

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Tatiana Antonio

Obtenção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* e avaliação de condições de cultivo para a melhoria de produção de cefamicina C.

Tese de Doutorado
2012

Araraquara, fevereiro de 2012.

Tatiana Antonio

Obtenção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* e avaliação de condições de cultivo para a melhoria de produção de cefamicina C.

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

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

Araraquara

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Antonio, Tatiana
A635o Obtenção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* e
avaliação de condições de cultivo para a melhoria de produção
de cefamicina C / Tatiana Antonio. – Araraquara : [s.n], 2012
62 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo

1. Biotecnologia. 2. Diaminas. 3. Mutagênese clássica.
4. Cefamicina C. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DADOS CURRICULARES

Tatiana Antonio

Dados Pessoais

Nome Tatiana Antonio

Nascimento 31/05/1979- São Carlos/SP-Brasil

Formação Acadêmica/Titulação

2005 - 2007 Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Araraquara/SP, Brasil
Título: Estudo da composição de meios de cultura para a
produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*
Ano de obtenção: 2007
Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior

2001 - 2005 Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Assis/SP, Brasil
Título: Ação Antibacteriana de Leveduras
Orientador: Pedro de Oliva Neto
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
São Paulo

Formação complementar

2009 - 2009 Curso de curta duração em Cromatografia Líquida (HPLC ou
CLAE). Instituto Internacional de Cromatografia, IIC, São
Carlos, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Purificação de Produtos
Biotecnológicos. Sociedade Brasileira de Microbiologia, SBM,
Santos Paulo, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Controle Microbiológico na
Indústria Farmacêutica. Sociedade Brasileira de Microbiologia,
SBM, Santos, Brasil

2004 - 2004 Curso de curta duração em Biossegurança no Laboratório.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
UNESP, Assis, Brasil

2002 - 2004 Extensão universitária em UNESP Recicla. Universidade
Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Assis,
Brasil

- 2003 - 2003 Curso de curta duração em O Trabalho Científico do Projeto à Publicação. Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil
- 2003 - 2003 Microbiologia. Instituto Butantan, INSTITUTO BUTANT, Brasil
- 2003 - 2003 Curso de curta duração em O Ecoturismo e o Biólogo. Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil
- 2003 - 2003 Oficina de Modelagem Em Massa. Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil
- 2003 - 2003 Extensão universitária em Evolução Humana. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2002 - 2002 Curso de curta duração em Vivências Integradas Com o Meio Ambiente. Parque Ecológico de São Carlos, PARQUEECOLÓGICOD, Brasil
- 2002 - 2002 Ecologia de Insetos Aquáticos. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, Brasil
- 2002 - 2002 Curso de curta duração em Ecologia e Comportamento de Cetáceos. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2002 - 2002 Curso de curta duração em Ecologia de Ambientes Marinhos Costeiros. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2001 - 2001 Curso de curta duração em Introdução Ao Comportamento de Cetáceos Marinhos. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2001 - 2001 Curso de curta duração em Metodologia de Pesquisa de Aves Em Campo. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2001 - 2001 Curso de curta duração em Educação Ambiental Em Parques e Zoológicos. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, Brasil

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

ANTONIO, Tatiana, FREITAS, T. L., ARAUJO, Maria Lucia Gonsales da Costa

1. Obtenção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* com capacidade produtiva aumentada de Cefamicina C In: Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2011, Caxias do Sul.
Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos. , 2011.

2. ANTONIO, Tatiana, BELLAO, C., Badino, A.C., ARAUJO, Maria Lucia Gonsales da Costa
Avaliação da Influência de Componentes no Meio de produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal. **Anais do XVII SINAFERM**, 2009.

BELLAO, C., ANTONIO, Tatiana, ARAUJO, Maria Lucia Gonsales da Costa, Badino, A.C.
Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio a base de soja na produção de cefamicina C In: III Seminário do Projeto Temático, 2009, São Carlos.
3. **Anais do III Seminário do Projeto Temático (Proc.05/55079-4)**, 2009. v.1. p.119 – 123

ANTONIO, Tatiana, FREITAS, T. L., ARAUJO, Maria Lucia Gonsales da Costa
4. Métodos de seleção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus*, a partir de tratamento com MMS In: III Seminário do Projeto Temático, 2009, São Carlos. **Anais do III Seminário do Projeto Temático (Proc. 05/55079-4)**, 2009. v.1. p. 88 – 94

BELLAO, C., ANTONIO, Tatiana, ARAUJO, Maria Lucia Gonsales da Costa, Badino, A.C.
Avaliação de fontes de carbono e nitrogênio na produção de cefalosporinas totais por *Streptomyces clavuligerus* In: II Seminário do Projeto Temático, 2008, Campinas. **Anais do II Seminário do Projeto Temático (poc. 05/55079-40)**, 2008. v.1. p.47 – 53
5.

ANTONIO, Tatiana, ARAUJO, Maria Lucia Gonsales da Costa
Efeito da Adição de L-lisina e alfa-cetoglutarato na Produção de cefalosporinas por *Streptomyces clavuligerus* - parte I In: II Seminário do Projeto Temático, 2008, Campinas. **Anais do II Seminário do Projeto Temático (Proc. 05/55079-4)**, 2008. v.1. p. 33 – 39
6.

ANTONIO, Tatiana, CORREA, T., BELLAO, C., Badino, A.C., ARAUJO, Maria Lucia Gonsales da Costa
Efeito da Adição de L-lisina e alfa-cetoglutarato na Produção de cefalosporinas por *Streptomyces clavuligerus* - parte II In: II Seminário do Projeto Temático, 2008, Campinas. **Anais do II Seminário do Projeto Temático (Proc. 05/55079-4)**, 2008. v.1. p. 136 – 141
7.

ANTONIO, Tatiana, ARAUJO, Maria Lucia Gonsales da Costa
Meios de Cultura para a Produção de Antibióticos beta-lactâmicos por *Streptomyces clavuligerus* In: II Seminário do Projeto Temático, 2008, Campinas. **Anais do II Seminário do Projeto Temático (Proc. 05/55079-4)**, 2008. v.1. p. 40 – 46
8.

9. ANTONIO, Tatiana, CORREA, T., ARAUJO, Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo. Meios de cultivo de *Streptomyces clavuligerus* para a produção de cefamicina C In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007, Curitiba. **Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2007.

- ANTONIO, Tatiana, CORREA, T., ARAUJO, Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo. Seleção de Nutrientes para o Processo de Produção de cefalosporinas por *Streptomyces clavuligerus* In: I Seminário do Projeto
10. Temático, 2007, São Carlos. **Anais do I Seminário do Projeto Temático (Proc. 05/55079-4)**, 2007. v.1. p. 43 – 44

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- ANTONIO, Tatiana, ARAUJO, Maria Lucia Gonsales da Costa
Metabolismo de Compostos Indutores de produção de Antibióticos beta-lactâmicos em Mutantes de *Streptomyces clavuligerus* In: II Seminário do
1. Projeto Temático, 2008, Campinas. **Anais do II Seminário do Projeto Temático (Proc. 05/55079-4)**. v.1. p.135 – 135

- ANTONIO, Tatiana, OLIVA NETO, Pedro de
2. Ação antibacteriana de *Saccharomyces cerevisiae* M 26 e *Saccharomyces cerevisiae* subespécie bouldardii In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos. **CBM 2005-Programa de resumos**, v.único. p.157.

- ANTONIO, Tatiana, PARAZZI JUNIOR, Osmar, COUTINHO, Tatiane Sueli, SILVA, Cintia Regina Rodrigues da, OLIVA NETO, Pedro de
3. Ação antibacteriana de *Saccharomyces cerevisiae* M 26 e *Saccharomyces cerevisiae* subespécie bouldardii em meio sólido In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica, 2004, Ribeirão Preto. **12 SIICUSP**.

- PARAZZI JUNIOR, Osmar, OLIVA NETO, Pedro de
Estudo Comparativo da Fermentação Alcoólica de *S. cerevisiae* M 26 e PE-2
4. em batelada alimentada com reciclo de células, na presença de *Lactobacillus fermentum* CCT 1396 In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica, 2004, Ribeirão Preto. **12 SIICUSP**.

- ANTONIO, Tatiana, PARAZZI JUNIOR, Osmar
Análise dos diferentes parâmetros do processo de fermentação alcoólica de *S. cerevisiae* M26 e PE-2 em cultivo com *L.fermentum* CCT1396 In: I Mostra
5. de Produção Científica em Biologia, 2003, Assis.
I Mostra de Produção Científica em Biologia. Assis: Gráfica UNESP Assis, 2003. v.1. p.14 – 15

- ANTONIO, Tatiana, RISSO, Aline Silva, PARAZZI JUNIOR, Osmar
6. Leveduras de Destilarias de Etanol do Médio Paranapanema são isoladas por Apresentarem propriedades antibacterianas In: I Mostra de Produção

Científica em Biologia, 2003, Assis. **I Mostra de Produção Científica em Biologia**. Assis: Gráfica da Unesp Assis, 2003. v.1. p.24 - 24

Produção Técnica

Demais produções técnicas

ANTONIO, Tatiana

1. Ações de Micro-organismos no Ambiente Hospitalar, 2004. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

ANTONIO, Tatiana

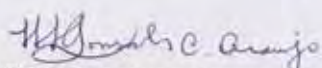
2. Meio Ambiente e Reciclagem, 2003. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

TATIANA ANTONIO

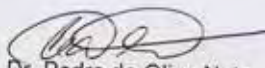
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Araraquara, 23 de fevereiro de 2012

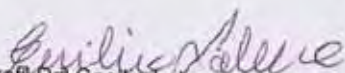
BANCA EXAMINADORA



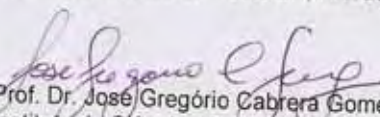
Profª Drª Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



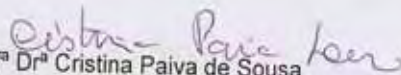
Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto
Faculdade de Ciências e Letras – UNESP, Assis



Profª Drª Cecilia Lafuze
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez
Instituto de Ciências Biomédicas – USP, São Paulo



Profª Drª Cristina Paiva de Sousa
Centro de Ciências Biológicas e de Saúde – UFSCar, São Carlos

Agradeço a **Deus**, pela vida, pela saúde e família e também proteção nos momentos de maior dificuldade;

A **minha mãe, Ana Maria**, por estar presente na minha vida, sempre com tanto amor, dedicação, e apoio sempre;

Ao **João**, pelo carinho e pelos conselhos tão paternais;

Ao meu marido, **Rodrigo**, pela compreensão, pelo amor, por fazer parte da minha vida, te amo;

A minha **avó Aparecida**, pelo carinho, por nossas conversas e suas incansáveis orações;

As minhas tias **Rita e Angela** e meu tio **Waldomiro**, pelo apoio, carinho e incentivo;

Ao **Padre Mauro** pela amizade e orações;

As minhas **amigas Fabiana, Simone A, Simone S, Selma, e Thaís**, por tantos anos de amizade sincera e pelo apoio em todos os momentos;

Aos meus sogros, **Luiz e Regina**, pelo apoio e incentivo;

Aos colegas de laboratório, **André, Carla e Telma**, pela ajuda durante a jornada de trabalho e pela troca de conhecimento;

A **Profa. Lucia** pela orientação e pelos conhecimentos transmitidos.

