ligando irreversivelmente a grupo hidroxil do centro ativo das β -lactamases, inativando-as. Este composto possui uma fraca atividade antibacteriana, por isso, é utilizado em sinergia com antibióticos β -lactâmicos, o exemplo clínico mais importante é a sua combinação com amoxicilina, cuja formulação original foi desenvolvida pela Glaxo SmithKline (Clavulin®, no Brasil) (LAVARDA; HOKKA; ARAUJO, 2008).

Além do AC, *S. clavuligerus* produz também cefamicina C (OMSTEAD; HUNT; BUCKLAND, 1985; BRAKHAGE et al., 2005), um antibiótico β -lactâmico de amplo espectro, isolado a partir do fungo *Cephalosporium acremonium* por Brotzu (1948). CefC tem sua estrutura semelhante à CPC, composto produzido apenas por fungos filamentosos (ARAUJO; GIORDANO; HOKKA, 1999), porém, é mais resistente as β -lactamases por apresentar um radical metoxi na posição 7- α , que confere maior estabilidade ao seu sistema bicíclico de anéis (OLIVEIRA et al., 2009; BUSSARI et al., 2009). Este composto foi descoberto no centro de P&D da Merck Co. e é utilizado como matéria prima para a produção de derivados semi sintéticos, como cefoxitina, cefotetan, cefametazol e temocilina. Estes antibióticos apresentam amplo espectro antibacteriano, incluindo bactérias anaeróbias, sendo aplicados na prevenção de infecções pós-operatórias causadas por bactérias resistentes a vários dos antibióticos já existentes (OMSTEAD; HUNT; BUCKLAND, 1985; BUSSARI et al., 2009).

S. clavuligerus também é reconhecida por produzir alguns antibióticos não β -lactâmicos, como a holomicina (LIRAS; RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2000). Hol é um membro da classe pirrotina de antibióticos, conhecidos pela sua atividade contra as bactérias resistentes à rifamicina e caracterizados por possuírem um núcleo ditiolpirrolona original que ocorre naturalmente. Embora estes agentes antimicrobianos tenham sido

descobertos há mais de 40 anos, pouco se sabe sobre o seu modo de ação. Acredita-se que estes antibióticos pirrolínicos atuem como inibidores da polimerase de RNA dependente de DNA (YIN et al., 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Microrganismos

Para o processo de produção de bioativos foram utilizadas linhagens de *S. clavuligerus* ATCC 27064 (selvagem) e linhagens mutantes de *S. clavuligerus*. Os mutantes foram nomeados como: Mut0 - *S. clavuligerus* 45, obtido em trabalho de doutorado realizado em nossos laboratórios, por mutagênese clássica (tratamento químico, com agente alquilante, de esporos da linhagem selvagem) (ANTONIO; FREITAS; ARAUJO, 2009); Mut1 - *S. clavuligerus* 45.41 (*screening* de Mut0); e Mut2 – colônia de Mut1 melhor produtora de Hol, obtida durante este trabalho. As linhagens encontram-se estocadas em ampolas e liofilizadas sob a forma de células vegetativas, e os esporos foram estocados em criotubos à -80°C em solução de glicerol a 20% v/v.

4.1.2. Bactéria-teste

Foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* ESS 2235, gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Paloma Liras, da Faculdade de Biologia da Universidade de Leon, Espanha (LIRAS; MARTIN, 2005), como bactéria teste para bioensaio de quantificação de CefC.

4.2. Meios de Cultura

4.2.1. Meio sólido de cultivo de bactéria-teste

A *E. coli* ESS 2235 foi cultivada em meio agar nutriente (Difco 0001), indicado pela ATCC, conforme indicado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Composição do meio agar nutriente (Difco 0001).

<i>Componentes</i>	<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>
Peptona	5,0
Extrato de Carne	3,0
Agar bacteriológico	15,0
Ph	6,8 ± 0,1

4.2.2. Meio de esporulação de *S. clavuligerus* (SB)

Esporos foram obtidos cultivando-se as células reativadas em meio proposto por Sánchez e Braña (1996), descrito na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Composição do meio de esporulação.

<i>Componentes</i>	<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>
Extrato de levedura	0,5
Extrato de carne	0,5
Caseína hidrolisada ácida	1,0
Glicose	5,0
MOPS	21,0
Agar	20,0
pH	7,0 ± 0,1

4.2.3. Meio de reativação de *S. clavuligerus* (RC)

Meio modificado para reativação de esporos e propagação de micélios (READING; COLE, 1977).

Tabela 4.3 - Composição do meio de reativação.

<i>Componentes</i>	<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>
Glicerol	20,0
Peptona bacteriológica	20,0
Extrato de malte	10,0
K ₂ HPO ₄	2,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75
MOPS	21,0
Solução de sais ^(a)	1 mL
pH	6,8 ± 0,1

(a) Solução de sais (g.L⁻¹): MnCl₂·4H₂O (1,0); FeSO₄·7H₂O (1,0); ZnSO₄·7H₂O (1,0).

4.2.4. Meio de germinação de esporos e de micélios (MG)

Para a germinação de esporos e propagação de micélios foi utilizado o meio descrito na Tabela 4.4, proposto por Kieser e colaboradores (2000), adicionado extrato de malte.

Tabela 4.4 - Composição do meio de germinação (MG).

<i>Componentes</i>	<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>
Triptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	10,0
MOPS	21,0
pH	6,8 ± 0,1

4.2.5. Meios utilizados para preparo de inóculo (MI)

Para o preparo do inóculo, foram utilizados os meios, sintético e complexo, conforme descrição da Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Composição geral dos meios de preparo do inóculo, sintético e complexo.

<i>Componentes</i>	<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>	<i>Sintético</i>	<i>Complexo</i>
Maltose	10,0	X	X
Lisina	4,0	X	
Proflo ^{®(a)} bruto	8,5		X
Extrato de levedura	1,0	X	X
Glutamato de Na	5,5	X	
K ₂ HPO ₄	0,8	X	X
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75	X	X
MOPS	21,0	X	X
Solução de sais ^(b)	10,0 MI	X	X
Elementos traços ^(c)	1,0 MI	X	
pH	6,8±0,1	X	X

(a) Farinha de semente de algodão, gentilmente cedida pela empresa Traders[®] Protein (Lubbock, Texas, EUA).

(b) Solução de sais (g.L⁻¹): MnCl₂·4H₂O (1,0); FeSO₄·7H₂O (1,0); ZnSO₄·7H₂O (1,0).

(c) Solução de elementos traços (g.L⁻¹): CuSO₄·5H₂O (0,49); CoCl₂ (0,28); Na₂MoO₄ (0,15).

4.2.6. Meios utilizados para produção de antibióticos (MP)

Para a fermentação principal foram utilizados os meios, sintético e complexo, descritos na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Composição geral dos meios de fermentação principal, sintético e complexo.

<i>Componentes</i>	<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>	<i>Sintético</i>	<i>Complexo</i>
Lisina	18,3	X	X
Proflo [®] (a) filtrado	8,5		X
Maltose	10,0	X	X
Extrato de levedura	0,5		X
K ₂ HPO ₄	1,75	X	X
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75	X	X
CaCl ₂	0,2	X	X
NaCl	2,0	X	X
MOPS	21,0	X	X
Solução de sais ^(b)	5,0 ml	X	X
Elementos traços ^(c)	1,0 ml	X	
Tiosulfato de sódio ^(d)	1,0	X	X
pH	6,8±0,1	X	X

(a) Farinha de semente de algodão, gentilmente cedida pela empresa Traders[®] Protein (Lubbock, Texas, EUA).

(b) solução de sais (g.L⁻¹): MnCl₂·4H₂O (1,0); FeSO₄·7H₂O (1,0); ZnSO₄·7H₂O (1,0).

(c) solução de elementos traços (g.L⁻¹): CuSO₄·5H₂O (0,49); CoCl₂ (0,28); Na₂MoO₄ (0,15).

(d) Adicionados em 30 horas de processo (MERCK, 1975).

4.3. Equipamentos

1. Mesas rotatórias-incubadoras (New Brunswick - NB; Nova Ética), providas de controles de agitação e temperatura, para os experimentos em frascos agitados; 2. espectrofotômetro (UV e luz visível) (Pharmacia); 3. cromatógrafo de fase líquida (HPLC) para a determinação de concentrações de antibiótico e substratos do caldo fermentativo (Shimadzu); 4. ultra-freezer (NB); 5. liofilizador (Thermo) para preparar as ampolas de células liofilizadas; 6. câmara de fluxo laminar (Trox) para a manipulação asséptica dos materiais; 7. microscópio (Canon) para procedimentos como contagem de esporos, acompanhamento da morfologia do microrganismo ao longo das fermentações, etc.

