



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
ARARAQUARA

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA CAPACIDADE DE
PRODUÇÃO DE CEFAMICINA C POR
STREPTOMYCES CLAVULIGERUS

Maria Lucia Frade



ARARAQUARA-SP

2012

MARIA LUCIA FRADE

**“Avaliação da estabilidade da capacidade de produção de
Cefamicina C por
Streptomyces clavuligerus”**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo

Departamento de Bioquímica/Tecnologia Química
Instituto de Química-UNESP/ Araraquara

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia-
Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara da Universidade
Estadual Paulista para obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica.

ARARAQUARA-SP

2012

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por Sua proteção e zelo durante todo o período de realização deste trabalho, assim como em todos os dias de minha vida.

Aos meus pais, **Vera e Armando**, pelo amor, esforço e por sempre acreditarem em mim durante todo esse período, pela vida que generosamente me concederam e por todos os seus ensinamentos.

Aos Profs. Drs. **Eduardo Maffud Cilli e Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo** pela orientação e amizade demonstrados nesse período e pelos seus ensinamentos.

Ao **Lucas** por sempre estar ao meu lado.

Às minhas queridas amigas **Maristele, Michely e Paula** pelo apoio, carinho e pelos momentos alegres.

Aos companheiros de laboratório **Carla, André e Tatiana** e à **Telma** pelos ensinamentos e auxílio nas atividades de laboratório.

RESUMO

Streptomyces clavuligerus é uma importante espécie industrial que produz múltiplos compostos de interesse clínico, destacando-se o antibiótico cefamicina C (CefC) e o ácido clavulânico (AC), um potente inibidor de β -lactamases produzidas por bactérias resistentes a penicilinas e cefalosporinas. Sabe-se que situações limite como subculturas sucessivas, forma inadequada de armazenamento das células, variações bruscas de condições de cultura, podem causar deleções de mais de 25% dos genes de *Streptomyces sp* que, embora muitas vezes não comprometam a sobrevivência do micro-organismo, acarretam perdas na capacidade produtiva. Neste trabalho, investigou-se a estabilidade da linhagem selvagem *S. clavuligerus* ATCC 27064 quanto à produção de CefC variando-se condições do inóculo utilizado nos cultivos submersos de obtenção do antibiótico. As fermentações foram realizadas em frascos agitados (28°C, 260 rpm) e as amostras coletadas em 48 e 72 horas do caldo fermentativo foram analisadas quanto ao pH, biomassa (massa seca a 105°C por 24 h) e CefC foi determinada por bioensaio de difusão em ágar (bactéria-teste *Escherichia coli* ESS 2235).

Foi selecionado o micro-organismo melhor produtor por meio de *screening*, e o que apresentou a melhor produção de CefC e os menores desvios com relação à média foi utilizado para preparar novos lotes de células: ampolas de micélios liofilizados e criotubos contendo 10^8 esporos.mL⁻¹. Observou-se que a capacidade produtiva foi afetada quando foram utilizadas subculturas do micro-organismo original.

A realização do *screening* mostrou-se eficiente na seleção de colônias superiores em termos de produção volumétrica, sendo recomendada a realização de tal procedimento periodicamente para manutenção de uma linhagem com maior potencial produtivo.

Esporos submetidos a condições estressantes de cultivo aparentemente sofreram modificações genéticas que os tornaram produtores de Holomicina.

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	6
2) OBJETIVOS	10
3) MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1) MATERIAIS	11
3.1.1) Micro-organismos	11
3.1.2) Meios de cultura	11
3.1.3) Equipamentos	17
3.2) MÉTODOS	18
3.2.1) <i>Screening</i>	18
3.2.2) Métodos analíticos	18
3.2.3) Procedimento experimental	20
4) RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1) Procedimento de <i>screening</i>	22
4.2) Experimento 1 – Seleção da fonte de carbono	22
4.3) Experimento 2 – Teste dos esporos das colônias mais produtoras	24
4.4) Experimento 3 – Teste dos lotes de ampolas e criotubos confeccionados	26
4.5) Experimento 4: Avaliação da capacidade produtiva de células submetidas à subculturas sucessivas e tamanho reduzido de inóculo	28
4.6) Experimento 5: Avaliação da manutenção da capacidade produtiva de células coletadas em cultivos submersos realizados sob diversas condições.	30
4.7) Protocolo de preservação de <i>S.clavuligerus</i>	36
5) CONCLUSÕES	39
6) REFERÊNCIAS	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Fórmula molecular: cefamicina C (A), ácido clavulânico (B), cefalosporina C (C).....	7
Figura 3.1- Etapas do processo de cultivo de <i>S.clavuligerus</i>	21
Figura 4.1- Produção de CefC totais obtidas em 48 e 72 horas de processo em meios contendo amido (A) e maltose (B).....	23
Figura 4.2- Biomassas obtidas em meios contendo amido (A) e maltose (B).....	24
Figura 4.3- Produção específica de CefC obtidos em 48 e 72 horas de processo em meios contendo amido (A) e maltose (B).....	24
Figura 4.4- Produção de CefC totais dos esporos da colônias 3,7,12,19 e 32 selecionadas em <i>screening</i>	25
Figura 4.5- Valores médios de biomassa resultantes do cultivo submerso dos esporos das colônias mais produtoras.....	26
Figura 4.6- Produção de CefC totais das células do banco de (A) ampolas e (B) criotubos.....	27
Figura 4.7- Biomassas obtidas do cultivo submerso das células originadas do banco de ("inóculo A") ampolas e ("inóculo B") criotubos.....	28
Figura 4.8- Produção das fermentações das duas condições: esporos originados (A) após subculturas sucessivas e (B) após diminuindo-se sua concentração de 10^8 para aproximadamente 10^4 esporos/mL de solução crioprotetora e (P) esporos do criotubo original.....	29
Figura 4.9- Biomassas obtidas do cultivo submerso das células originadas (A) após subculturas sucessivas e (B) inóculo com concentração reduzida de esporos.....	29
Figura 4.10- Produção de CefC obtida do cultivo de esporos originados das condições C1 a C4.....	32
Figura 4.11- Biomassas obtidas do cultivo de esporos originados das condições C1 a C4.....	33
Figura 4.12- Produção específica de CefC obtidos em C1 a C4.....	33
Figura 4.13- Aspecto das amostras obtidas das fermentações das condições C2 (esquerda) e C1 (direita).....	34
Figura 4.14- Cromatogramas obtidos das análises de amostras de (A) C1 e (B) C2. A formação do pico em destaque corresponde à Holomicina.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Composição do meio ágar nutriente (Difco 0001).....	11
Tabela 3.2- Meio de esporulação de <i>S. clavuligerus</i> (SÁNCHEZ; BRAÑA, 1996).....	12
Tabela 3.3- Composição do meio de germinação (MG) ou reativação.....	12
Tabela 3.4- Composição do meio RC (READING e COLE, 1977) modificado.....	13
Tabela 3.5- Composição geral do meio de preparo do inóculo.....	14
Tabela 3.6- Composição dos MI utilizados no Experimento 1	14
Tabela 3.7- Composição geral do MFP (OMSTEAD et al, 1985; ANTONIO,2007).....	15
Tabela 3.8- Composição dos MFP utilizados no Experimento 1	16
Tabela 3.9- Composição meio ISP1 ou de reativação de micélios.....	16
Tabela 3.10- Composição solução crioprotetora.....	17
Tabela 4.1- Produção de CefC das cinco colônias mais produtoras.....	22

1) INTRODUÇÃO

O metabolismo secundário em micro-organismos resulta de um crescimento desbalanceado e, por isso, gera compostos que, por não serem aparentemente essenciais ao desenvolvimento celular, acumulam-se no meio fermentativo. Há várias teorias sobre os possíveis papéis dos metabólitos secundários nos organismos que os produzem, porém, há um consenso entre os estudiosos de que esses compostos estão associados de alguma forma a funções de sobrevivência e de adaptação às condições ambientais. A capacidade de produzir múltiplos metabólitos secundários é uma característica peculiar de bactérias do gênero *Streptomyces* que as torna, ainda hoje, as fontes naturais mais abundantes de agentes bioativos tais como antibióticos e antitumorais, entre outros tipos de compostos de interesse clínico (CHALLIS e HOPWOOD, 2003).

Streptomyces clavuligerus é uma bactéria filamentosa aeróbia gram positiva pertencente ao grupo dos actinomicetos. É um micro-organismo com condições favoráveis ao seu crescimento em temperatura entre 25 e 35 °C, e pH entre 6,5 e 8,0 e uma das mais importantes espécies industriais que produz múltiplos compostos dos quais muitos já foram caracterizados quanto à estrutura e funcionalidade. Dois destes compostos, pertencentes à classe dos β -lactâmicos, são usados clinicamente, a saber, o antibiótico cefamicina C (CefC) (Fig 1A) e o ácido clavulânico (AC) (Fig 1B), um potente inibidor de β -lactamases produzidas por bactérias resistentes a penicilinas e cefalosporinas (LIRAS, 1999; BRAKHAGE et al, 2005). AC atua em sinergia com antibióticos β -lactâmicos, sendo o exemplo clínico mais importante a combinação de AC e amoxicilina, cuja formulação original foi desenvolvida pela Glaxo SmithKline (Clavulin[®], no Brasil) (BUTTERWORTH, 1984; LAVARDA et al, 2008).

CefC é estruturalmente semelhante à cefalosporina C (CPC) (Figura 1C), produzida apenas por fungos filamentosos (ARAÚJO et al, 1999), porém é mais resistente a β -lactamases por apresentar um radical metoxi na posição 7α que confere maior estabilidade ao sistema bicíclico de anéis (OLIVEIRA et al, 2009; BUSSARI et al, 2009). CefC foi descoberta no centro de P&D da Merck Co. e é utilizada 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 et al, 1985; BUSSARI et al, 2009).