A **FAPESP** pelo auxílio financeiro **(2008/03579-1)**

RESUMO

Mutantes foram obtidos através de tratamento mutagênico dos esporos de *S. clavuligerus* ATCC 27064 com metil-metanosulfonato. Um total de 822 colônias, obtidas por repiques sucessivos, foram selecionadas em testes qualitativos e/ou quantitativos. O melhor mutante *S. clavuligerus* 45.41, mostrou-se de duas a quatro vezes mais produtivo que a linhagem selvagem, e manteve-se estável após 35 repiques sucessivos ao longo deste estudo. O comportamento das linhagens foi investigado pela adição de diferentes diaminas ao meio de cultivo, uma a uma, na ausência de lisina. Também se investigou duas fontes distintas de C, além de compostos como o ácido 2,6-diaminopimélico. Um planejamento de dois fatores (cadaverina e lisina), três níveis, baseado no ponto central, faces centradas, indicou que a adição de lisina aumenta a produção de CefC para ambas as linhagens. O efeito positivo da cadaverina foi observado principalmente na linhagem mutante 45.41. Resultados obtidos em processo de batelada, em biorreator de bancada confirmaram as diferenças observadas entre as linhagens nos cultivos em frascos agitados. Procedimento de mutagênese clássica foi utilizado em conjunto com critérios bem definidos para se estabelecer um meio de cultura apropriado, com o objetivo de alcançar um aumento significativo da produção de CefC. Este é o primeiro estudo utilizando um mutante de *S. clavuligerus* obtido por mutagênese clássica, cuja produção de CefC é de três vezes maior que a da linhagem selvagem, em meios contendo diaminas.

Palavras- chave: Cefamicina C. Mutagênese. Diaminas. *Streptomyces clavuligerus*.

ABSTRACT

Mutants were obtained by treating *S. clavuligerus* ATCC 27064 spores with methyl-methanesulfonate. A total of 822 colonies, obtained by successive sampling, were selected by qualitative and/or quantitative tests. The best mutant, *S. clavuligerus* 45.41, was two to four times more productive than the wild-type strain, and remained stable even after 35 successive samplings throughout the study. Strains behavior was investigated by adding different diamines in media, one by one, in the absence of lysine. Also investigated two different sources of C, and compounds such as 2,6-diaminopimelic acid. The two-factor (cadaverine and lysine), three-level, central composite-based, face-centered experimental design indicates that adding lysine increases CephC production for both strains alike. The positive effect of cadaverine was observed mainly in the Mutant 45.41 strain. Results obtained in batch-processes in a bench-scale bioreactor confirmed differences among strains observed in shaken flasks cultures. Classical mutagenesis procedures in conjunction with the adoption of well-defined criteria to establish an appropriate culture medium promoted a significant improvement in CephC production. It is the first study indicating an increase in CephC production in media containing diamines employing a mutant of *S. clavuligerus* obtained by classical mutagenesis.

Keywords: Cephamycin C. Mutagênese. Diamines. *Streptomyces clavuligerus*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Rota biossintética de compostos β -lactâmicos em *S. clavuligerus*: **(A)** (1) ácido L- α -aminoadipil-L- cisteinil -D- valina (LLD-ACV); (2) isopenicilina N (IPN); (3) penicilina N (PenN); (4) deacetoxicefalosporina C (DAOC); (5) deacetilcefalosporina C (DAC); (6) cefalosporina C (CPC) (somente em fungos filamentosos); (7) cefamicina C (CefC) (somente em actinomicetos); onde $R^1 = L\text{-}\delta\text{-}(\alpha\text{-aminoadipil})\text{-}$ e $R^2 = D\text{-}\delta\text{-}(\alpha\text{-aminoadipil})$; **(B)** ácido clavulânico (8) (LIRAS, 1999) **23**
- Figura 1.2.** Trajetória do aspartato e conversão da L-lisina em ácido α - aminoadípico em *S. clavuligerus* (YILMAZ et al, 2008). **25**
- Figura 2.** Esquema geral do procedimento experimental utilizado na pré-cultura de todas as fermentações e na fermentação principal de todos os experimentos em mesa rotativo-incubadora. **30**
- Figura 3.** Seqüência de testes para obtenção da linhagem mutante 45.41. **35**
- Figura 4.** Valores médios de $(H/h)/(H/h)_{max}$ e desvios padrão correspondentes obtidos no teste qualitativo com 48 linhagens mutantes (sextuplicata de cada linhagem e linhagem selvagem h = diâmetro de uma colônia a partir de 1 UFC; H = diâmetro da zona de inibição obtida para cada colônia). **38**
- Figure 5.** Concentração de CefC obtida em cultivo em batelada em frascos agitados, em 72 horas. **39**
- Figura 6.** Valores médios da concentração de CefC e desvios padrão obtidos em cultivo em batelada, em frascos agitados com meio de produção padrão, colônias provenientes do teste de estabilidade, e linhagem selvagem em 72 horas. **40**
- Figura 7.** Exemplos dos resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho, **(A)** crescimento diferenciado das colônias e **(B)** disposição dos discos em meio nutriente ágar acrescido de *E.coli* e Penase® (h medida em mm do diâmetro da colônia e H medida do diâmetro do halo de inibição em mm). **42**

- Figura 8.** Cromatogramas típicos e tempos de retenção e respectivas áreas para detecção de holomicina no caldo fermentativo: linhagem selvagem (A) e linhagem 45.41 (B). **43**
- Figura 9.** Resultados obtidos em cultivo submerso, variando-se a fonte de C, amido ou maltose, em 72 horas: (A) valores médios de CefC e respectivos desvios padrão e (B) biomassa (coluna preta- maltose e coluna branca –amido). **44**
- Figura 10.** Resultados obtidos em cultivo submerso, variando-se a fonte de C, amido (A) ou maltose (M), em 72 horas: (A) valores médios de CefC e respectivos desvios padrão e (B) biomassa (coluna preta- linhagem selvagem ATCC 27064 e coluna branca –linhagem 45.41). **45**
- Figura 11.** Valores médios da concentração de CefC e desvios padrão obtidos em 48 horas de cultivo em frascos agitados, com a linhagem selvagem (colunas pretas) e linhagem 45.41 (colunas brancas) (0: sem lisina ou cadaverina; P: putrescina; DAP: ácido 2,6-diaminopimélico; 1,3D: 1,3-diaminopropano; Cad: cadaverina) e concentração em g/l ao lado das abreviações. **47**
- Figura 12.** (A) Superfície de resposta (coeficiente de determinação de 0.902 a 90% de nível de confiança) e (B) valores observados vs. previstos de CefC (mg/l) em 48 horas de cultivo em frascos agitados, com a linhagem selvagem *S. clavuligerus* ATCC 27064. **49**
- Figura 13.** (A) Superfície de resposta (coeficiente de determinação de 0.973 a 90% de nível de confiança) e (B) valores observados vs. previstos de CefC (mg/l) em 48 horas de cultivo em frascos agitados, com a linhagem 45.41. **51**
- Figura 14.** (A) Biomassa e (B) concentração de CefC obtidos em biorreator de bancada agitado e aerado, com *S. clavuligerus* ATCC 27064 (símbolos sólidos) e linhagem 45.41 (símbolos abertos). **53**
- Figura 15.** Catabolismo da lisina em *Streptomyces* spp. As enzimas são: 1, lisina descarboxilase; 2, cadaverina aminotransferase; 3, 1-piperideína deidrogenase; 4, lisina ϵ -aminotransferase; 5, 1-piperideína-6-carboxilato deidrogenase. O passo da direita é essencial para o crescimento da *Streptomyces* spp. na presença de lisina (5); o passo da esquerda só está presente em linhagens de *Streptomyces* spp. produtoras de β - lactâmicos. **55**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentração das diaminas utilizadas no quinto experimento. **37**
- Tabela 2.** Faixa e níveis de concentração de lisina e cadaverina, em unidades originais e codificadas, de acordo com o planejamento de faces centradas, e a concentração de CefC em 48 horas (variável resposta) em cultivos em batelada, para cada linhagem. **48**
- Tabela 3.** Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrático*, a 90% de nível de confiança, para dados experimentais do ponto central, face centrada obtidos para a linhagem selvagem *S. clavuligerus* ATCC 27064. **50**
- Tabela 4.** Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrático*, a 90% de nível de confiança, para dados experimentais do ponto central, face centrada obtidos para a linhagem 45.41. **52**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. <i>Streptomyces clavuligerus</i>	19
3.2. Cefamicina C: definição, biossíntese e produção	20
3.3. Melhoramento de linhagens através de mutagênese clássica	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Micro-organismos	28
4.2. Cultivo da bactéria-teste (<i>E.coli</i> ESS 223)	28
4.3. Cultivo do micro-organismo produtor de CefC	28
4.3.1. Meio sólido de esporulação de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	28
4.3.2. Cultivo submerso de <i>Streptomyces clavuligerus</i>	29
4.3.2.1. Procedimento de reativação	29
4.3.2.2. Cultivo para a formação do inóculo e produção de CefC.	29
4.4. Condições gerais de cultivos e tratamento de caldo fermentativo.	30
4.5. Métodos analíticos.	31
4.6. Tratamentos mutagênicos dos esporos de <i>S.clavuligerus</i> com o agente MMS (metil- metanosulfonato)	32
4.6.1. Seleção dos mutantes pela produção de CefC em meio sólido.agente MMS (metil- metanosulfonato)	34
4.6.2. Seleção quantitativa em cultivos submersos de linhagens mutantes.	35
4.6.2.1. Seleção dos melhores isolados em meio padrão de produção de CefC (ANTONIO et al., 2007).	35
4.6.2.2. Efeito da fonte de C sobre a seleção dos isolados.	36
4.6.2.3. Efeito das diaminas sobre a seleção dos isolados.	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. Seleção dos mutantes pela produção de CefC em meio sólido.	37
5.2. Seleção quantitativa em cultivos submersos de linhagens mutantes.	39
6. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

Compostos β -lactâmicos são produzidos por várias espécies de *Streptomyces* e representam o mais bem sucedido exemplo de produto natural, tanto em termos comerciais, quanto terapêuticos. As cefalosporinas naturais e a penicilina são ainda matéria-prima para a produção de antibióticos semi sintéticos mais efetivos contra um grande número de bactérias patogênicas (BUSSARI et al., 2009). *Streptomyces clavuligerus* (*S. clavuligerus*) produz vários compostos β -lactâmicos, incluindo o ácido clavulânico— um potente inibidor de β -lactamases — e cefamicina C (CefC)—um antibiótico que é mais resistente a β -lactamases que o antibiótico de estrutura similar, a cefalosporina C (CPC). Esta é produzida pelo fungo *Cephalosporium acremonium* em escala industrial. A CefC é usada como matéria-prima para a produção de antibióticos semi-sintéticos (cefoxitin, cefotetan, cefmetazole, e flomoxef), efetivos contra bactérias anaeróbias (BUSSARI et al., 2009).

Devido à importância de *Streptomyces* spp, as grandes indústrias farmacêuticas sempre investiram em programas de melhoramento de linhagens. Seja por meio de mutagênese clássica ou direcionada ou uma combinação de ambas as técnicas, sabe-se que a obtenção de linhagens super produtoras não é uma tarefa simples, uma vez que a pronunciada instabilidade genética inerente a *Streptomyces* spp torna os mutantes deste gênero de bactérias ainda mais susceptíveis à reversão da capacidade produtiva em comparação com a linhagem selvagem original (DARY et al., 1999; SRIDHAR, 2002; PATNAIK, 2008). O processo de seleção de linhagens melhoradas tem sido utilizado com sucesso e envolve repetidas aplicações de três princípios básicos: (1) mutagênese de uma linhagem, com o intuito de induzir a variabilidade genética; (2) seleção ao acaso e isolamento de colônias sobreviventes para encontrar uma linhagem melhorada e (3) bioensaio buscando mutantes com maior capacidade produtiva (PAREKH et al., 2000). Especificamente nos casos do uso de técnicas clássicas, muitos testes qualitativos e quantitativos devem ser realizados com o maior número possível de colônias sobreviventes ao tratamento mutagênico devido à aleatoriedade da mutação (GORYANIN et al., 2006). Após a obtenção de pelo menos uma linhagem potencialmente promissora, segue-se a identificação das diferenças

mais importantes entre os cultivos do mutante e da linhagem selvagem em um meio padrão. Esta identificação torna possível o melhoramento contínuo das condições de cultivo do mutante com a finalidade de se obter uma produção ótima do biocomposto de interesse. Invariavelmente, a definição de um meio de cultura adequado é o primeiro passo dessa etapa.