Durante a execução do experimento também foi usado uma série de equipamentos de apoio, por exemplo: balança analítica (Sartorius), estufas (Nova Ética), pHmetros (Micronal), autoclaves (Phoenix), centrífuga refrigerada (Eppendorf, mod. 5810 R), agitadores magnéticos (Corning), banhos termostatizados (Nova Ética) e microcomputadores para o tratamento dos dados experimentais.

4.4. Manipulação, preparo e estocagem das linhagens de *S. clavuligerus*

4.4.1. Obtenção de células/espores do microrganismo

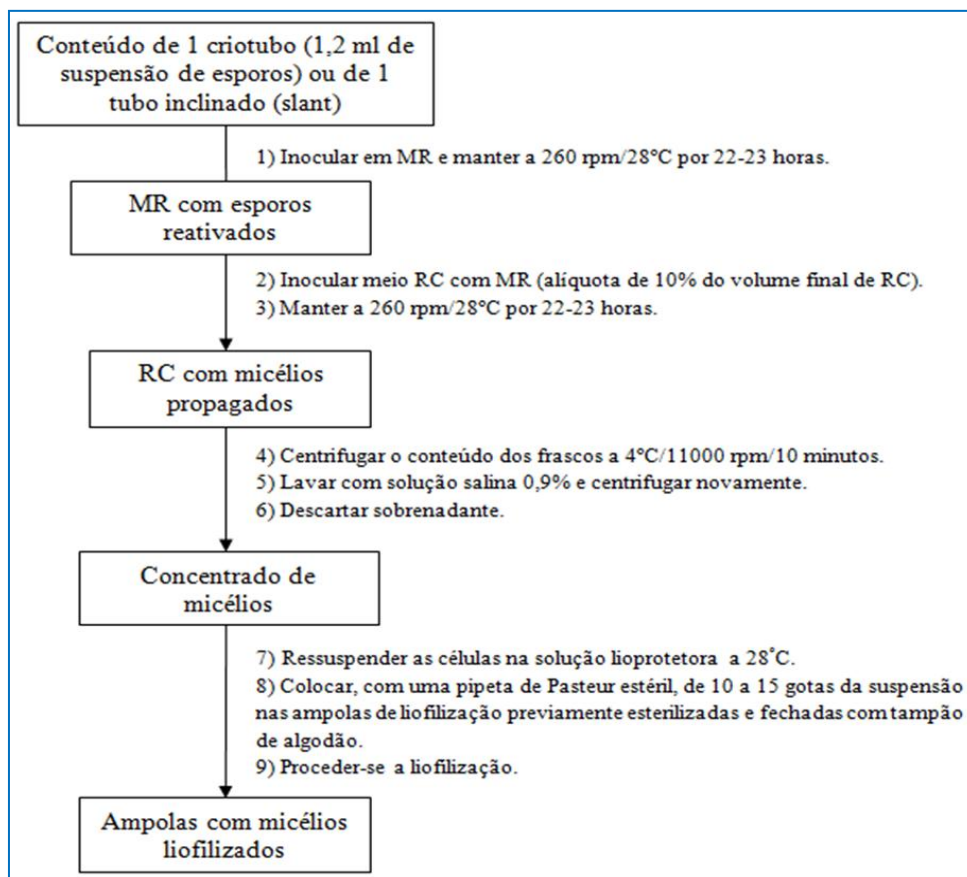
4.4.1.1. Reativação de células liofilizadas - As células liofilizadas foram reidratadas em meio nutriente indicado pela ATCC, contendo (em g·L⁻¹): triptona (5,0) e extrato de levedura (3,0), pH 7,0 ± 0,2. Estas permaneceram por 10 a 15 dias, com temperatura controlada em 28°C e sem agitação. As células reidratadas foram reativadas por 24 horas em mesa-incubadora rotativa (28°C, 260 rpm - 5 cm de excentricidade) em meio de reativação descrito na Tabela 4.3.

4.4.1.2. Obtenção de esporos - Esporos foram obtidos cultivando-se as células reativadas, em meio de esporulação descrito na Tabela 4.2, por um período de 7 a 10 dias com temperatura controlada de 28°C.

4.4.2. Armazenamento das células/espores obtidas

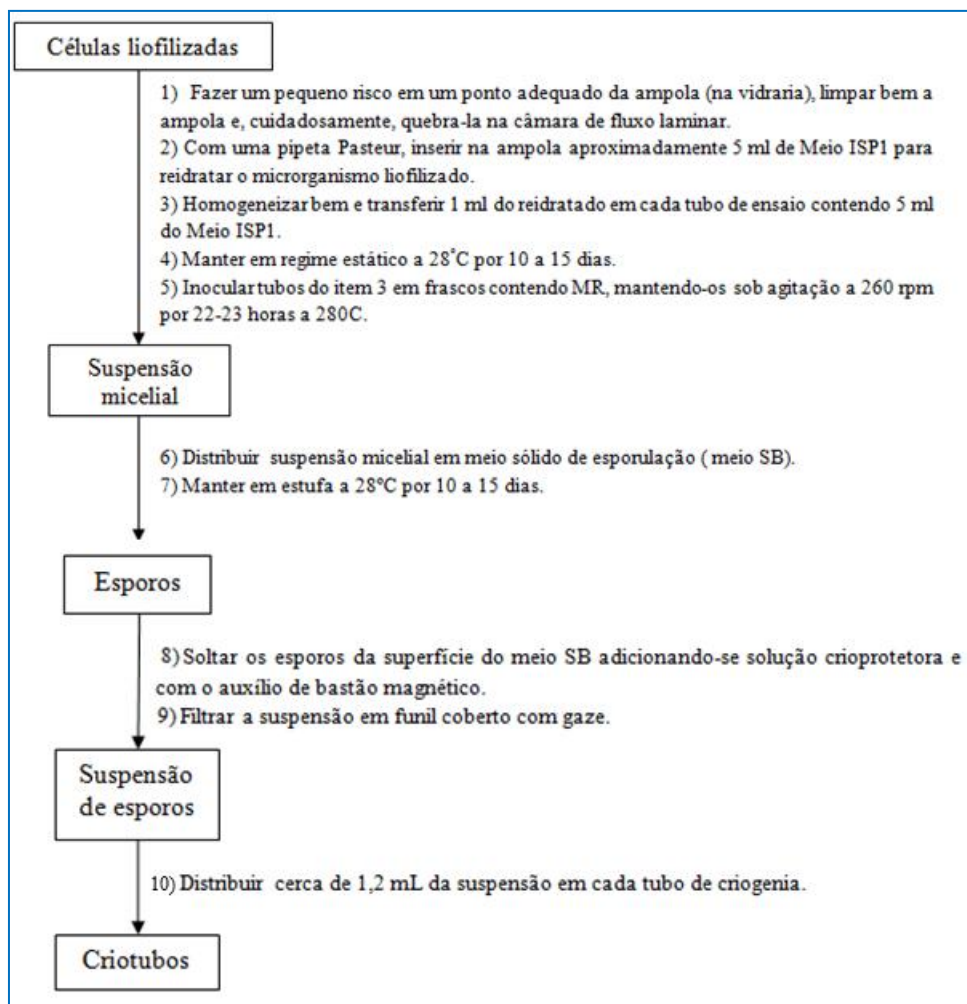
4.4.2.1. Preparação de células para a liofilização - Para a confecção das ampolas de liofilizado foi necessário a obtenção de micélios a partir de esporos. Os procedimentos do protocolo estão ilustrados na Figura 4.1.

Figura 4.1 - Procedimentos do protocolo de confecção de ampolas.



4.4.2.2. Preparação de esporos para criogenia – as células liofilizadas foram reativas e esporuladas, a suspensão de esporos obtida foi armazenada em tubos de criogenia e congelada à -80°C (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Procedimentos do protocolo de confecção de criotubos.