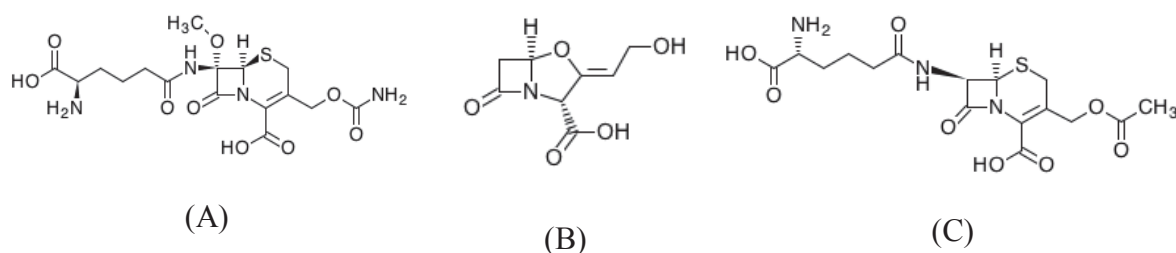


Figura 1.1 – Fórmula molecular: cefamicina C (A), ácido clavulânico (B), cefalosporina C (C).

Linhagens industriais de *S. clavuligerus*, com alta capacidade produtiva, assim como outras espécies de streptomísetos de interesse comercial, são ainda obtidas por meio de procedimentos empíricos de seleção ("screening") e de mutação. Devido à natureza aleatória da mutagênese, porém, mutações do micro-organismo superprodutor que não contribuem para aumentar a produtividade normalmente tornam-se dominantes nas culturas, o que muitas vezes resulta no colapso do ciclo produtivo. Além disto, a elevada instabilidade genética naturalmente presente em praticamente todas as espécies de *Streptomyces* também causa, com frequência, a deterioração do processo fermentativo (CHEN, 1995). O DNA cromossomal

dessas bactérias é susceptível a muitas deleções em trechos geneticamente instáveis que, em sua maioria, contém genes associados ao metabolismo secundário. Dentre os genes mais afetados pode-se citar os responsáveis pela formação de hifas aéreas ou esporos, produção de pigmentos ou enzimas extracelulares e biossíntese de antibióticos. A perda da capacidade de esporulação, por exemplo, afeta os procedimentos de preservação da linhagem e 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 micro-organismo, 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).

Estados mutadores (*mutator state*) indesejáveis decorrentes de altos graus de deleção no DNA cromossomal, por exemplo, são inerentes à modulação genética de streptomicetos em resposta ao ambiente, e podem ser intensificados por condições-limite como gradientes bruscos de pH ou temperatura. Tais condições podem ocorrer em qualquer etapa de manejo/cultivo do micro-organismo, como no armazenamento das células ou durante o cultivo submerso para a obtenção do biocomposto de interesse. Por exemplo, situações limite podem causar deleções de mais de 25% dos genes de *Streptomyces* sp que, embora muitas vezes não comprometam a sobrevivência do micro-organismo, sempre acarretam perdas irreversíveis na capacidade produtiva (DARY et al, 1999; MEDEMA et al, 2010). Em contraposição, há muito se sabe que determinadas condições adversas ao crescimento do micro-organismo durante a fermentação principal favorecem a produção de metabólitos secundários (OMSTEAD et al, 1985; STANBURY et al, 1999; CHALLIS e HOPWOOD, 2003). Neste sentido, a indústria da fermentação tem criado programas de desenvolvimento de bioprocessos em busca de condições sub-ótimas de crescimento celular que permitam otimizar a produção. Isto se apresenta como um grande desafio para geneticistas e

engenheiros industriais de fermentação, uma vez que, como exposto acima, a instabilidade genética de *Streptomyces sp* 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).

2) OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o grau de estabilidade de linhagens de *S. clavuligerus* quanto à capacidade de produção de CefC. A preservação da capacidade produtiva das linhagens será investigada comparando-se a produção de CefC resultante de fermentações utilizando-se um meio padrão a definir e, como inóculo inicial, esporos gerados a partir de células previamente submetidas a várias condições.

Para atingir este objetivo, foram realizadas as seguintes etapas:

- Procedimento de *screening* (ATCC 27064) e isolamento da unidade formadora de colônia (UFC) melhor produtora em meio sólido;
- Seleção da melhor fonte de carbono (C) do meio de produção;
- Confeção e avaliação em cultivo submerso de um banco de esporos e ampolas a partir do micro-organismo selecionado no procedimento de *screening*;
- Avaliação da produção de antibiótico utilizando-se, como inóculo, esporos obtidos após um determinado número de subculturas em meio sólido e a partir da esporulação de células vegetativas (micélios) provenientes de cultivos submersos realizados em condições diferentes à condição padrão.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) MATERIAIS

3.1.1) Micro-organismos

S. clavuligerus ATCC 27064 (linhagem selvagem). Células liofilizadas da linhagem encontram-se estocadas em ampolas.

Para o bioensaio de detecção/quantificação de antibióticos β -lactâmicos foi utilizada *Escherichia coli* ESS 2235 como bactéria teste, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Paloma Liras, da Faculdade de Biologia da Universidade de Leon, Espanha (LIRAS; MARTIN, 2005).

3.1.2) Meios de cultura

(a) Meio sólido de cultivo da bactéria-teste

Realizou-se o cultivo da bactéria *E.coli* ESS 2235 em meio ágar nutriente (Difco 0001) indicado pela ATCC, cuja composição está indicada na tabela 3.1.

Tabela 3.1- Composição do meio ágar nutriente (Difco 0001).

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0
Agar bacteriológico	15,0
pH	6,8 ± 0,1
Água destilada em q.s.p	1000 mL

(b) Meio de esporulação de *S. clavuligerus*

O meio proposto por Sánchez e Braña (1996) (meio SB) descrito na tabela 3.2 foi utilizado para a obtenção de esporos do micro-organismo (7 a 10 dias, 28°C).

Tabela 3.2- Meio de esporulação de *S. clavuligerus* (SÁNCHEZ; BRAÑA, 1996).

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

(c) Meio de reativação ou germinação (MG ou MR) de micélios e de esporos

Para germinação de esporos congelados a -80°C de *S. clavuligerus* foi realizado meio indicado pela ATCC (meio ISP1), adicionado de extrato de malte (KIESER et al, 2000). As células liofilizadas (micélios) foram reidratadas por 10 a 15 dias, a 28°C, sem agitação também neste meio.

Tabela 3.3- Composição do meio de germinação (MG) ou reativação.

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

(d) Meio de propagação de micélios RC (Reading e Cole, 1977) modificado

Após 24 horas de cultivo em MR, uma alíquota deste foi adicionada ao RC para a propagação dos micélios.

Tabela 3.4- Composição do meio RC (READING e COLE, 1977) modificado.

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Glicerol	20,0
Extrato de malte	10,0
Peptona	20,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75
K ₂ HPO ₄	2,5
Solução de sais	1,0 mL
MOPS	21,0
pH	7,0 ± 0,1

(e) Meio de preparação do inóculo (MI)

Os meios de preparo de inóculo e de produção (fermentação principal) devem conter os mesmos componentes essenciais como fontes de carbono (C) e de nitrogênio (N), de forma a minimizar a fase "lag" durante a fermentação principal. Como fontes de C e energia, propôs-se a utilização de compostos indicados pela literatura para crescimento de *S. clavuligerus*, como amido, glicerol e/ou maltose, (OMSTEAD et al., 1985; KIESER et al., 2000). A fonte de N foi o extrato proteico à base de caroço de algodão (Proflo®) (BUTHERWORTH, 1984; ANTONIO et al., 2007). A razão mássica C:N do meio deve ser em torno de 4:1, com base em fórmula molecular empírica proposta para espécies de *Streptomyces* (BUSHELL e FRYDAY, 1983).

Tabela 3.5 – Composição geral do meio de preparo do inóculo

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Proflo (a)	8,5
Extrato de levedura	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75
K ₂ HPO ₄	0,8
Solução de sais	10,0 mL
MOPS	21,0
pH	6,8 ± 0,1

(a) Farinha de semente de algodão.

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

Tabela 3.6- Composição dos MI utilizados no **Experimento 1**.**Meio A**

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Amido	10,0

Meio B

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Maltose	10,0

(f) Meios utilizados para produção de antibióticos ou meio de fermentação principal (MFP)

A farinha de semente de algodão atua como fonte de N (nitrogênio) para o crescimento do micro-organismo. Este componente foi fervido e filtrado previamente à autoclavagem. Isto promove o aumento da sua solubilidade no meio, favorecendo a separação da biomassa por centrifugação e análises mais confiáveis, o que não ocorreria num meio insolúvel.

O meio solúvel também favorece a oxigenação do microambiente de cultivo, possibilitando sua utilização por *S.clavuligerus* em sua rota biossintética de CefC.

Tabela 3.7 – Composição geral do MFP (OMSTEAD et al, 1985; ANTONIO,2007).

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Proflo®	8,5
Extrato de levedura	0,5
Tiosulfato de sódio ^(a)	1,0
K ₂ HPO ₄	1,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75
CaCl ₂	0,2
NaCl	2,0
MOPS	21,0
Solução de sais	5,0 mL

(a) Adicionado após 30 horas de processo.

Tabela 3.8- Composição dos MFP utilizados no **Experimento 1.****Meio A**

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Amido	10,0

Meio B

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Maltose	10,0

(g) Meio ISP1

Utilizado para a reativação de células liofilizadas de *S. clavuligerus*.

Tabela 3.9- Composição meio ISP1 ou de reativação de micélios.

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Triptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
pH	7,0 ± 0,2

(h) Solução crioprotetora

Utilizada no armazenamento de suspensão de esporos a -80°C.

Tabela 3.10- Composição solução crioprotetora.

Componentes	Concentração (v/v)
Glicerol	20%
Água destilada	q.s.p. 100%

(i) Solução lioprotetora

Utilizada para armazenamento de micélios na forma liofilizada. Compõe-se de 10% de leite desnatado e 5% de glutamato monossódico (peso/peso).