O desenvolvimento de um meio econômico requer a seleção de fontes de carbono(C), nitrogênio(N), fósforo(P), potássio(K) e elementos traço (Fe, Mn, Zn). A melhoria das condições nutricionais relativas ao meio tem um importante papel no desenvolvimento de bioprocessos e no seu melhor desempenho. Os requerimentos nutricionais podem ser manipulados por método convencional ou estatístico (KUMAR e SATYANARAYANA, 2007). Assim, a seleção das fontes de C pode ser crítica não apenas por seu impacto direto na produtividade, mas também por seu impacto indireto no papel do nitrogênio nas culturas. Diante disso, a seleção apropriada de fontes de C e N pode ter um efeito significativo nos picos de produção e no rendimento dos metabólitos secundários, assim como nos custos da matéria-prima.

Tem sido demonstrado que a presença de determinados precursores de um antibiótico ou de moléculas estruturalmente análogas a esses precursores em meios de cultivo pode alavancar a biossíntese do antibiótico (LIRAS e DEMAÏN, 2009). Vários autores constataram que altas concentrações de lisina no cultivo submerso de *S. clavuligerus* 27064, cerca de 100 mM, aumentaram a atividade da primeira enzima da rota biossintética de CefC – lisina- ϵ -aminotransferase (LAT) -, induzindo uma maior produção do antibiótico, comparativamente a meios de cultura contendo menos ou nenhuma lisina (FANG et al., 1996; DEMAÏN e VAISHNAV, 2006). Os autores têm justificado este comportamento com base na maior demanda de lisina para o metabolismo primário (via cadaverina aminotransferase) em comparação com o consumo do aminoácido para a biossíntese de CefC, cuja rota é energeticamente bem menos favorável (FANG et al., 1996; KHETAN et al., 1999).

Leitão *et al.* (1999) mostraram que a adição de diaminas no cultivo de *Nocardia lactamdurans* aumentou o nível de várias enzimas da rota biossintética de CefC por meio da indução da transcrição de genes associados ao início da rota. Os autores acreditam que esta característica pode ter sido originada como uma vantagem na competição por nutrientes com bactérias

produtoras de diaminas que ocupam o mesmo habitat natural. Kagliwal et al. (2009) aperfeiçoaram um meio sólido de cultivo de *N. lactamdurams* para a produção de CefC e obtiveram o dobro de rendimento de antibiótico por unidade de massa seca de células, adicionando-se 1,3-diaminopropano ao meio melhorado. Mendelovitz e Aharonowitz (1982) obtiveram resultados positivos de produção de cefalosporinas em *S. clavuligerus* 27064 utilizando ácido 2,6- diaminopimélico (DAP). Entretanto, não há trabalhos relacionados ao efeito de outras diaminas em culturas desta espécie.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto foi obter linhagem(s) mutante(s) com maior capacidade produtiva de CefC, comparada a linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. Para se alcançar este objetivo geral, foi necessário concluir objetivos parciais como a obtenção da linhagem mutante através de técnica de mutagênese clássica, com o uso do agente químico alquilante MMS, além da busca por condições específicas de cultivo, pela manipulação de compostos no meio, como fontes de C, diaminas, ácido 2,6 diaminopimélico, que pudessem favorecer a produção do composto de interesse.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Streptomyces clavuligerus*

S. clavuligerus é uma bactéria filamentosa gram positiva pertencente ao grupo dos actinomicetes. Foi isolada de uma amostra de solo na América do Sul, sendo descrita pela primeira vez por Higgens e Kastner (1971). É um microrganismo aeróbio, com condições favoráveis ao seu crescimento em temperatura entre 25 e 35 °C, e pH entre 6,5 e 8,0. Está depositada no banco da ATCC sob número 27064, e no banco da NRRL sob numeração 3585. Duas características são marcantes nesta espécie de microrganismo: a incapacidade de metabolizar glicose (GARCIA-DOMINGUEZ et al., 1989), e a incomum presença do ciclo da uréia em um procarioto (BUSHELL et al., 2006).

S. clavuligerus tem a capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, como os antibióticos β -lactâmicos da rota biossintética da cefalosporina C (CPC) (penicilina N, deacetilcefalosporina C, deacetoxicefalosporina C), e o AC, um potente inibidor de β -lactamases, além de outras vinte clavamas. Produz ainda holomicina, n-propionil-holotina e tunicamicina (LIRAS; RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2000). Dentre estes compostos, destacam-se o AC (PRUES; KELLETT, 1983; BRUNDTLAND, 2000) e a CefC, mais potente e resistente a β -lactamases que CPC (OMSTEAD et al., 1985; BRAKHAGE et al., 2005).

3.2 Cefamicina C: definição, biossíntese e produção

A descoberta e o desenvolvimento de antibióticos β -lactâmicos estão entre as mais importantes e bem sucedidas realizações da ciência moderna e tecnológica. Desde a descoberta acidental da penicilina por Alexander Fleming em 1928, mais de oitenta anos de constante progresso se passaram e, ainda hoje, o grupo dos compostos β -lactâmicos é o exemplo mais bem sucedido da aplicação de produtos naturais. Seguindo os passos da produção de penicilina G por *Penicillium chrysogenum*, houve a descoberta da formação de cefalosporina pelo *Cephalosporium acremonium*, em meados da década de 1940, de cefalosporinas, cefamicina, clavams e outros compostos bioativos por actinomicetes, em meados da década de 1970, bem como de β -lactâmicos monocíclicos por actinomicetes e bactérias unicelulares. Vários compostos destes grupos têm sido aplicados clinicamente, com sucesso (DEMAIN e ELANDER, 1999; ELANDER, 2003).

Atualmente, os antibióticos β -lactâmicos são classificados com base em suas estruturas básicas: penam, cefam-3-em, clavamas, carbepenema e monolactama, sendo que as penicilinas e cefalosporinas são as mais eficazes de todos os agentes terapêuticos no controle das enfermidades infecciosas (SATO, 2002). Estes antibióticos são produtos do metabolismo secundário de micro-organismos, geralmente não associados ao crescimento, e sintetizados em baixas velocidades específicas de crescimento celular (DÉVI e SRIDHAR, 2000). Embora os antibióticos β -lactâmicos apresentem grande eficácia no combate à maioria das bactérias patogênicas, eles estão gradualmente se

tornando ineficazes em virtude da produção de β -lactamases pelos agentes infectantes, as quais inativam antibióticos desse gênero pela quebra do anel β -lactâmico (SRIDHAR, 2002). Desta forma, na década de 1970 pesquisadores elaboraram programas de seleção e isolamento de culturas microbianas produtoras de inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico, e de antibióticos resistentes à ação dessas enzimas, como as cefamicinas.

As cefamicinas, ou α -metoxicefalosporinas, são estruturalmente semelhantes às cefalosporinas, sendo as primeiras mais resistentes à ação de β -lactamases em virtude da presença do grupo 7- α - metoxila, que atua como estabilizador da estrutura do anel β -lactâmico (OMSTEAD, 1985; ESSACK, 2001). Sua ação está relacionada à interferência no estágio final de síntese da parede celular (peptidoglicanas) pela inibição de enzimas bacterianas transpeptidases e carboxipeptidases, as quais catalisam a reação de síntese das peptidoglicanas (ESSACK, 2001).

A cefamicina C (CefC) é produzida por *Streptomyces clavuligerus*, entre outras bactérias filamentosas (actinomicetes). Encontram-se na literatura disponível, trabalhos relativos à biossíntese de CefC sob diversas abordagens (microbiológica, bioquímica, genética, química), versando sobre a descoberta e caracterização de compostos intermediários, enzimas envolvidas nas etapas, e respectivos quatro genes codificadores, como também sobre proposições de mecanismos inter-relacionando aos metabolismos primário e secundário (WEIL et al., 1995; LIRAS, 1999; DEMAINE et al., 2006; YILMAZ et al., 2008).

Recentemente foi comprovado que, apesar das rotas biossintéticas de CefC e do ácido clavulânico (AC) (Figura 1.1), serem totalmente distintas, elas são controladas pelo mesmo elemento multifuncional, "ccaR" ("cephamycin and clavulanic acid Regulator"), codificada pelo gene *ccaR*, localizado no agrupamento de genes da biossíntese de CefC (JENSEN et al., 2004; BIGNELL et al., 2005). Isto dificulta a indução da produção de CefC durante o processo fermentativo, tornando de vital importância a identificação de fontes de C, N e de outros elementos, assim como precursores, indutores e co-fatores enzimáticos específicos para a biossíntese de cada um dos compostos.

A biossíntese de CefC em *S. clavuligerus*, assim como ocorre com outros metabólitos secundários, é regulada por intermediários do metabolismo primário e por determinados componentes que participam, direta ou

indiretamente, da rota biossintética (ROMERO et al, 1984; OMSTEAD et al, 1985). Segundo Demain et al., (2006) os aminoácidos mais importantes do ponto de vista da regulação são L-lisina, metionina, glutamato e valina. Rius et al., (1996) verificaram que a adição de 10 a 150 mM de L-lisina no meio de cultivo de *S. clavuligerus* resultou em aumentos crescentes na produção de CefC entre 50 e 400%, devidos à conversão da L-lisina em ácido L- α -aminoadípico pela lisina- ϵ -aminotransferase (LAT). Demain et al., (2006) ainda observaram que diaminopropano, putrescina e cadaverina também induzem a produção de cefamicinas por actinomicetes.

De uma maneira geral, fontes orgânicas de N (aminoácidos, extratos protéicos) são mais adequadas ao desenvolvimento celular de *Streptomyces* que fontes inorgânicas de N (sais de amônio). Na literatura, são citados como fontes adequadas a maioria dos aminoácidos e extratos protéicos vegetais como os de caroço de algodão e de soja, além de caseínas (KIESER et al., 2000; TROVATTI et al.,2006).

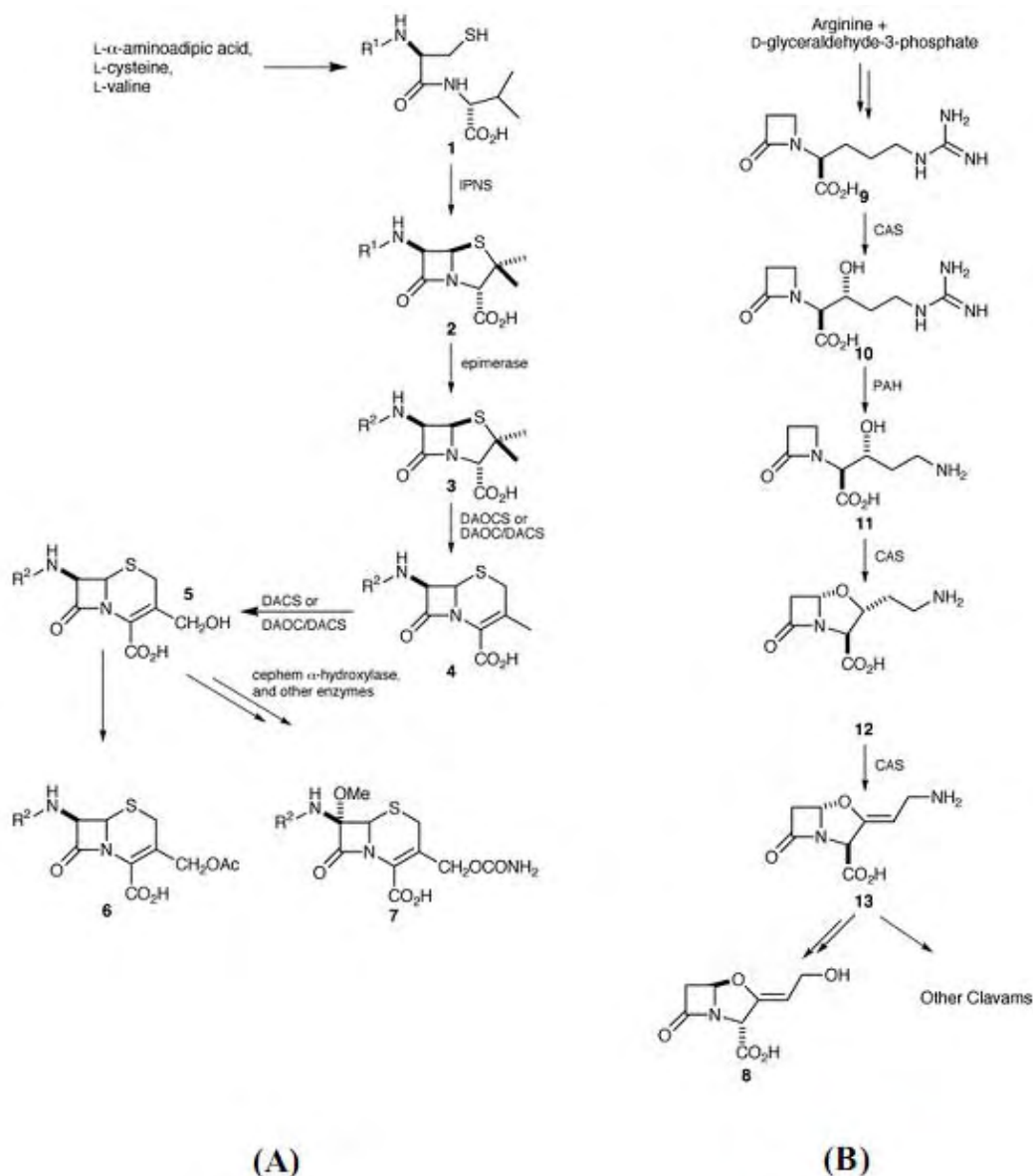


Figura 1.1. Rota biossintética de compostos β -lactâmicos em *S. clavuligerus*: **(A)** (1) ácido L- α -aminoadipil-L- cisteinil –D- valina (LLD-ACV); (2) isopenicilina N (IPN); (3) penicilina N (PenN); (4) deacetoxicefalosporina C (DAOC); (5) deacetilcefalosporina C (DAC); (6) cefalosporina C (CPC) (somente em fungos filamentosos); (7) cefamicina C (CefC) (somente em actinomicetes); onde R^1 = L- δ -(α -aminoadipil)- e R^2 = D- δ -(α -aminoadipil); **(B)** ácido clavulânico (8) (LIRAS, 1999)