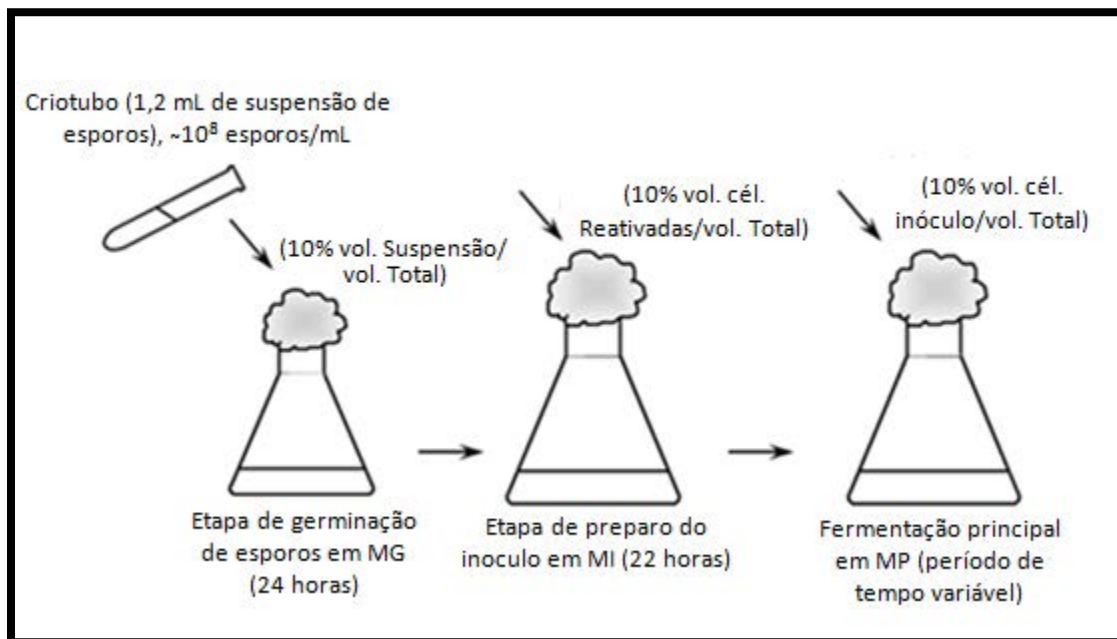


4.4.3. Condições gerais dos cultivos submersos para a produção de compostos bioativos

A produção da maioria dos compostos bioativos ocorre na fase estacionária, período em que a concentração de microrganismos se mantém constante, logo, mantê-los nessa fase por maior tempo favorece o aumento da produção. Para tal, foram empregados processos em batelada, onde frascos erlenmeyer foram agitados em mesa rotatória incubadora com temperatura controlada em 28°C e frequência de rotação de 260 rpm, e as amostras retiradas em 48 e 72 horas de processo. Todas as etapas desses processos estão esquematizadas na Figura 4.3. Primeiramente o microrganismo foi posto em um meio de germinação (MG), conforme composição descrita na Tabela 4.4 por um período de 24 horas. Após a etapa de

germinação, uma alíquota do MG é passada para o meio de preparo de inóculo (MI), descrito na Tabela 4.5, onde permaneceu por um período de 22 horas. Por último uma alíquota do inóculo foi transferida para o meio de produção (MP) (Tabela 4.6) para realizar a fermentação principal, a qual teve duração variável entre 48 e 72 horas.

Figura 4.3 - Etapas de cultivo de *S. clavuligerus* em frascos agitados.



4.5. Métodos analíticos

4.5.1. Coleta e armazenamento das amostras

Foram coletadas amostras em 48 e 72 horas de fermentação. Após a coleta, o caldo fermentativo foi centrifugado por 10 minutos, com rotação de 11000 rpm e temperatura de 4°C. O sobrenadante coletado foi armazenado no ultrafreezer (-80°C) para posterior quantificação de antibióticos.

4.5.2. Determinação da biomassa

Após a coleta do sobrenadante, o precipitado contendo a massa celular foi novamente centrifugado com água destilada para a remoção de impurezas, sendo o "pellet"

resultante seco em estufa a 105°C em recipiente previamente pesado, por um período de 24 horas. Em seguida, a biomassa seca foi resfriada até a temperatura ambiente (em dessecador) e pesada. Sabendo o volume de amostra, obteve-se a concentração celular em termos de massa seca por volume de meio de cultura ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

4.5.3. Determinação de CefC através de bioensaio de difusão em agar

Para quantificar a produção de CefC utilizou-se o método de difusão em agar, onde são medidos os halos de inibição produzidos em meio sólido inoculado com *Escherichia coli*. Para tal, a bactéria teste foi cultivada em tubos contendo meio agar nutriente (Tabela 4.1) por 24 horas a uma temperatura de 37°C. Em seguida foi preparada uma suspensão de *E. coli*, adicionando-se 10 mL de solução salina (0,9%) a cada tubo, a suspensão foi lida em espectrofotômetro a 600nm. Devido ao fato de *S. clavuligerus* produzir outros compostos com atividade antimicrobiana além de CefC, como a penicilina N, foram realizados tratamentos com as amostras para depois proceder-se com o bioensaio. A penicilina N do caldo fermentativo, dependendo das condições da fermentação, é excretada no meio de produção em quantidades significativas (ZHANG; WOLFE; DEMAIN, 1987). Então, para eliminá-la, utilizou-se a solução enzimática BD Difco TM Penase®, diluída e adicionada a uma proporção de 25 μL de enzima por mL de amostra também diluída, reagindo-se por um período de 20 minutos.

A cada 120 mL de meio agar nutriente ainda fluido ($\sim 46^\circ\text{C}$) foram adicionados uma quantidade previamente calculada, de acordo com a leitura em espectrofotômetro, de suspensão bacteriana. Em cada placa de 150 mm de diâmetro foram vertidos 40 mL do meio contendo a bactéria teste. Após solidificação do meio, foram perfurados oito poços (5 mm de diâmetro), aos quais foram adicionados 20 μL da solução de amostra e antibiótico, adequadamente diluídas. As placas, em duplicatas, foram incubadas por 18 horas a uma temperatura de 37°C, em seguida os halos de inibição foram medidos com paquímetro. O diâmetro dos halos foram plotados em uma curva de calibração previamente construída para se obter, então, a concentração em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de antibiótico produzido.

4.5.4. Determinação de AC

AC foi quantificado através de método proposto por Bird, Bellis e Gasson (1982), no qual a amostra é derivatizada previamente com imidazol ($60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) por 12 minutos a 30°C . Após a reação, a solução é resfriada rapidamente, sendo o produto da reação (1-(4-aza-8-hydroxy-6-oxo)oct-2-en-1-oylimidazol) determinado através de leitura em espectrofotômetro (312 nm). Assim como para CefC, para AC também foi construída uma curva de calibração com um padrão, onde obteve-se a concentração em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ do mesmo.

4.5.5. Determinação de Hol

Para separar Hol do meio de cultura realizou-se uma extração líquido-líquido com butanol (KENIG; READING, 1979). Um volume de 0,9 mL da amostra foi misturada com 0,9 mL de butanol e a solução resultante foi centrifugada por 4 minutos a 11000 rpm e 4°C . A fração butanólica foi, então, analisada em um equipamento de HPLC acoplado a detector ultravioleta ajustado em comprimento de onda de 360 nm. Utilizou-se uma coluna de fase reversa C 18 e forno a 30°C . A fase móvel consistiu da mistura água:metanol na proporção 60:40.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Formulação de meio padrão para a produção de compostos bioativos

Na seleção de meios de cultura deve-se considerar a presença de nutrientes que servem como fonte de energia e de carbono para os microrganismos, sendo que as necessidades nutricionais geralmente são específicas. Tem-se observado que, normalmente as populações fúngicas se desenvolvem melhor em meios com alta relação carbono-nitrogênio, enquanto que para as populações bacterianas o melhor desenvolvimento acontece em meios com baixa relação carbono-nitrogênio (GRAY; WILLIAMS, 1975).

Para o cultivo de *S. clavuligerus* não é necessário adicionar vitaminas ou fatores de crescimento no meio, porém, algumas condições específicas são necessárias, como uma fonte de carbono orgânica, uma fonte de nitrogênio orgânica ou inorgânica, alguns sais minerais, temperatura entre 25 e 35°C e pH entre 6,5 e 8,5.

A escolha das fontes de C e N utilizadas no cultivo desta bactéria pode levar à produção específica de compostos bioativos. A maltose, o glicerol e a dextrina são ótimas fontes de carbono para a síntese destes metabólitos (PRUES e KELLETT, 1983). Segundo a literatura, o glicerol é um precursor direto da biossíntese de AC (ROMERO et al., 1984), porém, adotou-se a maltose como fonte de carbono, uma vez que, o foco do trabalho foi a produção de Hol. Já como fonte de nitrogênio, utilizou-se farinha de semente de algodão (marca: Proflo[®]) (MAYER; DECKWER, 1996).