3.1.3) Equipamentos

Equipamentos para as fermentações:

- Mesas incubadoras rotatórias (New Brunswick), para os experimentos em frascos agitados, providas de controle de agitação e de temperatura;

Equipamentos e aparelhos para procedimentos gerais e analíticos:

- Espectrofotômetro (UV e luz visível - Pharmacia);
 - Câmara de fluxo laminar, balanças, estufas, pHmetros, autoclaves, centrífuga refrigerada
- banhos termostatizados, microscópios, agitadores magnéticos;
- Ultra-freezer;
 - Liofilizador;
 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu);
 - Microcomputadores para o tratamento dos dados experimentais.

3.2) MÉTODOS

3.2.1) *Screening*

Partindo-se de um lote matriz de células, foi realizado uma seleção da colônia melhor produtora de CefC que deu origem a um novo banco de células liofilizadas (micélios) e de suspensão de esporos em solução crioprotetora.

Realizou-se diluição seriada da suspensão de esporos em salina 0,9% de concentrações 10^{-1} a 10^{-10} e plaqueou-se em meio SB as diluições 10^{-6} a 10^{-10} em duplicata para cada diluição. Foram selecionadas, então, as colônias levando-se em consideração a semelhança fenotípica com a colônia-mãe e as mais isoladas e diferenciadas entre si. Estas por sua vez, tiveram seus esporos transferidos para outras placas contendo o mesmo meio SB. A partir destas colônias é que foi testada a produção de CefC.

Para testar a produção de antibiótico de cada colônia isoladamente, foi necessário verter sobre as mesmas o meio nutriente ágar com suspensão de *E. coli* e solução enzimática BD Difco TM Penase®. Após incubação por 24 horas a 37°C, mediu-se o diâmetro dos halos de inibição e das colônias para traçar uma razão.

3.2.2) Métodos analíticos

(a) Coleta das amostras e determinação da concentração celular (biomassa)

As amostras foram coletadas após 48 e 72 horas de fermentação principal. Os 5 mL do caldo fermentativo coletados foram submetidos a centrifugação por 10 minutos, 11000 rpm e 4°C. O líquido sobrenadante foi cuidadosamente retirado e armazenado em tubos tipo Ependorfs® a -80°C para posterior quantificação do antibiótico.

A massa celular precipitada foi centrifugada com água destilada por duas vezes para remover impurezas e depositada em recipientes previamente pesados. Os recipientes foram então levados à estufa a 105°C por 24 horas. Antes da pesagem da biomassa seca, os recipientes ficaram armazenados em dessecador até atingirem temperatura ambiente. A biomassa é expressa em termos de massa seca por volume de meio de cultura (g.L^{-1}).

(b) Determinação de CefC por difusão em ágar

Em consequência da indisponibilidade de um padrão de CefC de alta pureza para uma análise de detecção em HPLC com detector Ultravioleta (UV), em comprimento de onda de 254 nm, o antibiótico das amostras foi quantificado através de bioensaio de difusão em ágar utilizando-se como padrão CepC devido à semelhança dos halos produzidos pelos dois bioativos (LIRAS; MARTIN, 2005). Desta forma, CefC foi determinada indiretamente e expresso em termos de concentração de Cefalosporinas totais em mg.L^{-1} .

A quantificação de CepC Totais foi realizada por interpolação logarítmica entre as medidas dos diâmetros dos halos de inibição obtidos com as amostras e as soluções do antibiótico padrão.

(c) Bioensaio

A bactéria teste foi cultivada em tubos contendo meio ágar nutriente por 24 horas a 37°C. A suspensão foi preparada adicionando-se 10 mL de solução salina 0,9% a cada tubo. Colhida a suspensão, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro, em 600nm. A cada 120 mL de meio nutriente ágar ainda fluido ($\sim 46^\circ\text{C}$) foram adicionados 0,7 mL de suspensão bacteriana com DO igual a 1. Em cada placa de 150 mm de diâmetro foram vertidos 40 mL de meio ágar nutriente contendo a bactéria teste. Após solidificação do meio, foram perfurados oito poços (5 mm de diâmetro) para a aplicação das amostras.

Devido ao fato de *S. clavuligerus* produzir outros compostos com atividade antimicrobiana além de CefC, foi necessário realizar 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 et al, 1987). Então, para eliminar a Penicilina N 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.

(d) Aplicação das amostras, incubação e leitura dos halos de inibição

No interior dos poços perfurados foram adicionados 20 µL das soluções preparadas de amostra do antibiótico, adequadamente diluídas. As placas foram incubadas a 36-37°C por 18 horas sendo medidos com paquímetro os diâmetros dos halos de inibição.

3.2.3) Procedimento experimental

Pré-culturas

Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de meio de germinação ou de reativação foram inoculados com suspensão de células (2 a 8×10^8 esporos/ml) de forma a se obter 10% em volume de suspensão celular por volume final de meio. O germinado reativado foi obtido após 24 horas em mesa rotatória-incubadora em frequência de rotação de 260 rpm e temperatura controlada de 28°C.

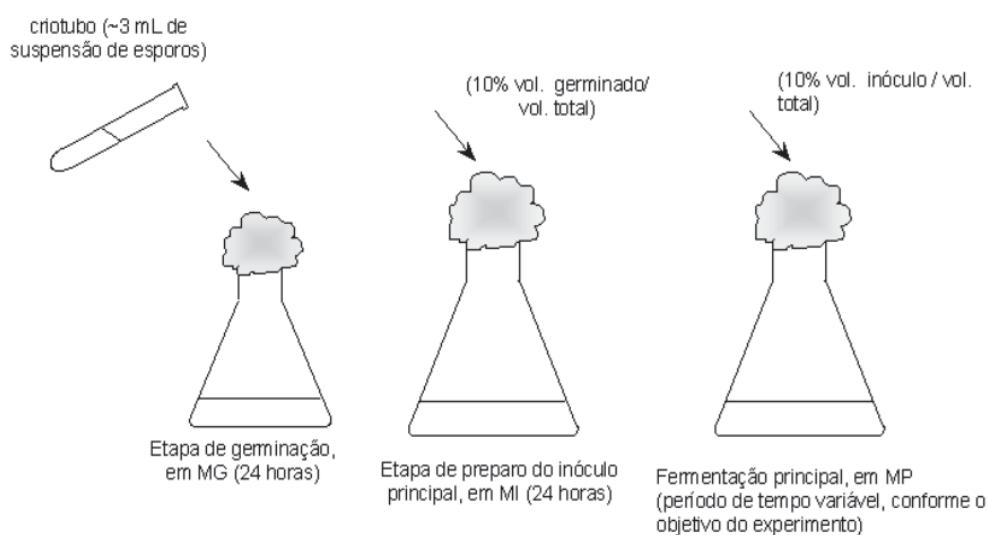
Preparo do inóculo

Frascos contendo meio de preparo do inóculo principal foram inoculados com a suspensão de células obtida na etapa anterior, também a 10% em volume de suspensão celular

por volume final, seguindo para mesa rotatória-incubadora por 24 horas. Nesta etapa utilizou-se frascos de 250 mL de volume útil e 25 mL de MI.

Fermentação principal

A fermentação principal para a produção de compostos β -lactâmicos foi realizada em batelada, por um período de 48 a 72 horas. Em cada frasco foram adicionados, 10% de inóculo. A seqüência de etapas do processo fermentativo e os procedimentos da fermentação principal estão esquematizados na Figura 3.1.



Todos os experimentos consistiram de bateladas em 25 mL de MFP e as amostras de todos os experimentos foram submetidas a análises de pH, concentração de células (biomassa) e de CefC totais.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Procedimento de *screening*

Partindo-se de um lote matriz de células, foi realizado uma seleção de colônias mais produtoras de CefC.

Foram obtidas 34 colônias e destas, selecionou-se as cinco mais produtivas.

A Tabela 4.1 indica os valores do cálculo da produção de CefC das colônias obtidas. Estes valores foram determinados utilizando-se como critério a razão entre os quadrados do diâmetro do halo de inibição (H) e da UFC de *S. clavuligerus* (c).

Tabela 4.1- Produção de CefC das cinco colônias mais produtoras.

Colônias	H (mm)	c (mm)	Produção CefC
3	29,0	7,8	13,7
7	23,7	7,0	11,5
12	33,0	7,0	22,0
19	28,3	8,2	12,0
32	27,9	7,8	13,0

Os esporos resultantes do *screening* foram armazenados para posteriormente serem testados em cultivo submerso e determinadas as produções de CefC totais.

4.2) Experimento 1 – Seleção da fonte de carbono

Neste experimento foram avaliados o crescimento celular e a produção de CefC totais utilizando-se maltose e amido como fontes de carbono do meio de fermentação principal, definindo-se desta forma, o meio padrão para a realização dos seguintes experimentos.

A Figura 4.1 mostra a média da produção de CefC obtidas em triplicatas.

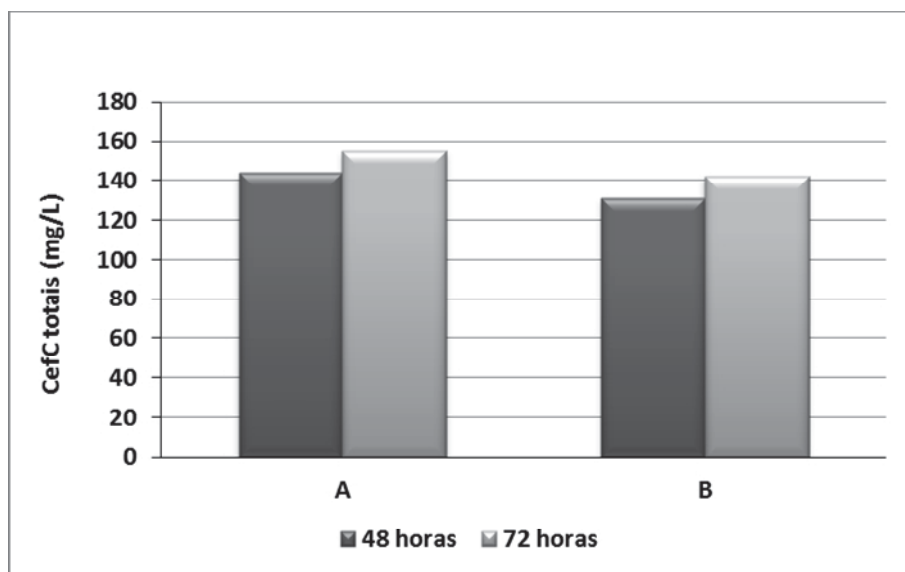


Figura 4.1- Produção de CefC totais obtidas em 48 e 72 horas de processo em meios contendo amido (A) e maltose (B).