Fontes de C, por sua vez, têm sido investigadas como reguladoras da biossíntese em *S. clavuligerus* ATCC 27064. Quando tais fontes são facilmente assimiláveis pelo microrganismo e presentes em excesso acarretam mecanismos de repressão e/ou inibição catabólica. Aharonowitz et al., (1978)

testaram várias fontes de C (a 0,5% w/v) como substrato limitante na produção de cefalosporinas em meio sintético contendo asparagina como fonte de N (0,2% w/v). Estes autores constataram que amido, maltose e glicerol propiciaram o melhor crescimento, mas o amido foi o mais favorável à produção. Lebrihi et al., (1988) constataram que o glicerol resultou em produção de CefC final aproximadamente 40 % menor do que aquela obtida com o amido, mas mostrou-se melhor em relação ao crescimento. Resultados similares também foram observados por Vining et al., (1987) com o mutante espontâneo *S. clavuligerus* DSMZ 41826, mais produtivo que a linhagem selvagem, utilizando peptonas como fontes de N.

Compostos também importantes são os doadores do enxofre da molécula de CefC, como o tampão biológico MOPS (ácido 3-[N-Morpholino]-propanosulfônico) ou o tiosulfato de sódio. O ácido sulfônico residual do MOPS pode ser usado sozinho como fonte de enxofre para biossíntese de CefC, enquanto em patente registrada por Merck Co. (1975, 1976) sugere-se que o tiosulfato de sódio seja adicionado no meio de cultura 30 horas após o início do processo fermentativo principal, uma vez que afeta o crescimento celular (OMSTEAD et al, 1985).

Yilmaz et al., (2008) observaram que a trajetória do aspartato em *S. clavuligerus* é um importante passo do metabolismo primário que fornece substratos para a biossíntese de β -lactâmicos (Figura 1.2), sendo o fluxo de C através do ramo específico da L-lisina um passo limitante para a formação de CefC.

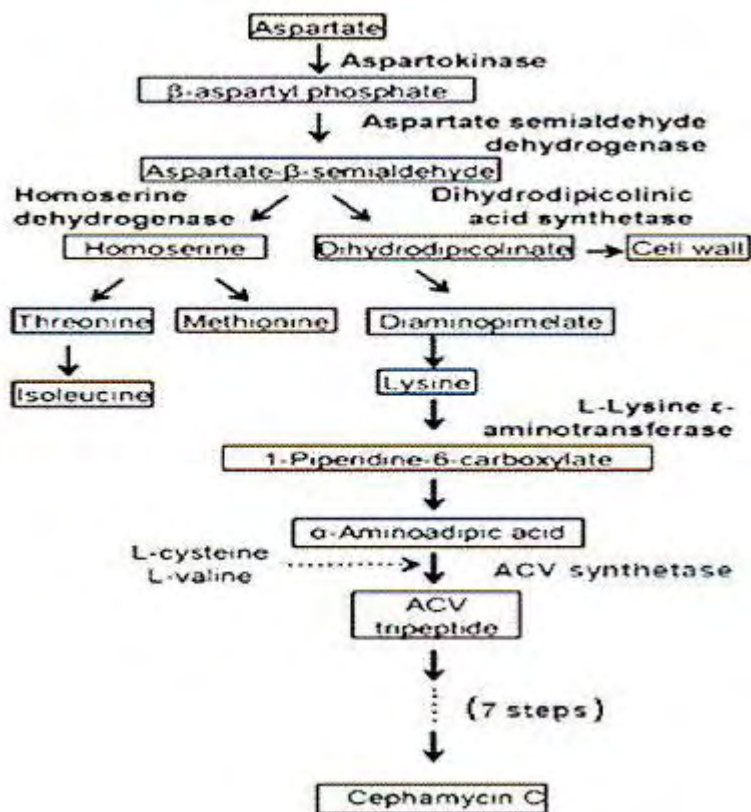


Figura 1.2. Trajetória do aspartato e conversão da L-lisina em ácido α -aminoadípico em *S. clavuligerus* (YILMAZ et al, 2008).

A ativação de uma via biossintética em *S. clavuligerus* é um mecanismo complexo, podendo ser influenciado pela natureza/presença e concentração de fontes de C, N, P, S, compostos que manipulados de forma correta levam a dissociação das sínteses de CefC e AC, por atuarem, segundo a literatura em maior ou menor grau como agentes reguladores da síntese de muitos antibióticos (ROMERO et al, 1984; FANG e DEMAIN, 1995; CHEN et al., 2002; JENSEN et al., 2004). Vários aspectos da biossíntese de CefC ainda precisam ser esclarecidos para a obtenção de dados que permitam melhorar o processo fermentativo propriamente dito.

Diferentemente dos estudos fundamentais relacionados à elucidação da rota biossintética que utilizam meios de cultivo simples, quimicamente definidos, os estudos do processo de produção propriamente dito, focam aspectos de engenharia como condições de operação e avaliações fluidodinâmicas e de transferência de massa em biorreatores, são realizados em meios contendo

fontes complexas de N provenientes de matérias primas vegetais de baixo custo. A produção industrial de antibióticos também faz uso de tais meios que, aliados as condições melhoradas de operação do biorreator e a utilização de micro-organismos mutantes altamente produtivos, rendem altas concentrações do produto desejado. Porém, assim como contém componentes que melhoram a produção, os meios complexos geralmente apresentam componentes desconhecidos que podem afetar o desenvolvimento celular. Também, a presença de partículas insolúveis dificulta os procedimentos subseqüentes de separação e purificação do produto, entre outras desvantagens que prejudicam o processo como um todo. Desta forma, a utilização de meios sintéticos e/ou solúveis seria uma boa alternativa para contornar boa parte destes problemas (ZHANG e GREASHAM, 1999; KENNEDY e KROUSE, 1999).

Outra particularidade dos estudos que abordam aspectos tecnológicos do bioprocessamento é que certos fatores importantes só podem ser efetivamente avaliados em fermentadores. Por exemplo, um aspecto primordial a ser considerado no processo fermentativo é a eficiência da transferência de O₂ ao *S. clavuligerus*, uma vez que algumas enzimas que participam da rota biossintética são sintetizadas em condições de alta oxigenação como a expandase, enzima responsável pela expansão do anel tiazolidina da penicilina N, um intermediário indesejável na produção de CefC, para o anel dihidrotiazina das cefalosporinas (LEBRIHI et al., 1988, OKABE et al., 1992).

3.3. Melhoramento de linhagens através de mutagênese clássica

Além da manipulação de ingredientes nos meios de cultivo, que deve seguir critérios de melhoramento, também é possível aumentar e/ou aperfeiçoar a produção de CefC através de processo de mutagênese. A mutagênese clássica induzida por agentes físicos (UV) e químicos (MMS, NTG) foi de crucial importância nos programas de melhoramento de linhagens para a produção industrial de antibióticos e é, ainda hoje, amplamente aplicada (BALTZ, 1986). O processo de seleção de linhagens melhoradas tem sido utilizado com sucesso e envolve repetidas aplicações de três princípios básicos: (1) mutagênese de uma linhagem, com o intuito de induzir a variabilidade genética; (2) seleção ao acaso e isolamento de colônias sobreviventes para encontrar

uma linhagem melhorada e (3) bioensaio buscando mutantes com maior capacidade produtiva (PAREKH et al, 2000).

Na literatura, existem poucos estudos relatando obtenção, avaliação e uso de mutantes. O melhoramento genético torna-se necessário em programas de produção de metabólitos bioativos, uma vez que linhagens de porte industrial tais como *S. clavuligerus*, estão sujeitas a perder sua produtividade devido a fenômenos de instabilidade genética. A constante seleção de mutantes espontâneos e induzidos melhora a produtividade dos compostos bioativos.

A mutagênese é uma alteração permanente ao longo da fita de DNA com a mudança de um simples nucleotídeo (mutação pontual) através de substituição, deleção ou rearranjo de um ou mais pares de bases do nucleotídeo no cromossomo ou ainda, devido a uma falha na reunião da fita do DNA. A linhagem que sofre a mutação é chamada de mutante. O objetivo da mutagênese no desenvolvimento de linhagens melhoradas é maximizar a frequência de mutações desejadas e minimizar a frequência de letalidade. O melhoramento de uma linhagem através de mutação é frequentemente alcançado pela submissão do material genético (in vivo ou in vitro) a uma variedade de agentes químicos ou físicos chamados de mutagênicos (PAREKH et al, 2000).

O metil- metanosulfonato (MMS) pertence a um grupo de produtos químicos chamados de agentes alquilantes, que afetam o DNA. A reação do MMS com o genoma do *Streptomyces* provoca a metilação da base nitrogenada guanina, em consequência há o pareamento desta base com a adenina, ou seja, ocorrem transições do tipo G-C/A-T. A prática deste tipo de mutação leva a um aumento do número de mutantes, uma vez que o genoma da *Streptomyces* possui um alto conteúdo de G + C (AIKAWA et al., 1999; FURLAN et al. 2002). Esta característica peculiar do material genético da *Streptomyces* dificulta a localização do ponto de mutação de maneira usual, como por exemplo, por técnicas como o PCR. Assim, para se avaliar a real capacidade produtiva de um mutante que tenha se mostrado promissor em testes qualitativos, outros critérios devem ser adotados como, por exemplo, a busca por condições específicas de cultivo que favoreçam a produção do composto de interesse.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos

A linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, adquirida comercialmente da ATCC e as linhagens mutantes foram conservadas na forma de suspensão de esporos (10^5 a 10^8 esporos/ml) a -70°C em criotubos com 2 ml (glicerol a 20% v/v), como células vegetativas liofilizadas e em tubos inclinados (4°C) preparados com os meios respectivos a cada linhagem e cujas composições estão descritas nas seções abaixo.

E. coli ESS 2235 supersensível a antibióticos β -lactâmicos – gentilmente cedida pela Dra. Paloma Liras (Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade de León, León, Espanha) – foi empregada como organismo teste. Esta linhagem foi cultivada em meio nutriente ágar (Difco 001) a 37°C por 24 horas e estocado a -70°C em criotubos com 2 ml (glicerol a 20% v/v).

4.2. Cultivo da bactéria-teste (*E.coli* ESS 2235)

A linhagem *E. coli* ESS 2235 foi cultivada em Meio Agar Nutriente, indicado pela ATCC, contendo (em g/l): peptona (5,0), extrato de carne (3,0), ágar (15,0), pH $7,0 \pm 0,1$.