Um meio balanceado permite o aumento da produção de bioativos, sendo assim, visou-se melhorar as condições de cultivo de *S. clavuligerus*, pelos nutrientes existentes no meio de cultura.

5.1.1. Comparação da produção de bioativos em meios sintético e complexo

Neste experimento foram avaliados o crescimento celular (Figura 5.1) e a produção de bioativos (Figuras 5.2 a 5.4) das linhagens selvagem e mutante de *S. clavuligerus*, ATCC e n. 45 (Mut0), respectivamente, em dois meios de cultura já descritos, um sintético e um complexo, utilizando-se Lisina como fonte de nitrogênio.

Segundo a literatura, Hol normalmente afeta a velocidade de crescimento de linhagens de *S. clavuligerus*, pois este microrganismo não é resistente ao seu mecanismo

de ação (QIN et al., 2013). Comparando-se os dados obtidos, observa-se nas Figuras 5.1 e 5.2, que o ATCC apresentou uma maior concentração celular do que a linhagem mutante, porém, este último mostrou-se melhor produtor de Hol, confirmando a influência deste biocomposto no crescimento do microrganismo.

Figura 5.1 - Biomassa das linhagens selvagem e Mut0 obtida durante o processo de fermentação em meios sintético e complexo contendo Lisina, com 48 e 72 horas de processo.

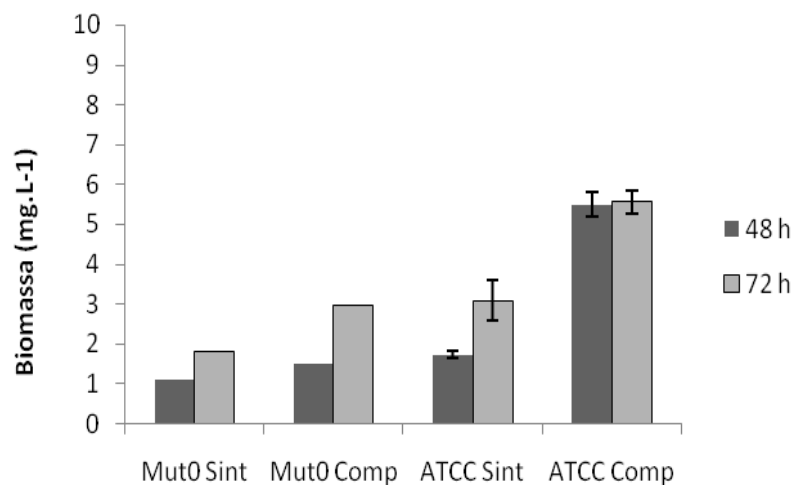
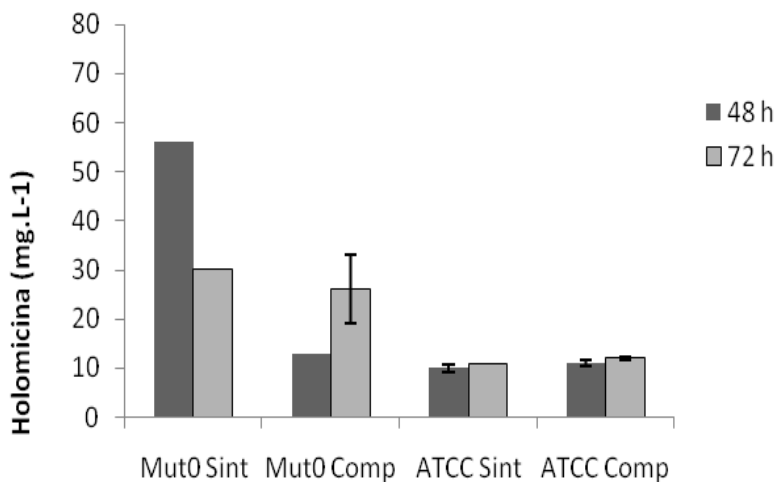


Figura 5.2 - Comparação da produção de Hol pelas linhagens selvagem e Mut0, em meios sintético e complexo contendo Lisina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.



Em relação à produção de CefC e AC, observa-se nas Figuras 5.3 e 5.4 (respectivamente), que, em relação aos mutantes, a linhagem selvagem produziu uma concentração maior de ambos os compostos. De uma maneira geral, todos os bioativos foram produzidos por ambas as linhagens em maior concentração em meio sintético, logo, este meio foi adotado como padrão.

Figura 5.3 - Comparação da produção de CefC pelas linhagens selvagem e Mut0, em meios sintético e complexo contendo Lisina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.

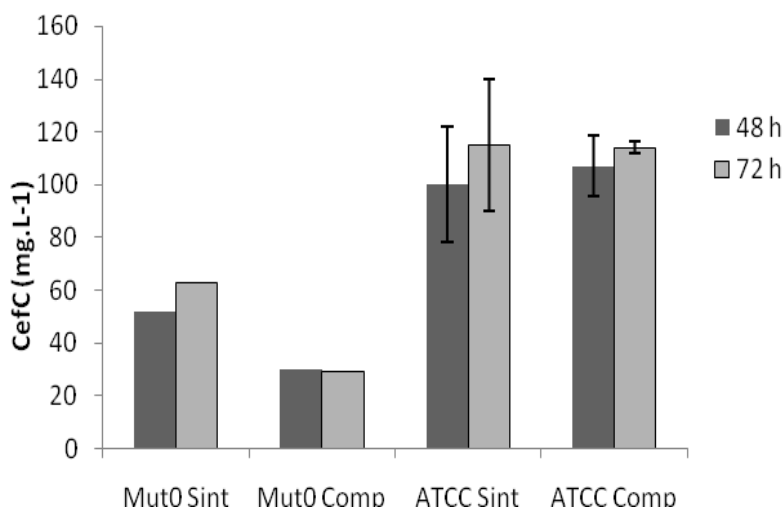
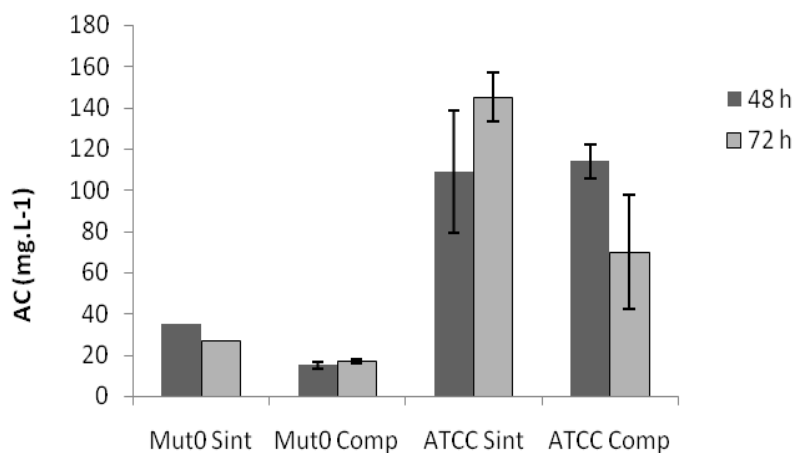


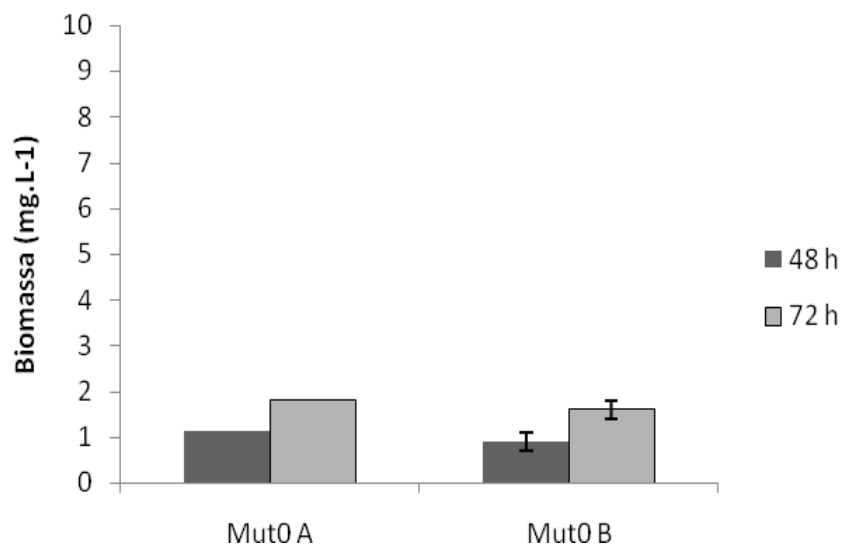
Figura 5.4 - Comparação da produção de AC pelas linhagens selvagem e Mut0, em meios sintético e complexo contendo Lisina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.