Pode-se observar que a média de produção de CefC mostrou-se bem semelhante nas duas condições A (amido) e B (maltose), porém o meio contendo amido proporcionou melhores resultados, apresentando produção total de $155,2 \text{ mg.L}^{-1}$ em 72 horas de processo contra $142,4 \text{ mg.L}^{-1}$ no meio contendo maltose e sob as mesmas condições.

Em 72 horas de processo, a biomassa de A foi de $5,72 \text{ g.L}^{-1}$ enquanto que de B foi de $7,5 \text{ g.L}^{-1}$. Dividindo-se esses valores pelas respectivas produções de CefC totais obteve-se os valores da produção específica (Figura 4.3). Desta forma, pode-se verificar que a produção de A torna-se ainda maior em relação a B.

Foi então adotado o amido como fonte de carbono para a realização dos demais experimentos do presente trabalho.

A Figura 4.2 mostra os valores de biomassa seca obtidos no experimento.

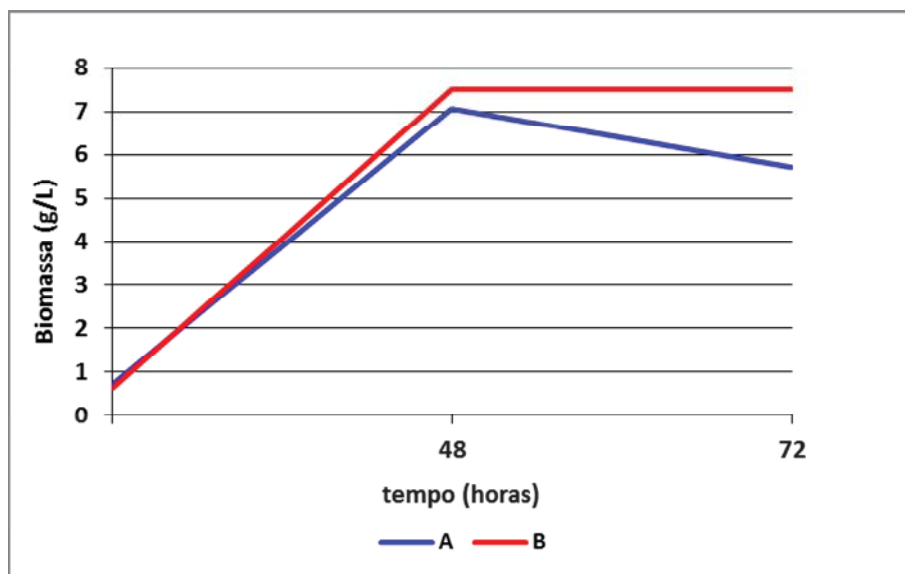


Figura 4.2- Biomassas obtidas em meios contendo amido (A) e maltose (B).

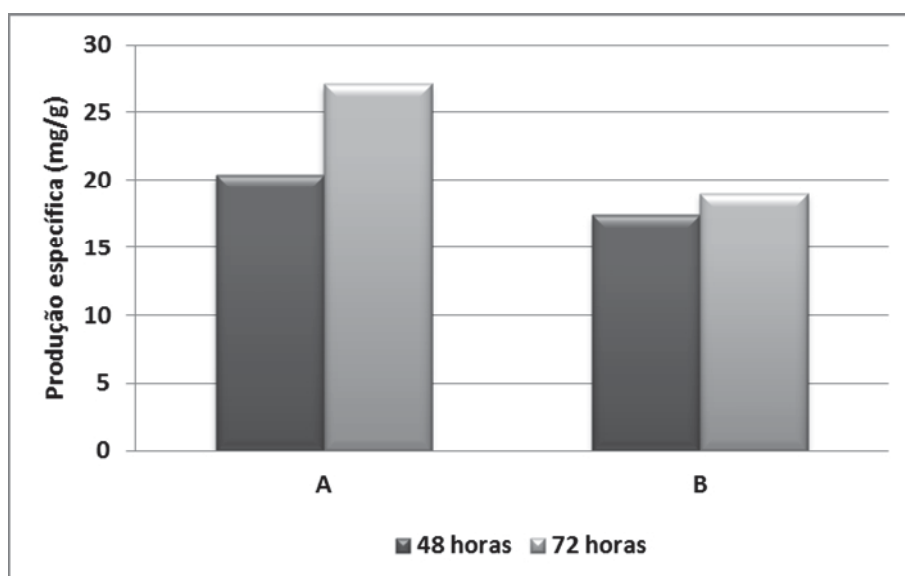


Figura 4.3- Produção específica de CefC obtidos em 48 e 72 horas de processo em meios contendo amido (A) e maltose (B).

4.3) Experimento 2 – Teste dos esporos das colônias mais produtoras

Os esporos das cinco colônias mais produtoras do antibiótico foram submetidos ao cultivo submerso para avaliação da sua capacidade produtiva. Pode-se observar que as células provenientes da colônia 12 apresentaram a melhor produção de CefC totais (135 g.L^{-1} em 72

horas de processo) e os menores desvios com relação à média (Figura 4.4) quando comparado com as demais, fato esperado levando-se em consideração os valores apresentados na Tabela 4.1. Trata-se de uma produção de antibiótico acima dos níveis satisfatórios que se situa em torno de 120 mg.L^{-1} de CefC.

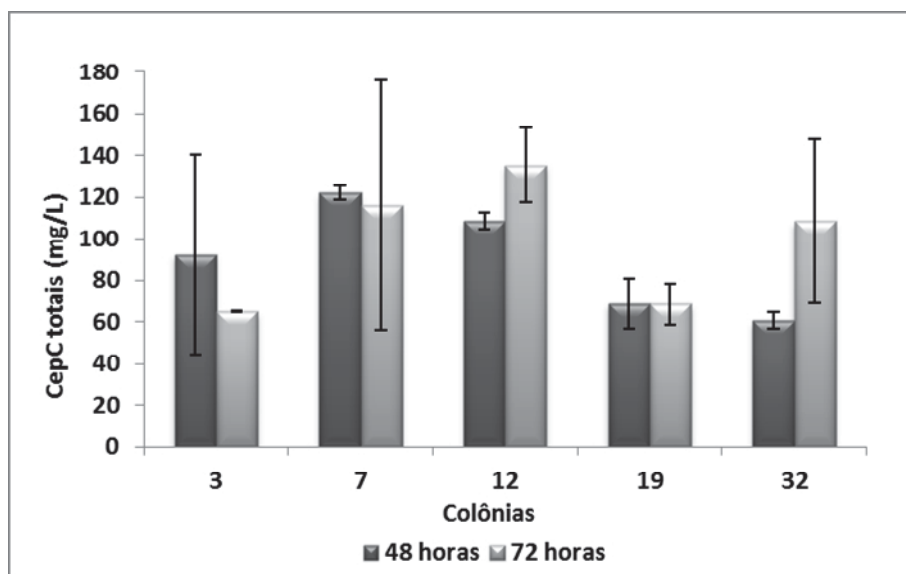


Figura 4.4- Produção de CefC totais dos esporos da colônias 3,7,12,19 e 32 selecionadas em *screening*.

Os valores médios de biomassa estão apresentados na Figura 4.5, tendo sido observados desvios aproximadamente de 15% com relação à média.

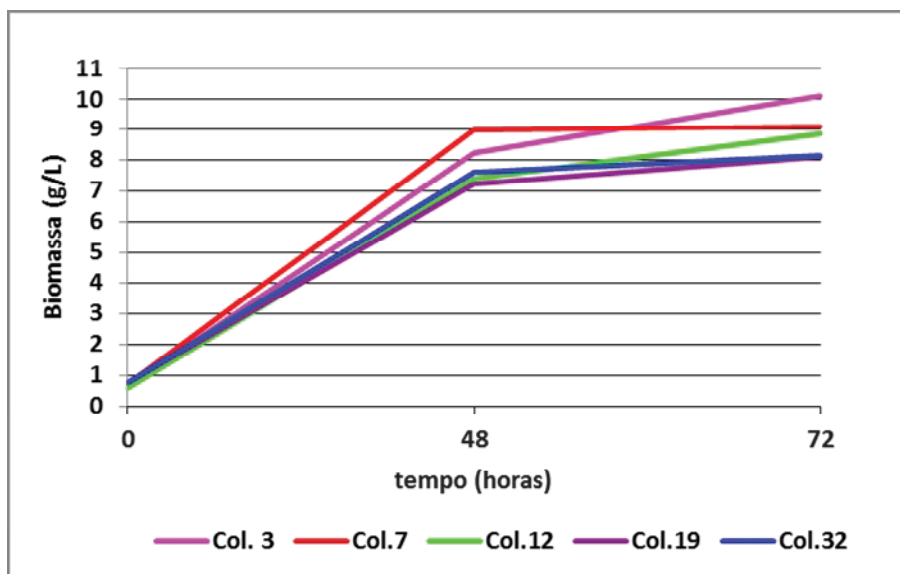


Figura 4.5- Valores médios de biomassa resultantes do cultivo submerso dos esporos das colônias mais produtoras.