4.3. Cultivo do micro-organismo produtor de CefC

4.3.1. Meio sólido de esporulação de *S. clavuligerus* ATCC 27064

Os esporos de *S. clavuligerus* ATCC 27064 foram obtidos cultivando-se o micro-organismo de 7 a 15 dias, a 28°C , em meio sólido (SB) contendo (em g/l): glicose (5,0), caseína hidrolisada ácida (1,0), extrato de levedura (0,5), extrato de carne (0,5), tampão biológico MOPS (21,0), ágar (20,0), pH $7,0 \pm 0,1$ (SÁNCHEZ e BRAÑA, 1996). Estes esporos foram conservados em uma solução de 20% v/v de glicerol e estocados em criotubos, em ultra freezer, em alíquotas de 2 ml e também na forma de tubos inclinados.

4.3.2. Cultivo submerso de *Streptomyces clavuligerus*

4.3.2.1. Procedimento de reativação.

As células conservadas em criotubos, ou ainda aquelas conservadas em tubos inclinados, tanto a linhagem selvagem, quanto dos mutantes, foram reativadas em meio contendo (em g/l) triptona (5,0), extrato de levedura (3,0), extrato de malte (10,0), MOPS (21,0), pH $6,8 \pm 0,2$, a 28 °C, por 24 horas, em mesa rotativo incubadora (New Brunswick) (Antonio et al., 2007).

4.3.2.2. Cultivo para a formação do inóculo e produção de CefC.

Utilizou-se o amido como fonte principal de C. Além disso, em um dos experimentos, além do amido utilizou-se a maltose. A primeira fonte, o amido, é indicado na literatura como adequada ao desenvolvimento celular e produção de CefC por *S. clavuligerus*. A segunda fonte, a maltose, é citada na literatura, como sendo adequada ao crescimento ou desenvolvimento celular. No entanto, esta fonte de C pode exercer um efeito regulador da produção do antibiótico, gerando menores produções específicas do mesmo (LEBRIHI et al. 1988). Como fonte complexa de N solúvel foi utilizado o caroço de algodão (Proflo-Traders Protein, USA) (ANTONIO et al., 2007), fervido e filtrado em bomba a vácuo, para melhor quantificação da biomassa, sem influenciar negativamente a produção de CefC (CAVALLIERI, 2010). A razão mássica de C:N do meio de produção foi mantida em 5:1, respeitando-se a proporção estimada com base em fórmula molecular empírica proposta para espécies de *Streptomyces* (BUSHELL e FRYDAY, 1983). A quantidade de fontes de C no meio de cultivo foi adicionada considerando-se um rendimento celular médio em torno de $Y_{X/S} = 0,5$ (g de células/g fonte de C), obtido em meio contendo glicerol ou amido (GOUVEIA et. al., 2001).

O meio de formação do inóculo continha (g/l): amido solúvel (10,0), Proflo (8,5), extrato de levedura (1,0), extrato de malte (10,0), K_2HPO_4 (0,8), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,75), MOPS (21,0), 10.0ml/l de solução de sais contendo (g/l): $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,0), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0), e $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0), pH 6.8 ± 0.1 , por 24 horas a 28 °C, em mesa rotativo-incubadora (New Brunswick) (Antonio et al., 2007).

Os componentes do meio-base para a produção de CefC por *S. clavuligerus* foram (em g/l): extrato de levedura (0,5), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,75), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,2), NaCl (2,0), L-lisina (18,3), tiosulfato de sódio (1,0) (adicionado após 30 horas de processo), MOPS (21,0), solução de sais 5 ml/l, cuja composição é a mesma daquela utilizada no meio de formação do inóculo. Os componentes do meio – base de produção foram definidos de acordo com Antonio *et. al.*, (2007). Quando este meio base é adicionado de 10 g/l de amido e 8,5 g/l de Proflo, passa a se chamado de meio padrão de produção de CefC, e foi utilizado nos primeiros testes qualitativos deste trabalho, quando o objetivo era verificar a real capacidade de produção de CefC pelas linhagens provenientes dos tratamentos mutagênicos.

4.4. Condições gerais de cultivos e tratamento de caldo fermentativo.

Todas as fermentações realizadas em mesa rotativa incubadora obedeceram às mesmas condições de agitação (280 rpm) e temperatura (28 °C) (Antonio et al., 2007). O volume total (meio de cultura mais células), independente da fase do processo fermentativo, foi de, no máximo, 10% do volume nominal do Erlenmeyer. As amostras foram retiradas a cada 24 horas e o período de tempo de cada fermentação foi de no máximo 72 horas. O esquema geral das fases do processo fermentativo se encontra na Figura 2.

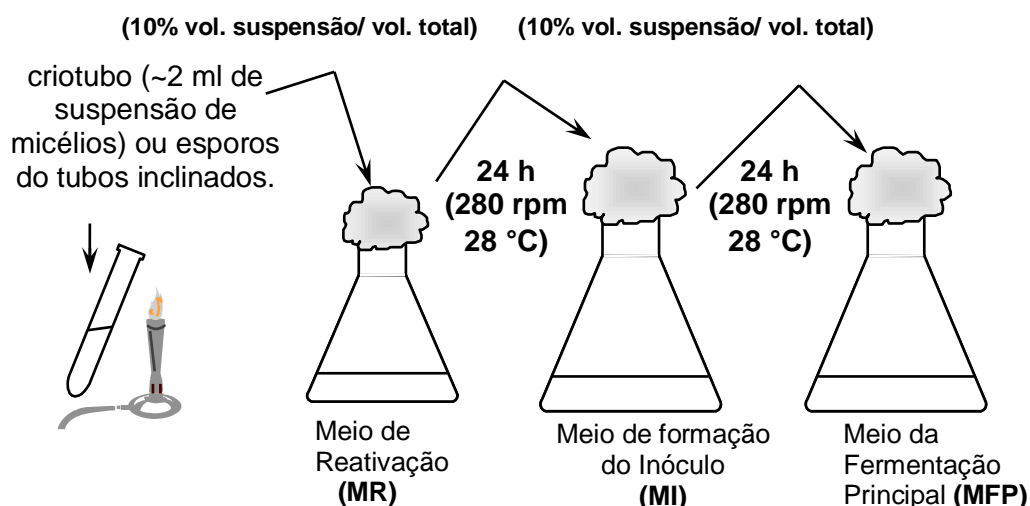


Figura 2. Esquema geral do procedimento experimental utilizado na pré-cultura de todas as fermentações e na fermentação principal de todos os experimentos em mesa rotativo-incubadora.

Também foi realizado um ensaio em biorreator convencional de bancada, (News Brunswick, Bioflo 2000; 5 l volume de trabalho), com volume inicial de meio de produção de 2l, agitação inicial de 250 rpm, vazão de ar de 1vvm, a 28 °C de temperatura e controle de oxigênio dissolvido fixado no mínimo de 50%. Foram retiradas amostras a cada 6 horas, nas primeiras 24 horas do processo, sendo em seguida retiradas amostras a cada 12 horas, até o final do processo em 72 horas. As fases de pré- cultura, germinação e formação do inóculo, obedeceram as mesmas condições dos experimentos em mesa-rotativo incubadora (New Brunswick).

4.5. Métodos analíticos.

A concentração da biomassa foi determinada como massa seca de células (g/l), através de secagem em estufa a 105 °C, até atingir peso constante. A CefC foi determinada através de bioensaio de difusão no ágar, de acordo com o método descrito por Liras e Martín (2005). O sobrenadante foi obtido após centrifugação a 15,550g por 10 min., 4°C, em centrífuga modelo 5810 R Eppendorf, para as análises posteriores de CefC. Cefalosporina C (CPC) sal de zinco (Sigma) foi utilizada como padrão da curva de calibração e adicionou-se 20 µL de penicilinase (Penase[®]) (BD Difco[™] potência de 1977 UI PenG/min./ml, pH 7 a 25°C; 1mg de Penicilina G ou PenG \equiv 1595 UI) para cada 1 ml de padrão, reagindo a 25°C por 20 min., para degradar penicilina N (PenN). O mesmo tratamento enzimático foi aplicado às amostras obtidas dos cultivos submersos, sendo as soluções de amostra mais enzima então, aplicadas em placas, em duplicata, contendo 40 ml de ágar, acrescidos de bactéria teste (1 ml de suspensão bacteriana com absorvância de 1 a 600nm de densidade ótica - DO, por 100 ml de ágar), com seis poços de 5 mm diâmetro, por placa, sendo aplicados 20 µl em cada poço. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C e a formação de halos de inibição indicou a presença de CefC.

A quantificação de CefC foi determinada em termos de unidades de CPC (UCPC), onde 1 UCPC corresponde à quantidade de CefC requerida para produzir uma zona de inibição igualmente à produzida por 1 mg CPC. A curva de calibração para estimar a concentração de CefC foi obtida com

concentrações de CPC em uma faixa de 5 a 80 mg/l e é expressa pela Equação 1 (CAVALLIERI, 2010).

$$C_{CefC} = 1.576 \cdot 10^{0.146 \cdot \bar{H} \cdot \text{dilution factor}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: \bar{H} representa a média dos halos de inibição.

A presença de holomicina foi investigada utilizando-se HPLC, de acordo com o protocolo descrito por Liras e Martín (2005), usando uma coluna Nucleosil C18 (30x 4 mm) e como eluente uma mistura isocrática metanol: água (40:60). A holomicina é detectada após ser extraída do caldo fermentativo, quando da mistura de butanol: amostra de 1:1. Após alguns minutos de repouso, separa-se uma fase, a qual se localiza na fase superior, sendo retirada e injetada no HPLC.

4.6. Tratamentos mutagênicos dos esporos de *S.clavuligerus* com o agente MMS (metil- metanosulfonato)

Foram realizados três tratamentos mutagênicos, baseados no procedimento descrito por Baltz (2001). O uso do agente químico MMS foi baseado em Furlan et al. (2002). Segundo estes pesquisadores o agente químico MMS produz mutação por transversão. A reação do MMS com o genoma da *Streptomyces* provoca metilação da base nitrogenada guanina, em consequência há o pareamento desta base com a adenina. Além disso, segundo estes mesmos pesquisadores, este agente gera maior número de mutantes, pois o genoma da *Streptomyces* é rico em guanina e citosina.

Em todos os tratamentos mutagênicos, o protocolo seguido para a obtenção da suspensão de esporos, a ser submetida ao agente mutagênico, foi de adicionar solução salina (NaCl 0,9%) em cultura de esporos crescida por 15 dias em meio sólido Sanches e Braña (SB), a 28 °C (SANCHES e BRAÑA, 1996). Em seguida, os esporos foram retirados da superfície do ágar com o auxílio de barras magnéticas estéreis. A suspensão de esporos foi filtrada em

gaze estéril, sendo posteriormente tratada com diferentes concentrações de MMS e períodos de tempo, de acordo com cada tratamento, sempre a 28^oC, sob agitação branda de 100 rpm em mesa rotativo-incubadora. A reação foi neutralizada diluindo-se a suspensão para 1/10 com tiosulfato de sódio (0,16 M) e os esporos ressuspensos em tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,0. Os esporos tratados com MMS foram plaqueados em meio sólido após sucessivas diluições (10⁻¹ a 10⁻¹⁰) e incubados por 10 dias a 28^oC. A seleção das colônias para os testes qualitativos foi aleatória, levando-se em conta semelhança ou diferença de fenótipo em relação à linhagem selvagem. Este critério de seleção foi aplicado aos três tratamentos mutagênicos. As 339 colônias testadas para verificar halos de inibição superiores a linhagem selvagem contra *E.coli* ESS 2235, foram escolhidas dentre as colônias sobreviventes aos tratamentos mutagênicos, seguindo o critério de seleção descrito acima.

As condições gerais dos três tratamentos estão resumidas a seguir:

(1) O primeiro tratamento consistiu de uma "remutagênese" a partir de um mutante obtido em nossos laboratórios. As condições adotadas para o tratamento foram combinações entre concentração de MMS de 0,2 a 0,5 % v/v e tempo de reação de 15 a 45 minutos. A partir desse tratamento, foram selecionadas 111 colônias para teste qualitativo.