5.1.2. Influência da adição ou não de tiosulfato de sódio no meio de produção

A produção de CefC pela linhagem selvagem, e por outros microrganismos, requer a adição de uma fonte de enxofre preferencialmente inorgânica, a qual, segundo a literatura deve ser adicionada após a fase exponencial de crescimento (MERCK, 1975). Nesta etapa, foram avaliados o crescimento celular (Figura 5.5) e a produção de bioativos (Figuras 5.6, a 5.8) da linhagem *S. clavuligerus* 45 (Mut0), em meio sintético, adicionando ou não tiosulfato de sódio com 30 horas de processo. Na Figura 5.5 observa-se que a concentração celular em ambas as condições se manteve da mesma ordem de grandeza, não tendo influência da fonte de enxofre.

Figura 5.5 - Biomassa de Mut0 obtida durante o processo de fermentação em meio sintético contendo Lisina, com (A) ou sem (B) a adição de tiosulfato, em 48 e 72 horas de processo.



Pela Figura 5.6, nota-se que em meio contendo tiosulfato de sódio (Mut0 A), a produção de CefC manteve-se da mesma ordem de grandeza da obtida no experimento anterior (Figura 5.3). Já no meio sem a adição de tiosulfato de sódio (Mut0 B) foram observados insignificantes decréscimos de CefC, porém, aumento nas produções de AC e Hol (Figuras 5.7 e 5.8, respectivamente).

Figura 5.6 - Comparação da produção de CefC por Mut0, em meio sintético contendo Lisina, com (A) ou sem (B) a adição de tiosulfato, em 48 e 72 horas de processo.

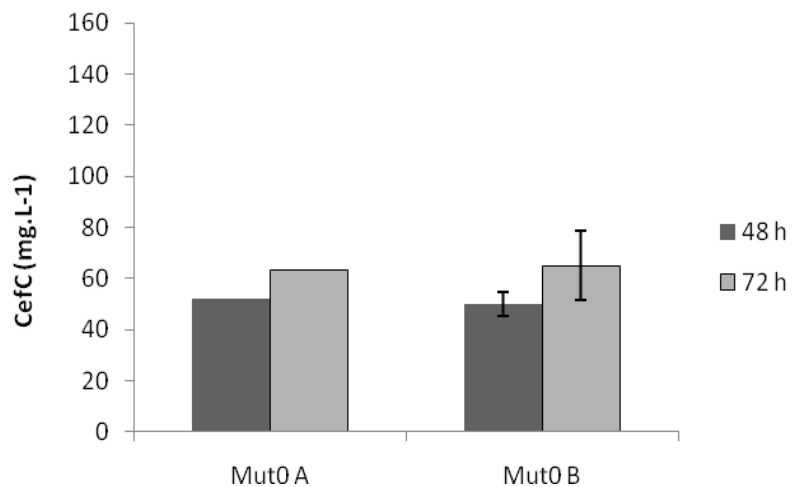


Figura 5.7 - Comparação da produção de AC por Mut0, em meio sintético contendo Lisina, com (A) ou sem (B) a adição de tiosulfato, em 48 e 72 horas de processo.

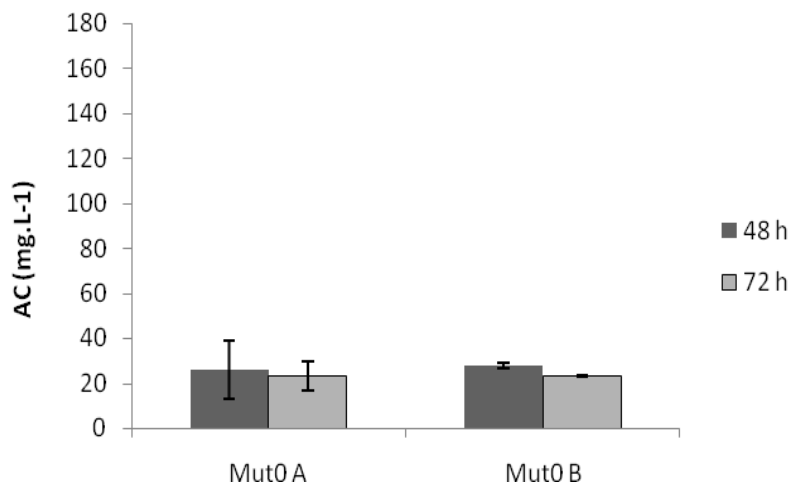
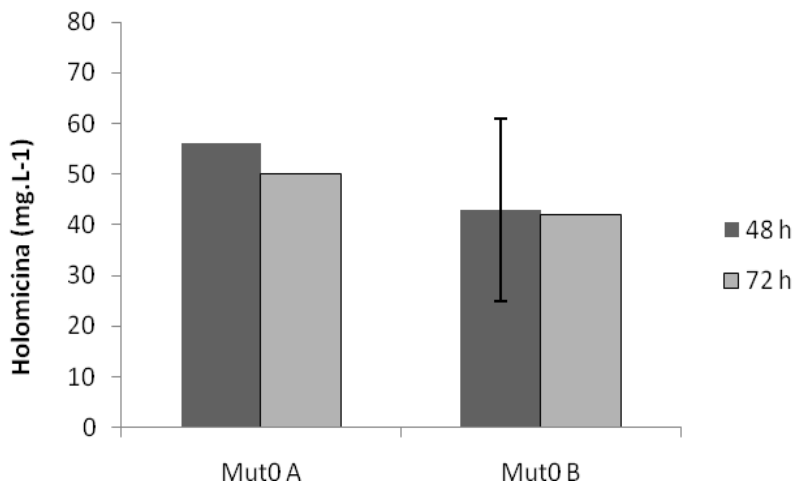


Figura 5.8 - Comparação da produção de Hol por Mut0, em meio sintético contendo Lisina, com (A) ou sem (B) a adição de tiosulfato, em 48 e 72 horas de processo.



Como não houve diferenças significativas nas produções de bioativos e nem na biomassa de Mut0, optou-se por manter a adição de tiosulfato de sódio, em 30 horas de processo, no meio padrão de produção.

5.1.3. Comparação da capacidade produtiva de bioativos entre as linhagens mutantes

Adotando-se a linhagem selvagem como referência, foram comparadas a concentração celular (Figura 5.9) e a capacidade produtiva (Figuras 5.10, 5.11 e 5.12) das linhagens mutantes: *S. clavuligerus* 45 (Mut0), *S. clavuligerus* 45.41 (Mut1) e Mut2, em busca do melhor produtor de hol.

Observa-se nos gráficos das Figuras 5.9 e 5.10 uma relação inversamente proporcional entre a biomassa e a concentração de Hol. Este comportamento ressaltou, mais uma vez, a influência negativa deste biocomposto sobre o crescimento celular. Analisando as produções de bioativos (Figuras 5.10 a 5.12), observa-se, de uma maneira geral, que Mut1 além de produzir cerca de 6 vezes menos Hol que Mut0 e Mut2, produziu CefC e AC em concentrações pouco maior.

Figura 5.9 - Biomassa de Mut0, Mut1 e Mut2 obtida durante o processo de fermentação em meio sintético contendo Lisina, com 48 e 72 horas de processo.

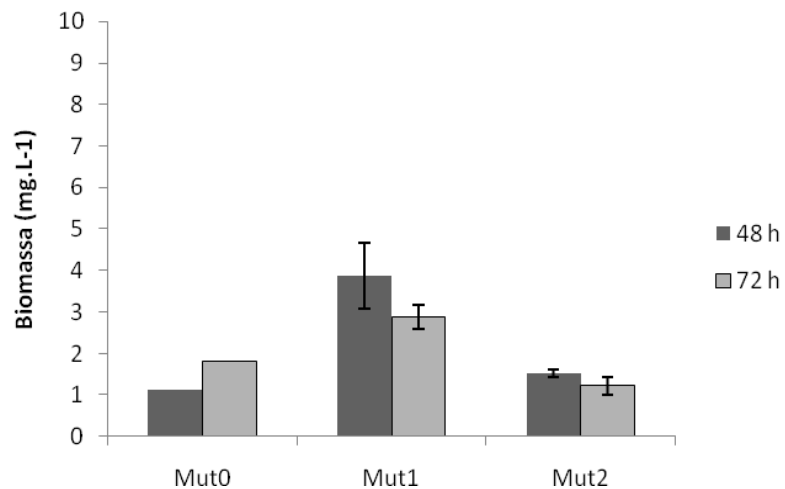


Figura 5.10 - Comparação da produção de Hol pelas linhagens Mut0, Mut1 e Mut2 em meio sintético contendo Lisina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.