Partindo-se dos esporos da UFC melhor produtora (Col. 12) foram confeccionadas ampolas com os micélios liofilizados e suspensão de esporos (10^8 esporos/mL) seguindo-se protocolos de preservação definidos ainda neste trabalho.

4.4) Experimento 3 – Teste dos lotes de ampolas e criotubos confeccionados

Sabendo-se que o DNA cromossomal destas bactérias é susceptível a muitas deleções em trechos geneticamente instáveis que, em sua maioria, contém genes associados ao metabolismo secundário e que esta instabilidade genética de Streptomyces pode interferir negativamente na produção de antibiótico, faz-se necessário então cultivá-las e manipulá-las de forma a minimizar essas possibilidades. Assim, os procedimentos de preparo de novos lotes de células deste trabalho foram estabelecidos de forma a manter a integridade e a capacidade produtiva inicial pelo maior tempo possível.

Esta etapa experimental teve como objetivo avaliar o padrão de produção dos novos lotes de células. Os testes constituíram-se de fermentação em batelada onde o "inóculo A"

originou-se a partir de uma ampola reativada e o "inóculo B" a partir de um criotubo. Os resultados estão descritos na Figura 4.6.

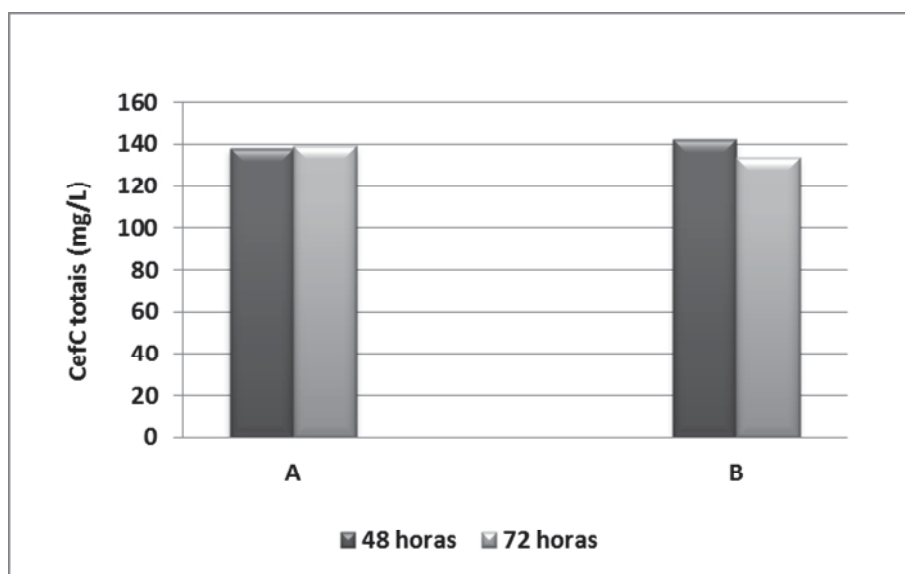


Figura 4.6- Produção de CefC totais das células do banco de (A) ampolas e (B) criotubos.

Pode-se observar que, mesmo após submetidas ao processo de liofilização, os micélios das ampolas (A) mantiveram um perfil bom de produção (Figura 4.6) e crescimento (Figura 4.7), indicando a preservação destas características. O mesmo se observou com os esporos dos criotubos (B), que apresentaram produção semelhante a das células de origem (colônia 12).

Os lotes de ampolas e criotubos, então avaliados como geradores de células bastante produtivas, serviram como inóculo do Experimento 4.

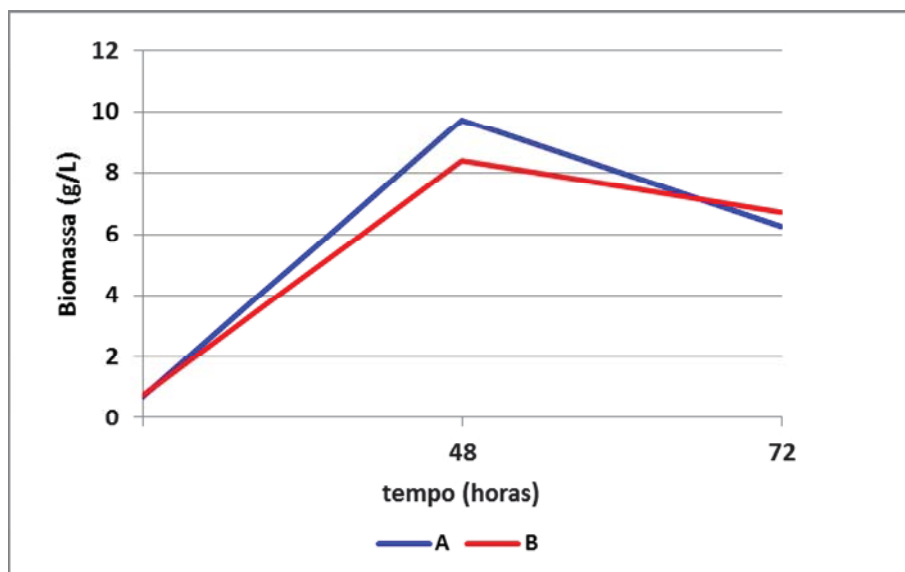


Figura 4.7 - Biomassas obtidas do cultivo submerso das células originadas do banco de ("inóculo A") ampolas e ("inóculo B") criotubos.

4.5) Experimento 4: Avaliação da capacidade produtiva de células submetidas à subculturas sucessivas e tamanho reduzido de inóculo

Submeter um micro-organismo a subculturas sucessivas é uma condição que, segundo dados da literatura, pode causar modificações genéticas que, muitas vezes, afetam negativamente sua capacidade de síntese do produto de interesse. Por isso, testou-se esta condição.

A suspensão de esporos B do Experimento 3 passou por três subcultivos sucessivos em meio sólido (meio SB) e, então, foram testados quanto à sua capacidade de produção de CefC.

A Figura 4.8 ilustra os resultados obtidos das fermentações das duas condições: esporos originados após três subculturas sucessivas (A) e inóculo a uma concentração de aproximadamente 10^4 esporos/mL (B).

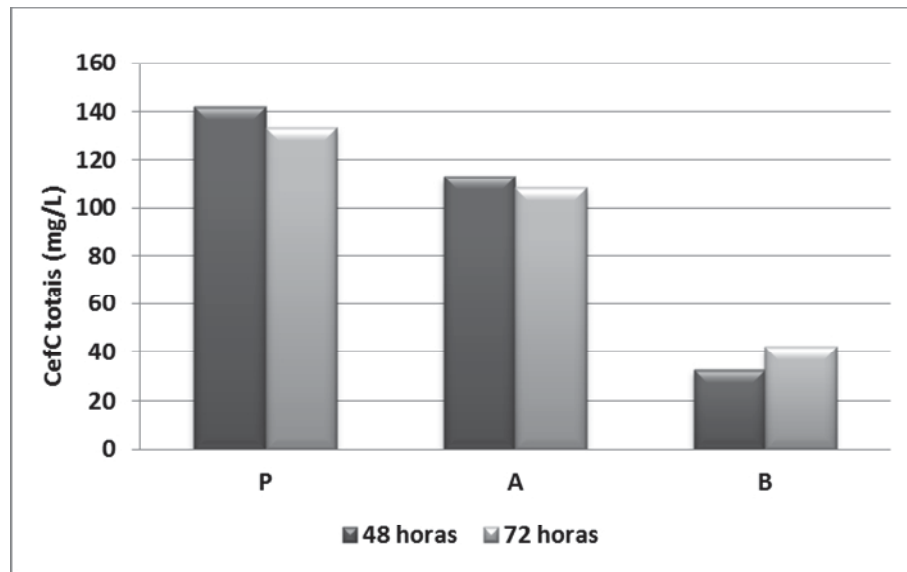


Figura 4.8- Produção das fermentações das duas condições: esporos originados (A) após subculturas sucessivas e (B) após diminuindo-se sua concentração de 10^8 para aproximadamente 10^4 esporos/mL de solução crioprotetora e (P) esporos do criotubo original.

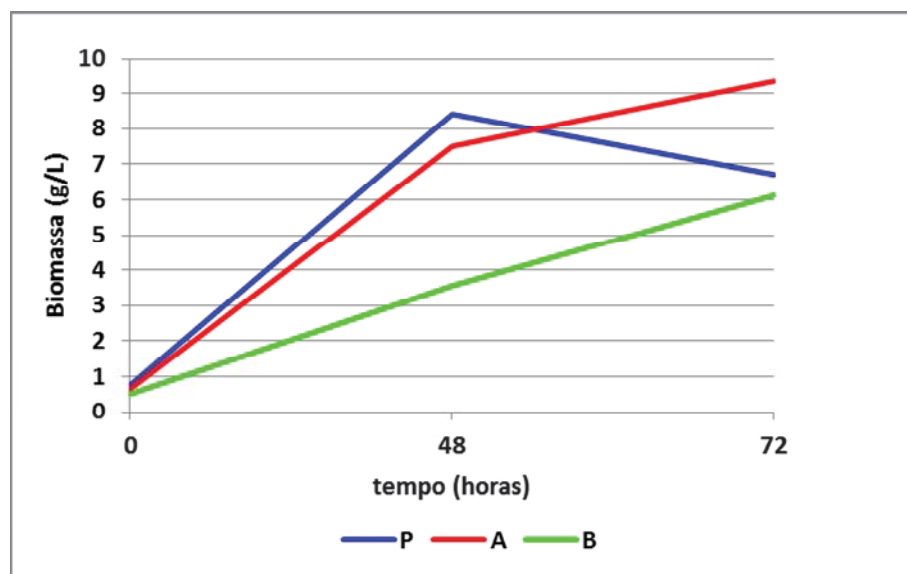


Figura 4.9- Biomassas obtidas do cultivo submerso das células originadas (A) após subculturas sucessivas e (B) inóculo com concentração reduzida de esporos.