(2) O segundo tratamento mutagênico consistiu da aplicação de MMS sobre esporos da linhagem selvagem de *S. clavuligerus*, a uma concentração fixa de 0,3 %v/v, por 30', 45' e 60'. O objetivo foi avaliar se a diferença no tempo de exposição ao agente mutagênico resultaria em sobreviventes com maior capacidade produtiva. Deste tratamento foram selecionadas 122 colônias para testes qualitativos.

(3) Para o terceiro tratamento, tanto a concentração de MMS quanto o tempo de exposição dos esporos da linhagem selvagem a este agente foram fixos, sendo 0,5%v/v e 30', respectivamente. Testaram-se qualitativamente 106 colônias resultantes deste tratamento.

4.6.1. Seleção dos mutantes pela produção de CefC em meio sólido.

As colônias selecionadas dentre as sobreviventes aos três tratamentos mutagênicos e colônias obtidas por repiques sucessivos ou na avaliação de estabilidade, foram testadas em termos de produção, em meio sólido e/ou em cultivos submersos. Para se avaliar a produção de CefC em meio sólido realizou-se um procedimento no qual discos de ágar (~5 mm diâmetro) recortados, contendo uma única colônia (h diâmetro, mm) dos mutantes (após 10 dias de cultivo em meio SB a 28°C) foram assentados em placas de Petri (150x15 mm) contendo meio nutriente ágar, sendo que para cada 100 ml deste meio foi acrescentado 1,0 ml de suspensão *E. coli* (1 OD a 600 nm), e 0,5 ml de enzima Penase® (BD Difco™ Penase®, potência de 1977 UI PenG/min/ml, pH 7 a 25°C; 1 mg de PenG \cong 1595 UI) previamente adicionada para degradar a PenN. Após incubação por 18 horas, a 30 °C os diâmetros dos halos de inibição (H , mm) foram medidos. O critério de seleção foi comparar os valores médios dos diâmetros obtidos $(H/h)_{\text{média}}$, para cada linhagem mutante e linhagem selvagem ATCC 27064, com a média dos máximos valores de diâmetros obtidos, $(H/h)_{\text{max}}$. As linhagens que apresentaram valores obtidos de $(H/h)_{\text{média}}/(H/h)_{\text{max}}$ maiores que o da linhagem selvagem foram selecionadas. O diâmetro do halo de inibição (H) e o diâmetro da colônia (h) são respectivamente proporcionais a difusão radial do antibiótico pelo ágar e a extensão radial dos esporos gerados pela Unidade Formadora de Colônia (UFC). A seqüência do teste está resumida na Figura 3.

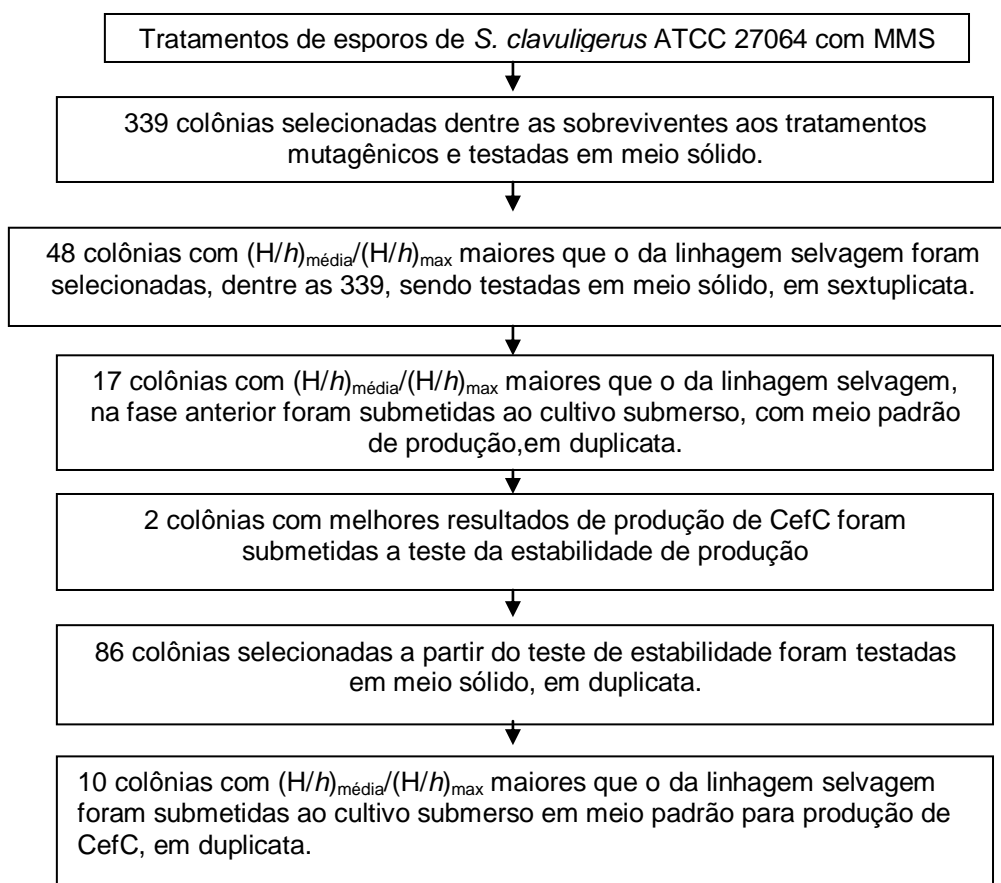


Figura 3. Seqüência de testes para obtenção da linhagem mutante 45.41.

Todas as linhagens selecionadas nesta etapa do trabalho foram conservadas em tubos inclinados com meio de esporulação e/ou em criotubos a -70°C (20% v/v glicerol) para posteriores avaliações de suas capacidades produtivas, em cultivos submersos.

4.6.2. Seleção quantitativa em cultivos submersos de linhagens mutantes.

O primeiro experimento, ou cultivo submerso consistiu de uma fermentação de 72 horas de duração, cujo objetivo foi verificar e confirmar o real aumento da capacidade produtiva dos dezessete mutantes selecionados anteriormente nas avaliações em meio sólido. A linhagem selvagem também foi avaliada, como referência e padrão de produtividade. O meio de produção utilizado continha amido (10g/l), como principal fonte de C e o caroço de algodão (Proflo-Traders Protein, USA) (8,5 g/l) como fonte de N, sendo que os demais componentes estavam de acordo com Antonio et.al. 2007. Este meio de cultivo foi chamado de meio padrão para a produção de CefC e ao longo do trabalho foi acrescido

ou decrescido de alguns componentes, dependendo do objetivo de cada experimento.

4.6.2.1. Seleção dos melhores isolados em meio padrão de produção de CefC (ANTONIO et al., 2007).

Para se avaliar a capacidade produtiva das colônias provenientes do teste da estabilidade, das colônias mutantes 45 e 77, realizou-se um segundo conjunto de experimentos com um período de 72 horas e uma única amostragem, com duplicata das condições em meio de produção padrão. A colônia aqui selecionada foi liofilizada.

4.6.2.2. Efeito da fonte de C sobre a seleção dos isolados.

Diante dos resultados, foi realizado um terceiro experimento, o qual consistiu de uma fermentação de 72 horas e teve como objetivo avaliar o comportamento produtivo das linhagens 45.41 e selvagem ATCC 27064, frente a duas fontes de C, o amido, comumente usado e a maltose, considerada adequada ao crescimento, mas que gera produção específica menor, comparada ao amido (LEBRIHI et al., 1988).

Um quarto experimento, com a amostragem em 72 horas, foi feito com as linhagens 45.41 e selvagem, com o intuito de investigar a capacidade produtiva dos mesmos, quando a fonte de C é composta por dois carboidratos, o amido e a maltose.

Terceiro e quarto experimentos, também tinham como objetivo tentar melhorar o meio de produção de CefC, alternando as fontes de C.

4.6.2.3. Efeito das diaminas sobre a seleção dos isolados.

Diante dos resultados observados, foi realizado um quinto experimento, cujo objetivo foi avaliar a influência de diferentes diaminas: putrescina (ou 1,4-diaminobutano), 1,3-diaminopropano (1,3D), cadaverina (CAD), além do ácido 2,6 diaminopimélico (DAP), o qual participa da via que leva à formação de lisina em actinomicetes (LEITÃO et al., 1999; MENDELOVITZ e AHARONOWITZ, 1982), na produção de CefC, pelas linhagens 45.41 e selvagem. Neste experimento, a lisina foi retirada do meio de produção, para avaliar a

contribuição apenas das diaminas na produção de CefC. As concentrações utilizadas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração das diaminas utilizadas no quinto experimento.

Compostos	Concentração (g/l)	
Putrescina (P)	0,2	0,4
1,3-diaminopropano (1,3 D)	2,5	5,0
Ácido 2,6 diaminopimérico (DAP)	0,9	1,9
Cadaverina (CAD)	3,5	7,0

Baseando-se nos resultados obtidos, realizou-se um sexto experimento, no qual se avaliou a influência da diamina que propiciou os melhores resultados de produção, a cadaverina, associada à lisina (DEMAIN e VAISHNAV 2006). Este experimento foi um delineamento de faces centradas, dois fatores (lisina e cadaverina), três níveis, baseado no ponto central, com tempo total de fermentação de 48 horas e uma única amostragem. O objetivo foi avaliar se estes dois compostos tinham efeitos positivos somatórios na produção de CefC. O software *Statística 8.0* (StatSoft, Inc., USA) foi utilizado na análise de variância dos dados obtidos neste experimento.

Diante dos resultados obtidos, realizou-se uma fermentação em biorreator convencional de bancada, a fim de se confirmar e validar os resultados obtidos em mesa-rotativo incubadora (New Brunswick), com duração total de 72 horas, com amostragens a cada 6 horas, nas primeiras 24 horas do processo e as seguintes a cada 12 horas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção dos mutantes pela produção de CefC em meio sólido.

Após os tratamentos mutagênicos e o período de esporulação, teste para verificar a produção de CefC em meio sólido foi conduzido com 339 colônias, provenientes dos três tratamentos mutagênicos, com boa capacidade de esporular e fenótipo similar ou diferente do observado para a linhagem selvagem ATCC 27064. A partir dos resultados deste teste, 48 linhagens ou colônias mutantes com $(H/h)_{\text{média}}/(H/h)_{\text{max}}$ maiores que $0,18 \pm 0,02$ (razão média obtida com a linhagem selvagem) foram selecionadas. Um novo teste em meio sólido foi feito com colônias de linhagens mutantes obtidas após seis repiques

sucessivos de cada uma, incluindo a colônia da linhagem selvagem (totalizando 294 colônias testadas). Os valores médios de $(H/h)_{\text{média}}/(H/h)_{\text{max}}$ e desvios padrão correspondentes estão demonstrados na Figura 4.