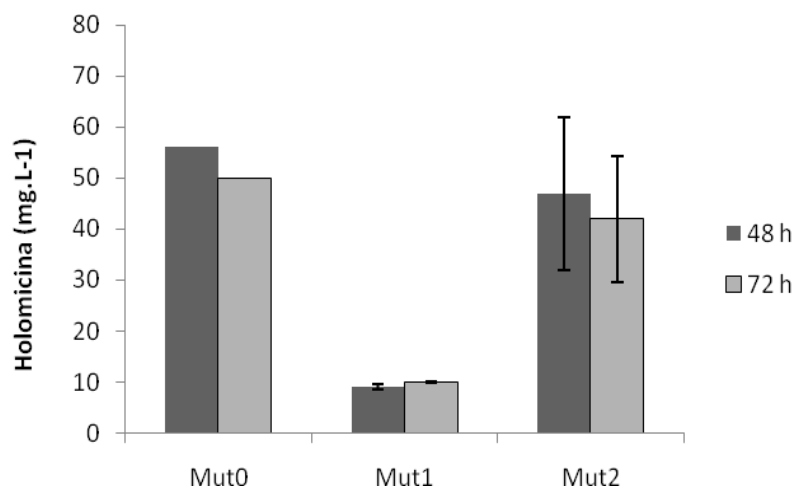


Figura 5.11 - Comparação da produção de CefC pelas linhagens Mut0, Mut1 e Mut2, em meio sintético contendo Lisina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.

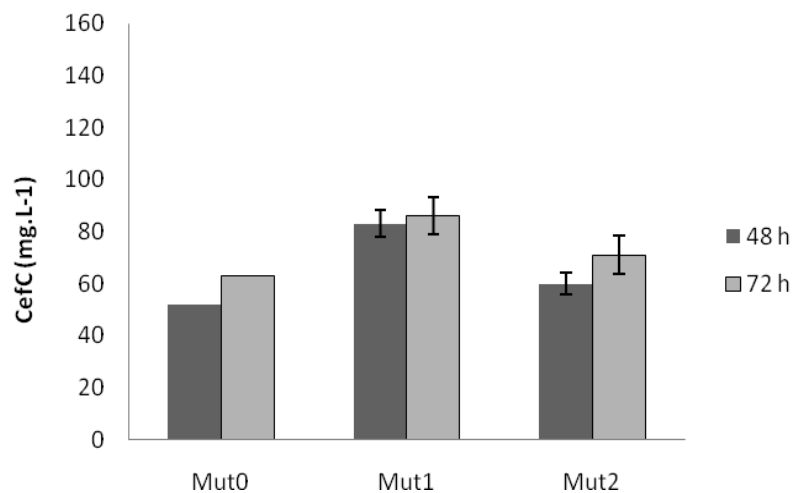
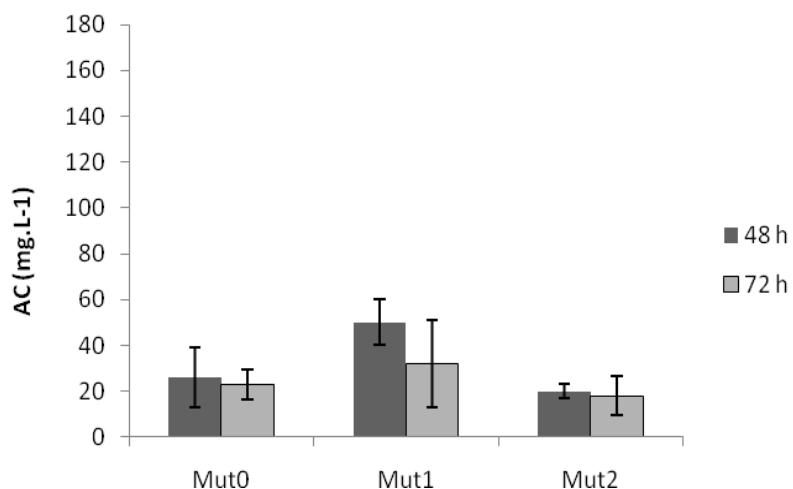


Figura 5.12 - Comparação da produção de AC pelas linhagens Mut0, Mut1 e Mut2, em meio sintético contendo Lisina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.



5.1.4. Influência da Arginina como fonte de nitrogênio no meio de cultura

Assim como o glicerol, a Arg também age como precursor direto na biossíntese de AC, exercendo uma estimulação concentração dependente na mesma (ROMERO et. al,

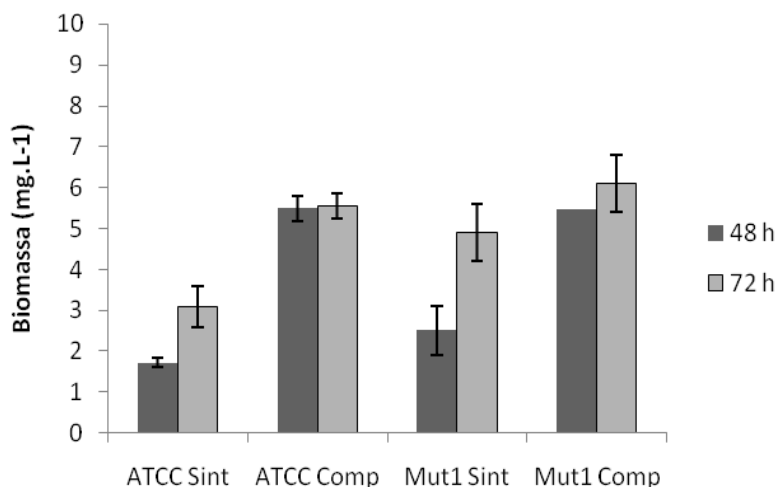
1986; LIRAS e RODRIGUES-GARCIA, 2000). Como relatado por Yin e colaboradores (2012), há uma inter-regulação entre a Arginina e AC, CefC e AC, e AC e Hol em linhagens de *S. clavuligerus*. No tipo selvagem, excesso de Arg extracelular resultou em um aumento da produção de AC.

De La Fuente e colaboradores (2002) estudaram o efeito de Arg na formação de AC, e observaram uma cor levemente amarelada nos caldos de cultura de mutantes bloqueados em etapas da rota biossintética do biocomposto. Estes autores obtiveram aumentos de Hol, nas primeiras horas de fermentação, variando de 2 a 10 vezes, dependendo da estirpe e do tempo de cultura. Demonstrando assim, a possibilidade de se obter altos níveis de Hol em meios contendo excesso de Arg com estes microrganismos.

Nesta etapa, para avaliar o crescimento celular (Figura) e a produção de Hol (Figura) pelas linhagens, selvagem e Mut1, foram utilizados para inóculo e produção os meios descritos nas Tabelas 5.5 e 5.6, respectivamente. Porém, substituiu-se Lisina por Arginina ($1,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em MI e $3,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em MP); para tal, calculou-se a concentração de Arg ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$) para substituir Lis ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$) considerando-se a quantidade de nitrogênios em cada molécula.