Dentre as duas condições testadas (A e B), pode-se afirmar que a situação B foi a mais prejudicial para a produção final do antibiótico. Nesta condição houve uma queda acentuada de pH ($5,8 \pm 0,2$) em 48 horas de processo que não ocorreu nas fermentações sob as

condições padrão (P) e A ($6,5 \pm 0,2$) que pode ter prejudicado sensivelmente a produção, visto que esse fator isoladamente não acarreta prejuízos tão significativos para a biossíntese do antibiótico. Apesar da biomassa na situação B ter atingido um valor da mesma ordem de grandeza das demais condições ($7,5 \text{ g.L}^{-1} \pm 1,0$) ao final das 72 horas de processo, o mesmo não ocorreu com a produção, cujo valor máximo foi cerca de 3 a 4 vezes menor. Isso se deve ao fato de que na condição B os micro-organismos ainda encontravam-se em fase exponencial de crescimento (trofofase), que pode ser claramente observado na Figura 4.9 e a produção de metabólitos secundários ocorre na fase estacionária (idiofase).

Micro-organismos oriundos de gerações sucessivas podem apresentar alguma modificação que interfere em seu metabolismo, principalmente. Por isso, na situação A observou-se diminuição de cerca de 20% da concentração de CefC ao final de 72 horas de fermentação quando comparado a P.

4.6) Experimento 5: Avaliação da manutenção da capacidade produtiva de células coletadas em cultivos submersos realizados sob diversas condições.

Este experimento teve como objetivo avaliar a viabilidade quanto à produção de CefC de células provenientes de outros meios de cultivos, levando-se em consideração que o período de cultivo e a constituição e/ou concentração de alguns componentes adicionados a esse meio podem interferir no metabolismo e vias biossintéticas do antibiótico, favorecendo ou prejudicando sua produção. O período de fermentação no qual foram coletadas as células foi considerado porque muitos resíduos e metabólitos que se acumulam durante o processo podem interferir na integridade celular, inclusive em sua capacidade de esporulação.

Com isso, pretendeu-se verificar se estas condições poderiam modificar o perfil normal de produção de CefC destes esporos, cultivados no meio padrão já definido.

Todos os inóculos destes testes constituíram-se de suspensão de esporos. Estes, por sua vez, resultaram da esporulação dos micélios que foram coletados durante o cultivo submerso em meios diferentes do meio padrão adotado neste trabalho.

As condições do cultivo de origem dos esporos testados foram denominadas C1, C2, C3 e C4. C1 e C2 consistiram de cultivo em frascos agitados contendo meio complexo (Tabela 3.6) com 10 g.L^{-1} de amido, adição de 5 g.L^{-1} de 1,3- diaminopropano e, respectivamente, 100 e 30 mM de L-lisina. Este aminoácido é um indutor da produção que, em elevadas concentrações no meio de fermentação principal, proporciona aumentos significativos na produção do antibiótico CefC, comparativamente aos meios sem adição do composto (FANG et al, 1996). Em ambas as condições, as células foram coletadas em 36 horas de processo. C3 e C4 consistiram de cultivo em biorreator de bancada contendo meio sintético com maltose 10 g.L^{-1} e 40 mM de L-lisina e se diferenciaram no tempo de coleta, realizada em 48 e 90 horas de processo respectivamente.

C2 e C4 foram consideradas situações menos favoráveis, pois na primeira existia certa restrição do aminoácido essencial para a produção e na segunda, o maior tempo de fermentação gera metabólitos e outros compostos que poderiam prejudicar esporulação destes micélios.

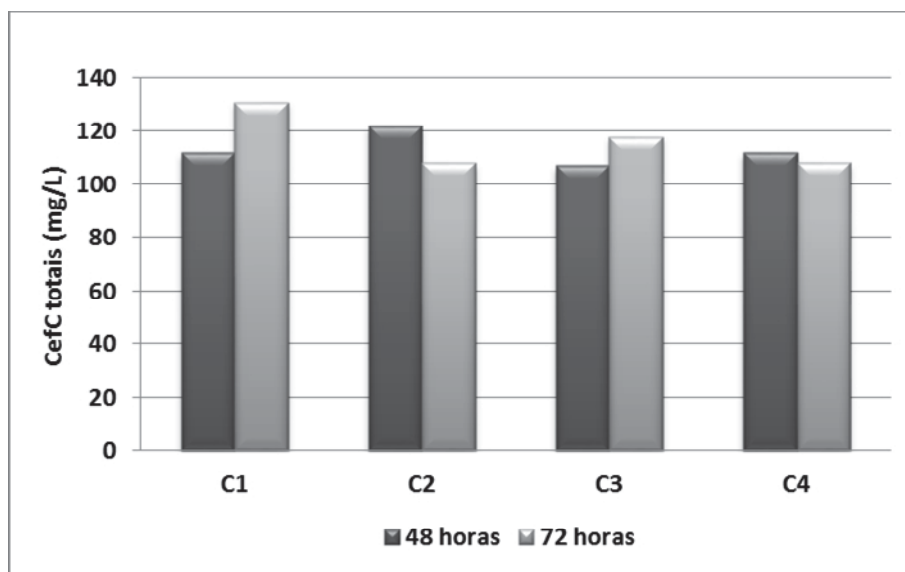


Figura 4.10- Produção de CefC obtida do cultivo de esporos originados das condições C1 a C4.

Em todas as condições pôde-se observar que a viabilidade de produção dos esporos se manteve e estes, por sua vez, mantiveram um aspecto macroscópico uniforme em todas as esporulações realizadas. Aparentemente a produção volumétrica de CefC totais não variou significativamente, conforme se pode verificar na Figura 4.10, obtendo-se um valor médio em 72 horas de processo de 116 mg.L^{-1} entre as condições.

Apesar disto, a concentração celular caiu pela metade em duas condições (C2 e C4) (Figura 4.11) resultando, assim, nas maiores produções específicas (Figura 4.12).

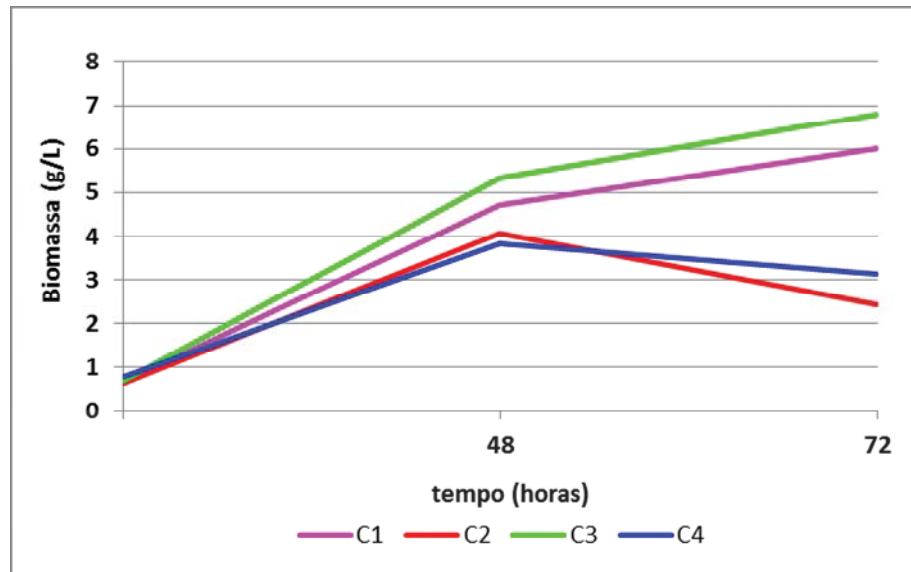


Figura 4.11- Biomassas obtidas do cultivo de esporos originados das condições C1 a C4.

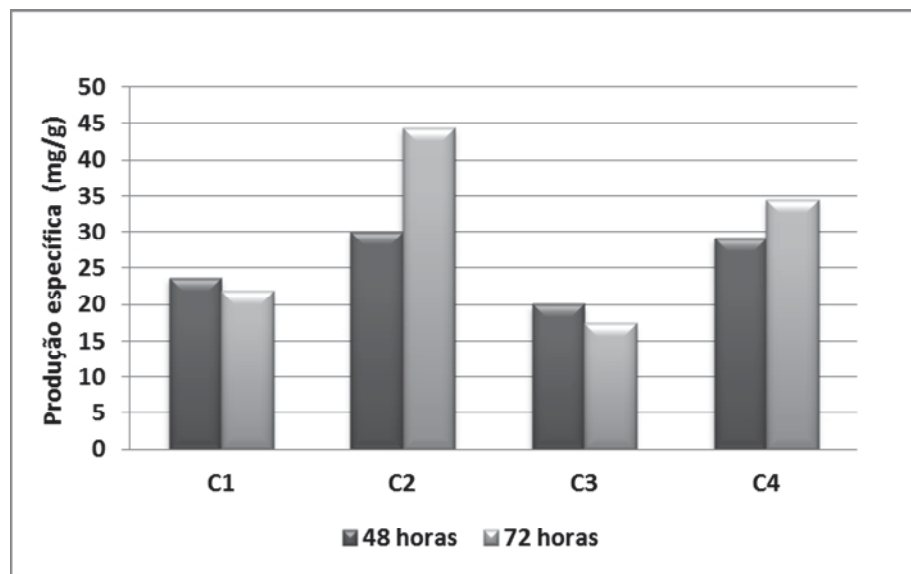


Figura 4.12- Produção específica de CefC obtidos em C1 a C4.

Porém, a cor amarela intensa das amostras de C2 e C4 (Figura 4.13) sugeriu a presença de Holomicina (LIRAS e MARTÍN, 2005), o que não foi observado nas duas outras condições (C1 e C3). Holomicina é um antibiótico não β -lactâmico da classe das pirrotinas produzido em baixas concentrações pela linhagem selvagem de *S.clavuligerus*, e que

apresenta amplo espectro de ação contra bactérias gram positivas e gram negativas (OLIVA et al 2001). Mutações na linhagem selvagem podem resultar em mutantes potencialmente produtores de Holomicina.