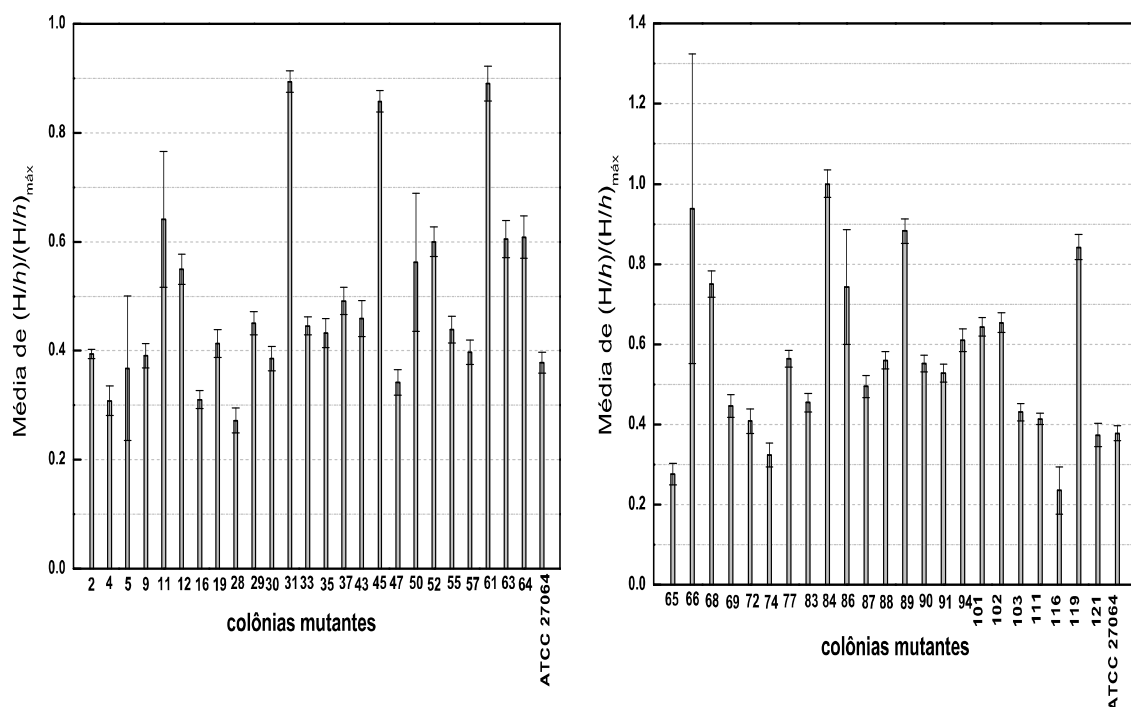


Figura 4. Valores médios de $(H/h)/(H/h)_{\text{max}}$ e desvios padrão correspondentes obtidos no teste qualitativo com 48 linhagens mutantes (sextuplicata de cada linhagem e linhagem selvagem h = diâmetro de uma colônia a partir de 1 UFC; H = diâmetro da zona de inibição obtida para cada colônia).

Grandes desvios a partir de valores médios são comuns neste tipo de teste feito com mutantes obtidos por mutagênese clássica. Os mutantes 5, 11, 50, 66 e 86 são claros exemplos desta discrepância nos dados. Outras 26 linhagens mutantes mostraram este mesmo comportamento e por esta razão, seus resultados foram omitidos da Figura 4. Além disso, algumas colônias que apresentaram bons resultados como, por exemplo, a 118, foram selecionadas e isoladas, mas se perderam, durante o desenvolvimento do trabalho, pois os tubos contaminaram. As dezessete colônias mutantes (12, 31, 45, 52, 61, 63, 64, 68, 77, 84, 89, 90, 91, 101, 102, 103, 119) que mostraram os melhores resultados em termos de $(H/h)/(H/h)_{\text{max}}$ e desvios padrão correspondentes coerentes, e cujas colônias isoladas mantiveram-se ao longo do trabalho,

foram então selecionadas e submetidas ao cultivo submerso em meio padrão de produção (ANTONIO et al., 2007).

5.2. Seleção quantitativa em cultivos submersos de linhagens mutantes.

As dezessete linhagens mutantes que demonstraram valores médios de $(H/h)/(H/h)_{max}$ significativamente maiores que o da linhagem selvagem foram então cultivados em frascos agitados (Figura 5), para a produção de CefC, utilizando-se o meio padrão de produção (ANTONIO et al., 2007).

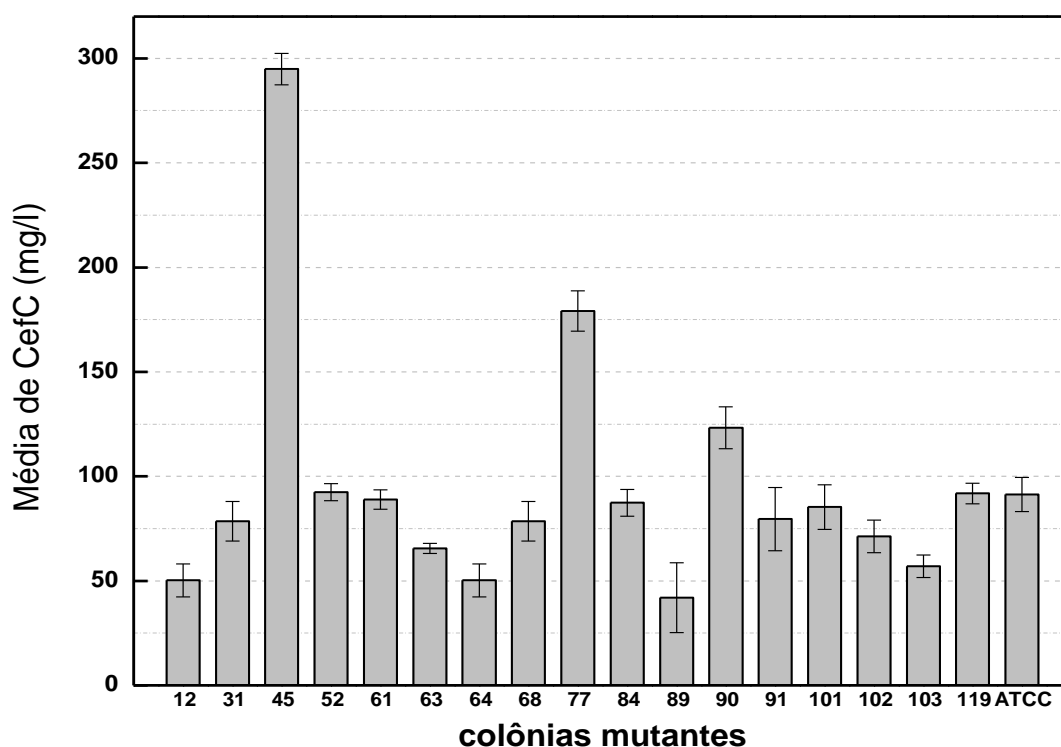


Figura 5. Concentração de CefC obtida em cultivo em batelada em frascos agitados, em 72 horas.

A produção obtida de CefC em 72 horas de fermentação pelas linhagens no. 77 e no. 45 obtidas a partir do terceiro tratamento mutagênico, foram de duas a três vezes maiores do que a obtida pela linhagem selvagem, respectivamente. Desta forma, estes mutantes foram submetidos ao processo de avaliação de estabilidade das linhagens (45 e 77), sendo que as colônias foram submetidas a diluições sucessivas (10^{-1} a 10^{-10}) e as 86 colônias resultantes do plaqueamento em superfície no meio SB, as quais foram cultivadas em duplicata, foram testadas em meio sólido para a produção de CefC (totalizando

172 colônias testadas). Valores maiores de $(H/h)/(H/h)_{max}$ que o obtido pela linhagem selvagem foram observados para dez colônias, as quais foram então cultivadas em frascos agitados para a produção de CefC. Os resultados estão na Figura 6.

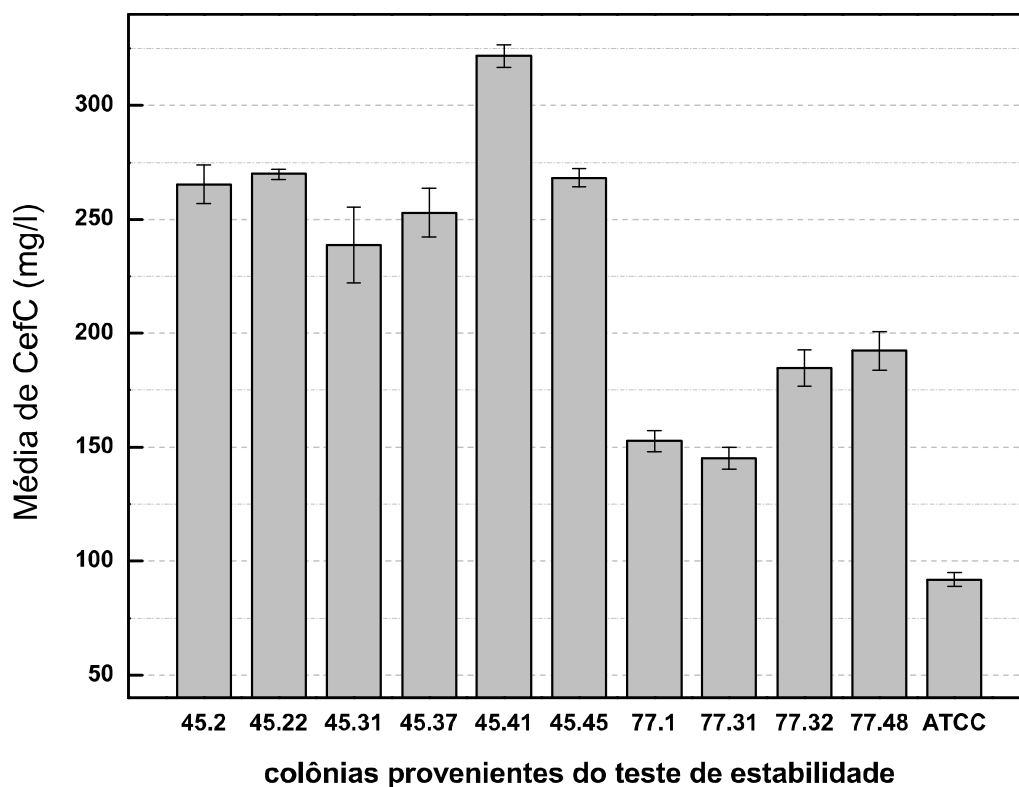


Figure 6. Valores médios da concentração de CefC e desvios padrão obtidos em cultivo em batelada, em frascos agitados com meio de produção padrão, colônias provenientes do teste de estabilidade, e linhagem selvagem em 72 horas.

Pode se observar que a linhagem 45 e suas colônias derivadas produziram mais CefC, comparadas a linhagem 77 e suas colônias derivadas. A linhagem 45.41 apresentou produção de CefC 3,8 vezes maior que a observada para a linhagem selvagem e por esta razão foi selecionada para a continuidade do trabalho. Pode-se observar que após a realização de testes em meio sólido (bioensaios de difusão em agar) e cultivos submersos em meio padrão, com 822 colônias que sobreviveram ao tratamento mutagênico e foram resultado de repiques sucessivos e avaliação da estabilidade das linhagens 45 e 77, foi possível obter-se uma linhagem mutante de *S. clavuligerus* (mutante 45.41), com produção de CefC de 3,8 vezes maior que a observada para a linhagem

selvagem *S. clavuligerus* ATCC 27064. Além disso, esta capacidade produtiva manteve-se estável após 35 repiques sucessivos ao longo do trabalho, em meio apropriado para a esporulação, para a produção de bancos de esporos, testes de produção em meio sólido, ou liofilização da linhagem.

Devido à mutação aleatória, muitos testes diferentes devem ser feitos com o maior número possível de colônias sobreviventes ao tratamento mutagênico, especialmente quando se aplica técnicas clássicas (GORYANIN et al. 2006). Contudo, a maioria dos mutantes aparentemente promissores no bioensaio de difusão de ágar não apresentou o mesmo desempenho no cultivo submerso. Isso é um fenômeno comum, uma vez que todos os biocompostos excretados pelo micro-organismo podem inibir e/ou limitar o crescimento do organismo teste contribuindo para a formação do halo de inibição através do ágar. Além disso, o fato de algumas colônias inicialmente melhores produtoras não manterem o mesmo desempenho ao longo do trabalho, provavelmente está relacionado à instabilidade genética de espécies de *Streptomyces*, que possuem uma conformação de DNA passível de perdas e rearranjos de fragmentos de suas extremidades, onde estão concentrados os genes responsáveis pela síntese de metabólitos secundários (HÜTTER e ECKHARDT, 1988).

Por outro lado, amostras coletadas dos cultivos submersos são sujeitas a análises mais específicas para determinação de CefC, tornado-se mais adequadas para se determinar a real capacidade produtiva de CefC dos mutantes.

O fenótipo da linhagem 45, obtida no terceiro tratamento mutagênico, assim como de suas colônias derivadas, e da linhagem selvagem diferem entre si. O diâmetro da colônia da linhagem selvagem foi duas vezes maior do que o observado para as colônias derivadas da linhagem 45. A colônia da cepa selvagem tem abundância de micélios aéreos azincados por todo seu comprimento e reverso. Já a colônia da linhagem 45.41 tem borda branca, micélios aéreos esparsos próximos a base e fartos micélios aéreos acinzentados no centro, sendo o reverso da colônia com borda branca e centro amarelo-esverdeado.