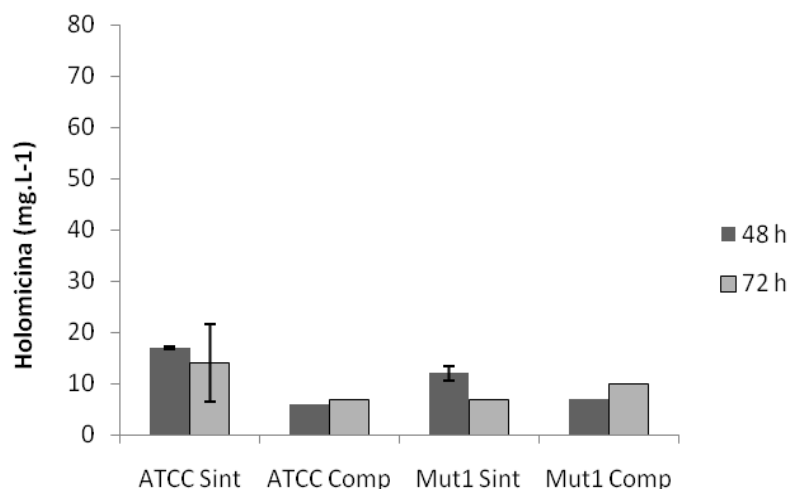
A Figura 5.13 apresenta o gráfico com as biomassas obtidas em fermentação contendo Arg como fonte de nitrogênio, nele se pode observar que ambas as linhagens (ATCC e Mut1) apresentaram maior concentração celular, quando comparadas à fermentação contendo Lis (Figuras 5.1).

Figura 5.13 - Biomassa das linhagens selvagem e Mut1 obtida durante o processo de fermentação em meios sintético e complexo contendo Arginina, com 48 e 72 horas de processo.



Já na produção de bioativos, não foi observado o efeito estimulador de Arg sobre a produção de Hol pelo mutante, como relatado na literatura (DE LA FUENTE et al., 2002). Logo, sugere-se que, aparentemente Mut1 não apresenta danos no elemento regulador multifuncional das sínteses de AC e CefC, *ccaR* ("cephamycinandclavulanicacid-Regulator") (SANTAMARTA et al., 2005), como apresentaram as linhagens *S. clavuligerus ccaR::aph* investigadas por De La Fuente e colaboradores (2002).

Figura 5.14 - Comparação da produção de Hol pelas linhagens selvagem e Mut1, em meios sintético e complexo contendo Arginina, obtidos com 48 e 72 horas de processo.



Como Arg não se comportou conforme esperado, e a produção de Hol foi baixa para ambas as linhagens tanto em meio sintético quanto em meio complexo, manteve-se o aminoácido Lis como fonte de nitrogênio nos meios de fermentação.

5.2. Comparação da estabilidade produtiva de Hol pelas linhagens mutantes, com esporos recém-cultivados e estocados em solução crioprotetora

Os resultados obtidos até agora mostraram que a diferença mais evidente quando comparado todos os dados de produção, tanto da linhagem selvagem quanto das linhagens mutantes, foi a maior produção de Hol pelos mutantes, com exceção de Mut1. Sendo assim, nesta última etapa do trabalho, investigou-se e comparou-se a estabilidade de produção deste composto apenas com os mutantes.

Para tal, utilizou-se como inóculo, esporos armazenados em criotubos (-80°C) e suspensão fresca de esporos, esta última preparada a partir de esporos resultantes de repique em meio sólido (Tabela 4.2) de células dos criotubos, a fim de verificar se o armazenamento de esporos em criogenia afeta de alguma forma a produção de Hol. Comparando-se as biomassas obtidas nos dois casos (Figuras 5.15 e 5.16), observam-se maiores concentrações celulares partindo-se de suspensão fresca de esporos.

Figura 5.15 - Biomassa de Mut0, Mut1 e Mut2, provenientes de esporos em criotubos (-80°C) obtida durante o processo de fermentação em meios sintético contendo Lisina, com 48 horas de processo.

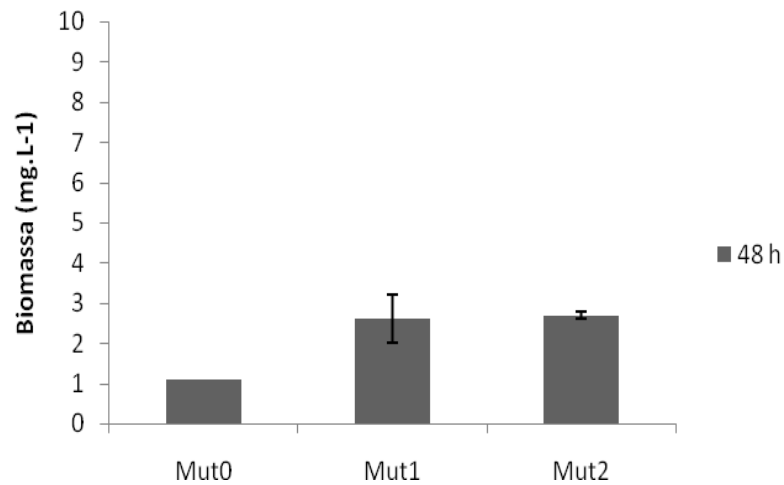
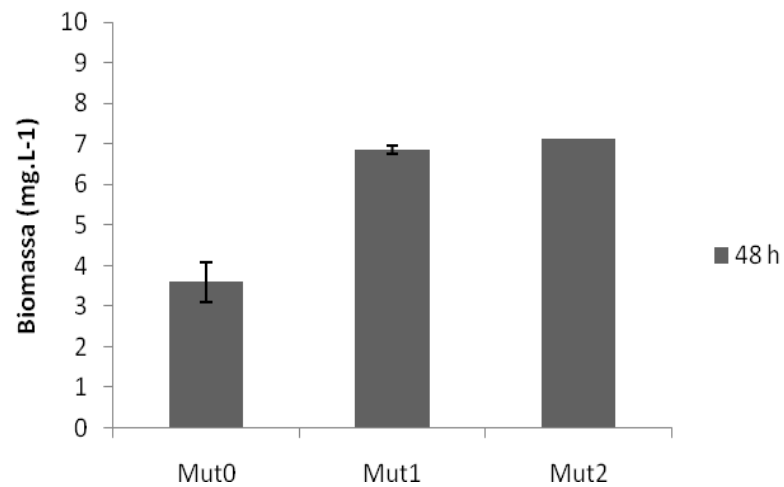


Figura 5.16 - Biomassa de Mut0, Mut1 e Mut2, provenientes de suspensão fresca de esporos, obtida durante o processo de fermentação em meios sintético contendo Lisina, com 48 horas de processo.



Com relação à Hol, enquanto o mutante original (Mut0) perdeu sua capacidade produtiva, os mutantes Mut1 e Mut2 mantiveram-se estáveis.

Figura 5.17 - Comparação da produção de Hol por Mut0, Mut1e Mut2, provenientes de criotubos(-80°C), em meio sintético contendo Lisina, com 48 horas de processo.

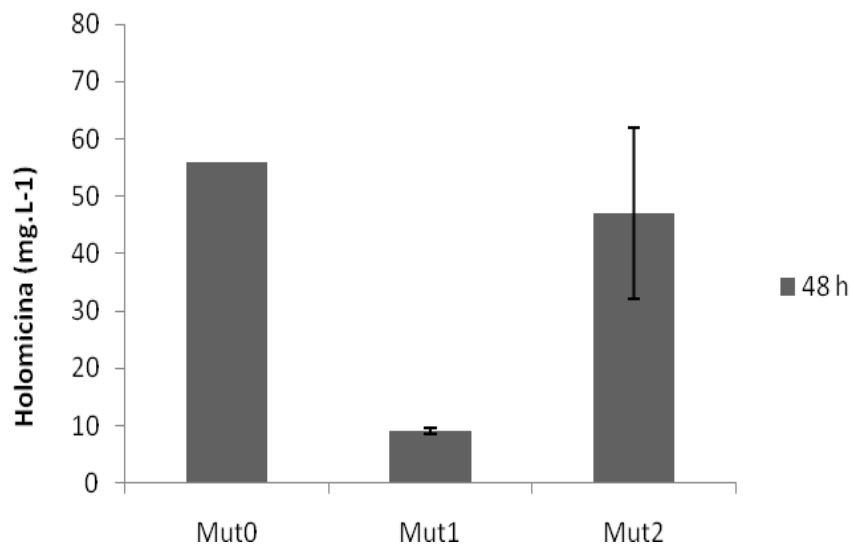
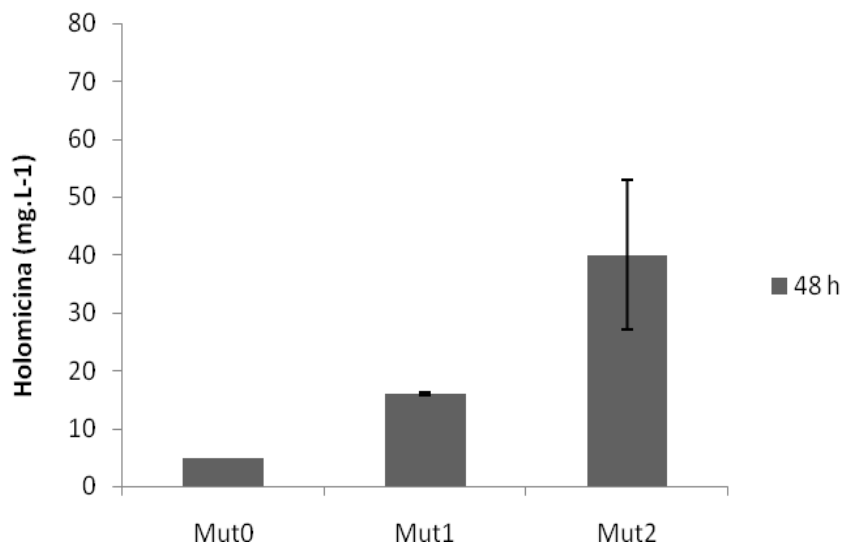


Figura 5.18 - Comparação da produção de Hol por Mut0, Mut1e Mut2, provenientes de suspensão fresca de esporos, em meio sintético contendo Lisina, com 48 horas de processo.