Figura 4.13- Aspecto das amostras obtidas das fermentações das condições C2 (esquerda) e C1 (direita).

Análises em HPLC confirmaram esta suspeita (Figura 4.14) e indicaram, também, que não houve produção de Holomicina nas demais amostras (C1 e C3). LIRAS e MARTÍN, 2005 constataram que concentrações de Holomicina acima de 20 mg.L^{-1} podem interferir na determinação de CefC por bioensaio, de forma que não é possível afirmar que os halos de inibição obtidos nas condições C2 e C4 (Figura 4.12) estejam relacionadas unicamente à CefC.

Tais resultados podem ser decorrência de mutações no micro-organismo que induziram a produção de Holomicina. Como mencionado, os esporos utilizados em tais fermentações vieram de um meio restrito em relação ao aminoácido L-lisina (C2) e de um longo período de cultivo em meio pobre de fonte de C (C4). Estas situações podem ter acarretado rearranjos no metabolismo do micro-organismo que alteraram o padrão produção de metabólitos secundários. Desta forma, não é adequado utilizar tais células como inóculo de fermentação para produzir CefC.

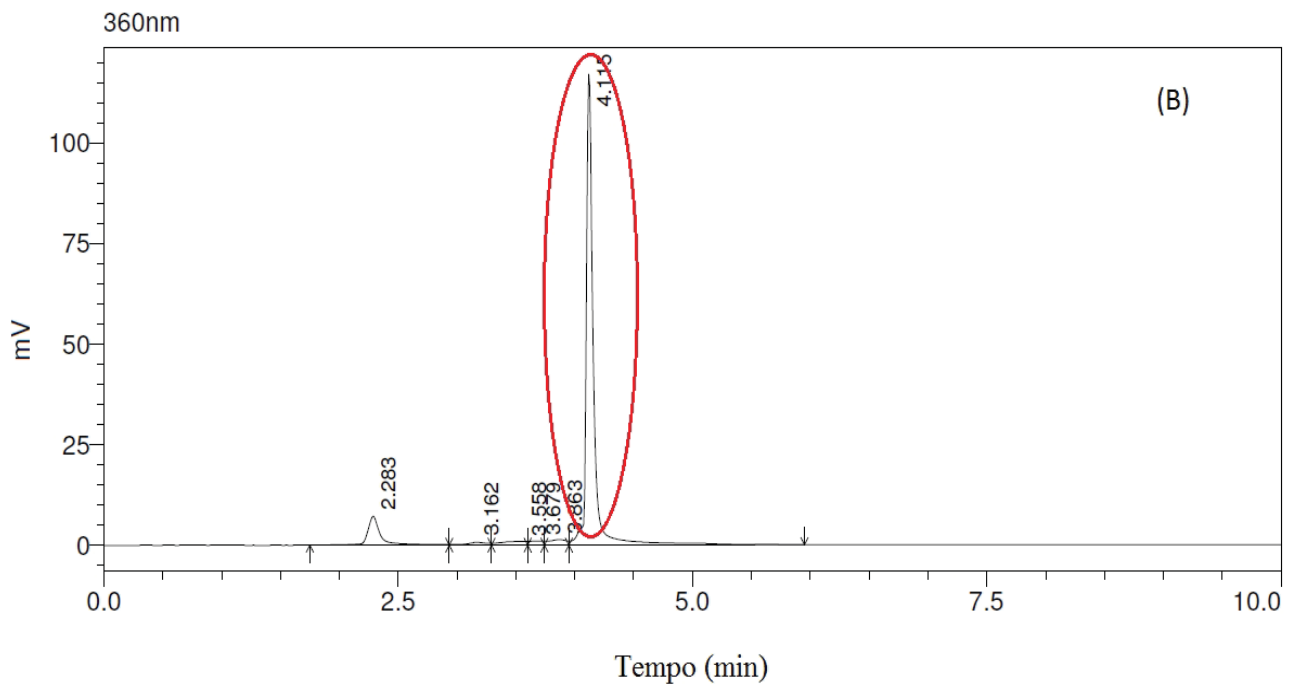
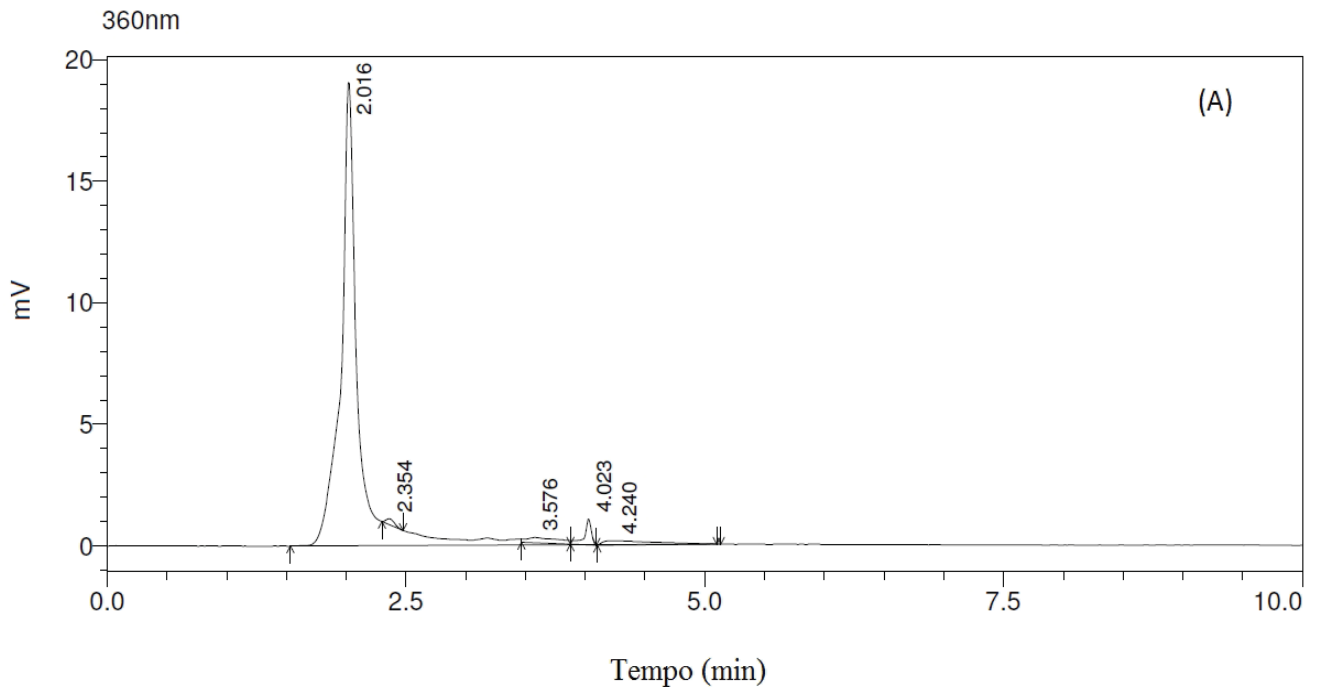


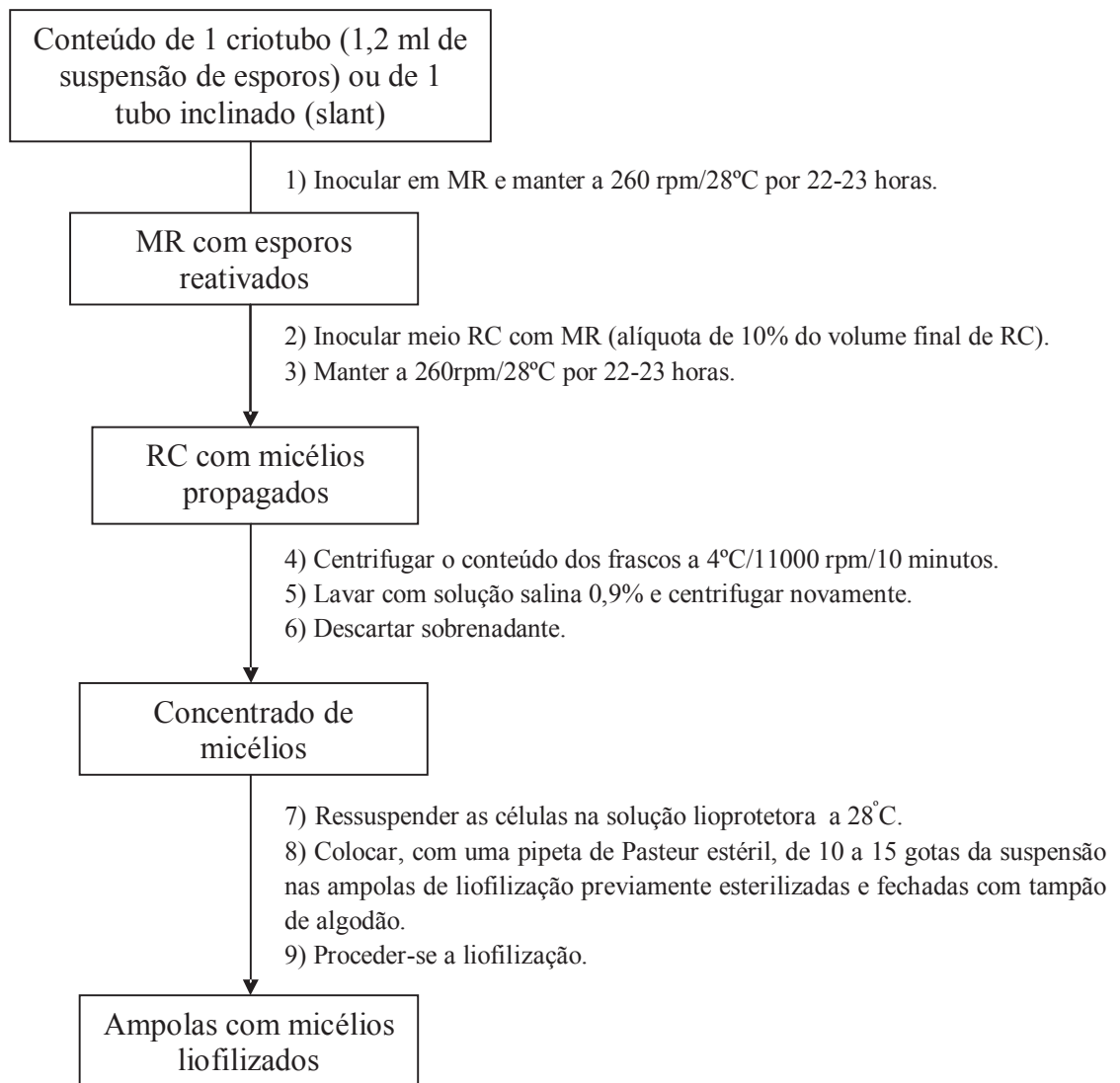
Figura 4.14- Cromatogramas obtidos das análises de amostras de (A) C1 e (B) C2. A formação do pico em destaque corresponde à Holomicina.