6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

Entre o meio sintético, contendo apenas Lisina, e o meio complexo, contendo Lisina e extrato de semente de algodão, como fontes de nitrogênio, o primeiro mostrou-se o mais adequado para a produção de Hol pelos mutantes e para os demais biocompostos (CefC e AC) pela linhagem selvagem; o meio sintético foi, então, adotado com meio de referência;

As fermentações nas quais foram obtidas as maiores concentrações de Hol indicaram uma possível relação entre baixa concentração de células e maior produção do biocomposto;

A adição de tiosulfato de sódio não influenciou a produção de nenhum dos biocompostos;

Comparando-se os mutantes estudados, Mut0, Mut1 e Mut2, observaram-se diferenças significativas na capacidade de produção dos três biocompostos;

Apesar de Arginina ser indicada na literatura como estimulador da produção de Hol em linhagens de *S. clavuligerus* bloqueados nas etapas finais da rota biossintética de AC, sua presença no meio de cultura aparentemente não se mostrou eficiente nas linhagens testadas;

Com relação à produção de Hol considerando-se a origem dos esporos utilizados como inóculo: (a) o armazenamento em criotubos (-80°C) mostrou-se adequado para todos os mutantes; (b) a suspensão fresca de esporos não foi um bom inóculo somente para o cultivo de Mut0, o qual perdeu praticamente toda sua capacidade de produção, comparando-se com os resultados obtidos com o inóculo de criotubos.

REFERÊNCIAS

- ANTONIO, T.; FREITAS, T. L.; ARAUJO, M. L. G. C. Métodos de seleção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* a partir de tratamento com MMS. In: SEMINÁRIO DO PROJETO TEMÁTICO (PROC. FAPESP 05/55079-4), 3., 2009, São Carlos. **Anais...** São Carlos: EDUFSCar, 2009. p. 88-94.
- ARAUJO, M. L. G. C.; GIORDANO, R. C.; HOKKA, C. O. Studies on the respiration rate of free and immobilized cells of *Cephalosporium acremonium* in cephalosporin C production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, p. 593-600, 1999.
- BIRD, A. E.; BELLIS, J. M.; GASSON, B. C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. **Analyst**, v.107, p. 1241-1245, 1982.
- BRAKHAGE, A. A.; AL-ABDALLAH, Q.; TÜNCHER, A.; SPRÖTE, P. Evolution of beta-lactam biosynthesis genes and recruitment of trans-acting factors. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1200-1210, 2005.
- BROTZU, G. Ricerche su di un nuovo antibiotico. **Lavori dell' Instituto d'Igiene di Cagliari**, v. 1, p. 1-7, 1948.
- BRUNDTLAND, G. H. A message from the director-general, World Health Organization. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization report on infection diseases 2000: overcoming antimicrobial resistance**. Geneva, 2000. Disponível em: <www.who.int/infectious-disease-report/2000/>. Acesso em: 18 set. 2013.
- BUSSARI, B.; SURVASE, S. A.; SAUDAGAR, P. S.; SINGHAL, R. S. An integrated approach for production of cephamycin C using *Streptomyces clavuligerus* NT4: sequential optimization of production medium and effect of amino acids. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 3, n. 4, p. 372-384, 2009.
- CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 14555-14561, 2003.
- CHEN, C. W. The unstable ends of *Streptomyces* linear chromosomes: a nuisance without cures? **Trends in Biotechnology**, v. 13, p. 157-160, 1995.
- DARY, A.; MARTIN, P.; WENNER, T.; LEBLOND, P.; DECARIS, B. Evolution of the linear chromosomal DNA in *Streptomyces*: is genomic variability developmentally modulated? **Research Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 439-445, 1999.

DE LA 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, p. 6559-6565, 2002.

ELANDER, R. P. Industrial production of β -lactam antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n.5/6, p. 385-392, 2003.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Taxonomic outline of the Prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2004. Disponível em: <mibi.uni-munster.de/imperia/md/content/biologie_immb/_v/download/fgmtaxonomiewebs10-11/bergey.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2013.

GRAY, T. R. G.; WILLIAMS, S. T. **Soil micro-organisms**. 2nd ed. London: Longman, 1975.

KENIG, M.; READING, C. Holomycin and an antibiotic (MM 19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Antibiotics**, v. 32, n. 6, p. 549-554, 1979.

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

LAVARDA, S. C. S.; HOKKA, C. O.; ARAUJO, M. L. G. C. Clavulanic acid production processes in a tower bioreactor with immobilized cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 131-136, 2008.

LECHEVALIER, H. A. The Actinomycetes III: a practical guide to generic identification of actinomycetes. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. v. 4, p. 2344-2347.

LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 75, n. 1/2, p. 109-124, 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**. Totowa: Humana Press, 2005. v. 18, p. 149-163.

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

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

MEDEMA, M. H.; TREFZER, A.; KOVALCHUK, A.; VAN DEN BERG, M.; MÜLLER, U.; HEIJNE, W.; WU, L.; ALAM, M. T.; RONNING, C. M.; NIERMAN, W. C.; BOVENBERG, R. A. L.; BREITLING, R.; TAKANO, E. The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. **Genome Biology and Evolution**, v. 2, p. 212-224, 2010.

MERCK & CO (US). G. Inamine; J. Birnbaum. **Production of cephamycin C by fermentation**. US3886044, 25 Apr. 1974, 27 May 1975.

NAGARAJAN, R.; BOECK, L. D.; GORMAN, M.; HAMILL, R. L.; HIGGINS, 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. H. L.; 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, p. 187-210.

PHAFF, H. J. Industrial microorganisms. **Scientific American**, v. 245, n. 3, p. 77-89, 1981.

PRUES, D. L.; KELLETT, M. A. New clavam antibiotic from *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Antibiotics**, v. 20, p. 208-212, 1983.

QIN, Z.; BAKER, A. T.; RAAB, A.; SHENG, H.; WANG, T.; YU, Y.; JASPARS, M.; SECOMBES, C. J.; DENG, H. The fish pathogen *Yersinia ruckeri* produces holomycin and uses an RNA methyltransferase for self-resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 21, p. 14688-14697, 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, 1977.

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

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

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

SANTAMARTA, I.; PÉREZ-REDONDO, R.; LORENZANA, L. M.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Different proteins bind to butyrolactone receptor protein ARE sequence located upstream of the regulatory ccaR gene of *Streptomyces clavuligerus*. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 824-835, 2005.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. **Principles of fermentation technology**. 2nd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1999.

YIN, H.; XIANGA, S.; ZHENGA, J.; FANA, K.; YUA, T.; YANGA, X.; PENG, Y.; WANG, H.; FENGA, D.; LUO, Y.; BAIB, H.; YANGA, K. Induction of holomycin production and complex metabolic changes by the argR mutation in *Streptomyces clavuligerus* NP1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 9, p. 3431-3441, 2012.

ZHANG, J.; DEMAIN, A. L. Regulation of ACV synthetase activity in the beta-lactam biosynthetic pathway source and their metabolites. **Archives of Microbiology**, v. 158, p. 364, 1992.

ZHANG, J. Y.; WOLFE, S.; DEMAIN, A. L. Effect of ammonium as nitrogen source on production of d-(L-a-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valinesynthetase by *Cephalosporium acremonium*. **Journal of Antibiotics**, v. 40, p. 1746-1750, 1987.