4.7) Protocolo de preservação de *S.clavuligerus*

Para a confecção dos bancos de células foi necessário definir e seguir criteriosamente um protocolo para a preservação das mesmas.

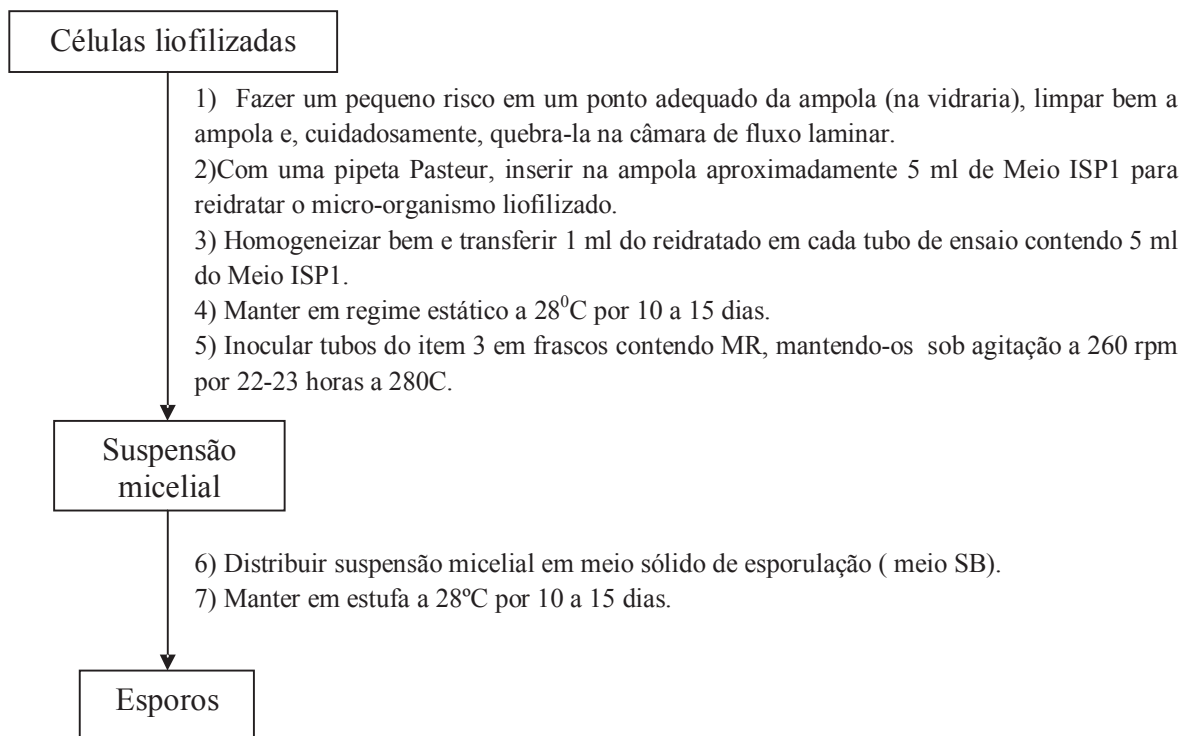
(a) Confecção de ampolas

Para confeccionar ampolas de liofilizado é necessária a obtenção de micélios a partir de esporos. Os procedimentos do protocolo estão ilustrados nos esquemas a seguir.



(b) Confeção de criotubos

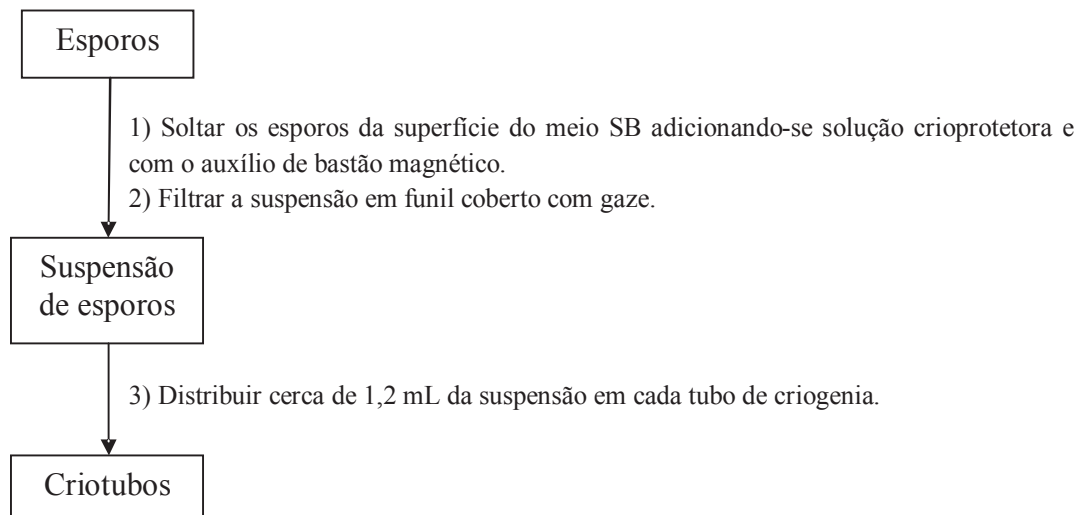
Criotubos consistem de tubos de criogenia para armazenamento de suspensão de esporos. Estes, por sua vez, podem ser obtidos a partir de:



Ou ainda:

Durante o processo fermentativo, pode-se proceder com os itens 6 e 7 do esquema acima utilizando-se suspensão de células resultante de MG.

Obtidos os esporos, procede-se então conforme o seguinte fluxograma para obtenção de criotubos.



Todas as etapas do protocolo foram realizadas assepticamente.

5) CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- Micro-organismos resultantes de gerações sucessivas (sem realização de screening) apresentam perfis de produção de CefC inferiores da linhagem matriz.
- A realização do screening mostrou-se eficiente na seleção de colônias superiores em termos de produção volumétrica, sendo recomendada a realização de tal procedimento periodicamente para manutenção de uma linhagem com maior potencial produtivo. A liofilização destes micro-organismos proporcionou a manutenção da capacidade produtiva, sendo assim, também recomendada como método de conservação e manutenção de linhagens produtivas.
- Esporos provenientes de condições estressantes de cultivo aparentemente sofreram alguma modificação genética que podem ter ocasionado rearranjos no seu metabolismo que alteraram o padrão de produção de metabólitos secundários.

6) REFERÊNCIAS

ANTONIO, T.; CORRÊA, T.; ARAUJO, M. L. G. C. Meios de cultivo de *Streptomyces clavuligerus* para a produção de cefamicina C. In: Simpósio nacional de bioprocessos, 16, 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: [s.n.], PFE0121. 1 CD-ROM. 2007.

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: Anais III Seminário do Projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4, p. 88 – 94, 2009.

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. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 63, p. 593 – 600, 1999.

BATISTA NETO, A.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; BADINO JR, A. C.; BARBOZA, M.; BELLÃO, C.; HOKKA, C. O.; OLIVEIRA, L. M. Determinação da cefamicina C por cromatografia líquida de alta eficiência. In: XII Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas COLACRO XII-2008, Florianópolis, SC., 2008.

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.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters**. New York: John Wiley and Sons. 655 p., 1978.

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.

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

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.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. **Biotechnology of Industrial Antibiotics**, ed. E.J.Vandamme, NY, M. Dekker, Inc., p. 3-31, 1984.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Washington, v. 100, p. 14555-14561, 2003.

CHEN, C. W. The unstable ends of *Streptomyces* linear chromosomes: a nuisance without cures? **TIBTECH**, 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? **Res. Microbiol.**, v. 150, p. 439-445, 1999.

ELANDER, R. P. Industrial production of β -lactam antibiotics. **Appl. Microb. Biotechnol.**, v. 61, n.5-6, p. 385-392, 2003.

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, p. 705-709, 1996.

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

LAVARDA, S. C. S.; HOKKA, C. O.; ARAUJO, M. L. G. C. Clavulanic acid production processes in a tower bioreactor with immobilised cells. **Biochem. Eng. J.**, v. 39, p. 131 – 136, 2008.

LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. **Anton. Leeuw. Int. J. G.**, v. 75, 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**. New Jersey: Humana Press v. 18, p. 149-163, 2005.

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 Biol. Evol.** v. 2, p. 212–224, 2010.

OLIVA B.; O'NEILL A.; WILSON J. M.; O'HANLON P.J.; CHOPRA I. Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** v.45(2), p.532-539, 2001.

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. **Quim. 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**. New Jersey: Pergamon Press v. 3, p. 187-210, 1985.

READING, C.; COLE, M. (1977) Clavulanic acid: a beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus* *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 11, p. 852-857.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 325 p., 2005.

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

STANBURY, P. F., HALL, S.; WHITAKER, A. **Principles of Fermentation Technology**, Butterworth-Heinemann ed., 2nd ed., 376 p., 1999.

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