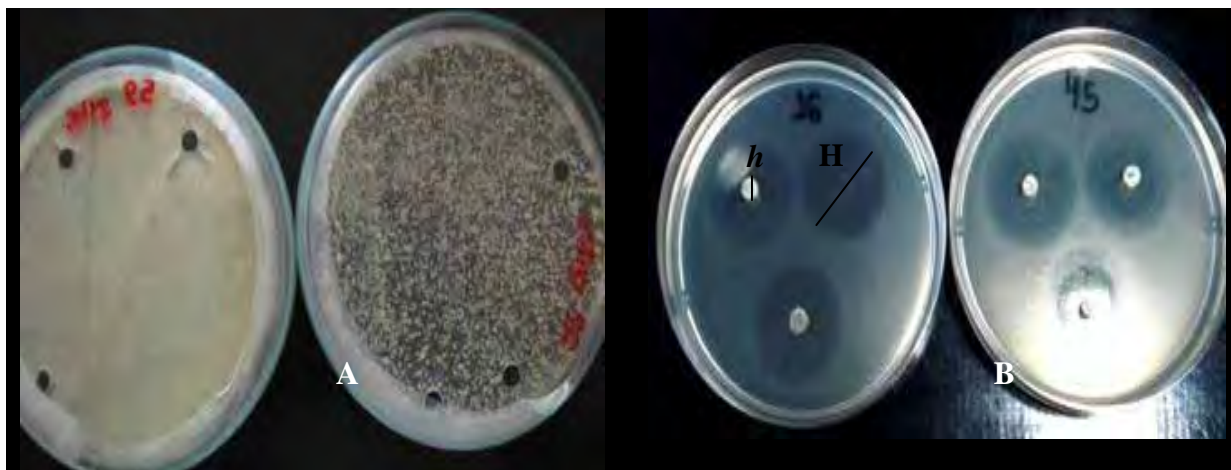


Figura 7 Exemplos dos resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho, **(A)** crescimento diferenciado das colônias e **(B)** disposição dos discos em meio nutriente ágar acrescido de *E.coli* e Penase® (*h* medida em mm do diâmetro da colônia e *H* medida do diâmetro do halo de inibição em mm).

Certos mutantes de *S. clavuligerus* podem produzir holomicina, um antibiótico do tipo pirrotina, altamente tóxico aos humanos; a holomicina em concentrações acima de 20 mg/l pode interferir em bioensaios baseados em *E. coli*. A formação deste composto pela linhagem selvagem *S. clavuligerus* é praticamente inexistente (LIRAS e MARTÍN 2005). Quando a holomicina é produzida, o meio de cultura torna-se amarelado, parecido com a cor de gema de ovo. Não se observou, porém, esta coloração nos meios de cultivo do mutante 45.41, mas para se certificar da ausência de holomicina, a fim de que o bioensaio quantificasse apenas CefC, amostras coletadas dos caldos fermentativos das linhagens 45.41 e selvagem foram analisadas em HPLC, de acordo com o protocolo descrito por Liras e Martín (2005). Os típicos cromatogramas desta análise e as tabelas com os picos das áreas obtidas e respectivos tempos de retenção, próximos ao encontrado para a holomicina (6,7 min.), encontram-se na Figura 8.

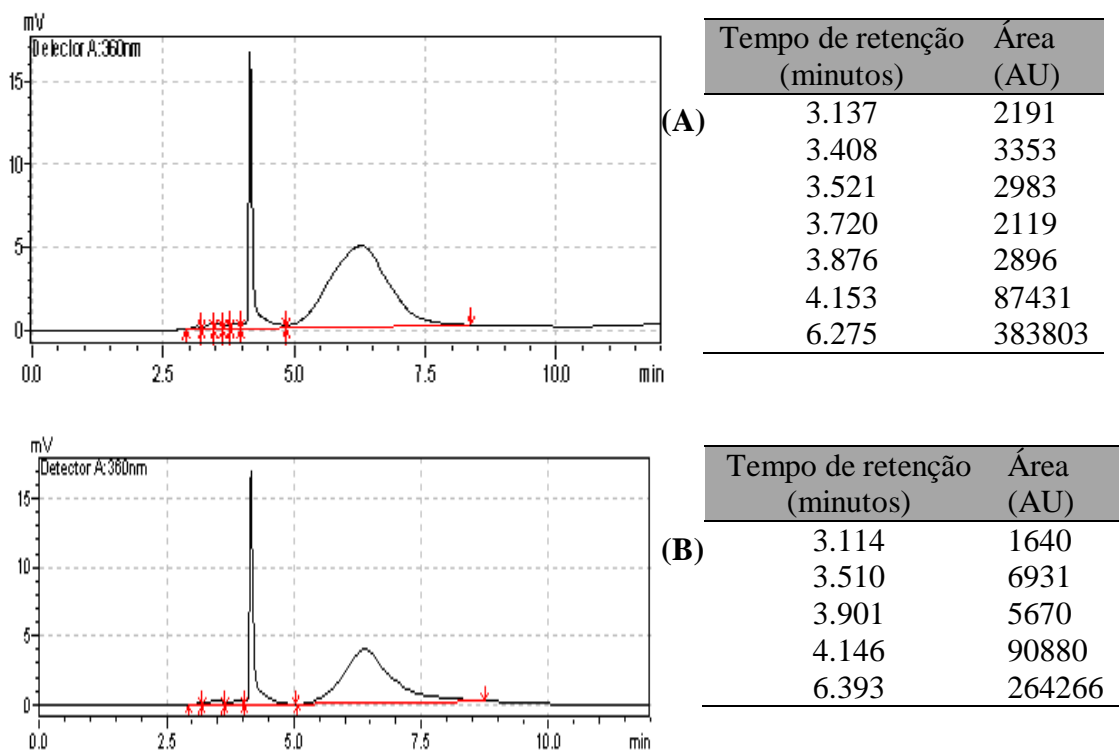


Figura 8. Cromatogramas típicos e tempos de retenção e respectivas áreas para detecção de holomicina no caldo fermentativo: linhagem selvagem (A) e linhagem 45.41 (B).

De acordo com os resultados obtidos na análise cromatográfica para detecção de holomicina para a linhagem selvagem e 45.41, observa-se que ambas as linhagens não apresentaram pico em 6.7 minutos e provavelmente não produzem holomicina (Figura 8).

Uma vez definida e caracterizada fenotipicamente a linhagem 45.41, com capacidade produtiva aumentada de CefC, buscou-se melhorar as condições de meio de cultivo, aumentando assim produção de CefC.

Um experimento ou cultivo submerso investigou a produção de CefC, pelas linhagens 45.41 e a linhagem selvagem, frente a duas fontes distintas de C, o amido e a maltose. Aharonowitz e Demain, (1978) e Vining et al., (1987) avaliaram a produção de CefC utilizando-se estas fontes de C, dentre outras, e constataram uma menor produção associada à maltose, comparada ao amido. Este comportamento foi observado pelos pesquisadores, tanto para a linhagem selvagem, quanto para a linhagem mutante espontânea, analisada em seus estudos, respectivamente.

Os dados referentes a este experimento estão demonstrados na Figura 9.

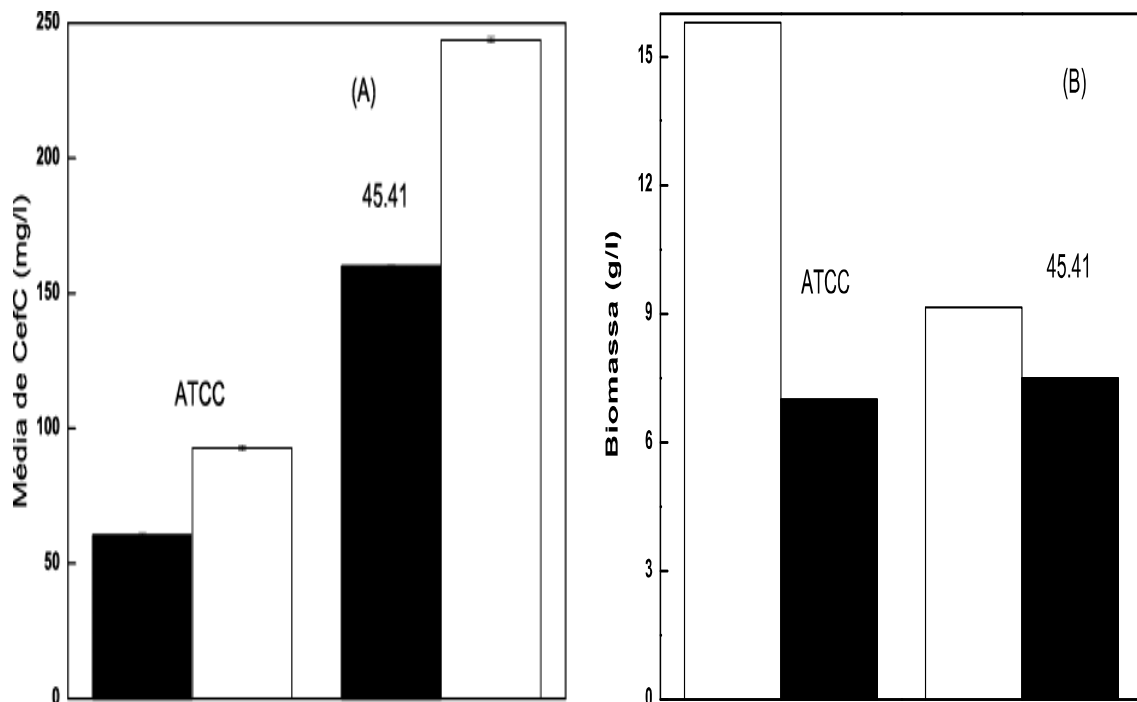


Figura 9. Resultados obtidos em cultivo submerso, variando-se a fonte de C, amido ou maltose, em 72 horas: **(A)** valores médios de CefC e respectivos desvios padrão e **(B)** biomassa (coluna preta- maltose e coluna branca – amido).

Nota-se que a produção de CefC foi maior com o amido como principal fonte de C. A linhagem 45.41, mostrou-se com capacidade produtiva aumentada em cerca de 2,7 vezes, comparada a linhagem selvagem, independente da fonte de C presente no meio. Ainda em relação às fontes de C, tanto a linhagem selvagem, quanto a linhagem 45.41, provavelmente tiveram suas produções de CefC reprimidas, quando a maltose foi a principal fonte de C. No entanto, observa-se que a linhagem 45.41 mostrou-se menos afetada, por esta provável repressão. Além disso, mesmo com a diminuição da produção com o uso da maltose como única fonte de C, a linhagem 45.41 ainda mostrou-se mais produtiva que a linhagem selvagem (Figura 9A).

Quando se compara estes dados com os observados na literatura, constata-se que Vining et al., (1987) encontraram o mesmo percentual de diminuição na produção, para sua linhagem mutante *S. clavuligerus* 21, no mesmo período de tempo, utilizando-se das mesmas fontes de C. Já a produção de CefC da

linhagem selvagem apresentou maior percentual de diminuição, nesta avaliação, em 72 horas de processo, enquanto que na literatura esta diminuição foi menor e em 96 horas, segundo Aharonowitz e Demain, (1978). Vale ressaltar que os pesquisadores citados, utilizaram-se de meios de produção com composições distintas daquelas utilizadas neste trabalho.

Em relação à biomassa, observa-se que a maltose gerou aumento de 50% para a linhagem selvagem e de até 34% para a linhagem 45.41, em relação à observada com amido (Figura 9 B). Foi possível constatar assim, que os resultados encontrados neste trabalho corroboram dados encontrados na literatura, os quais apontam o amido como fonte de C adequada ao crescimento e produção de CefC, enquanto que a maltose é adequada apenas ao crescimento (AHARONOWITZ e DEMAIN, 1978; VINING et al., 1987).

A partir destes resultados realizou-se um novo experimento, variando-se as proporções de amido e maltose, no meio de produção, a fim de se avaliar sua influência na produção da CefC, pelas linhagens selvagem e 45.41. Os dados estão apresentados na Figura 10.

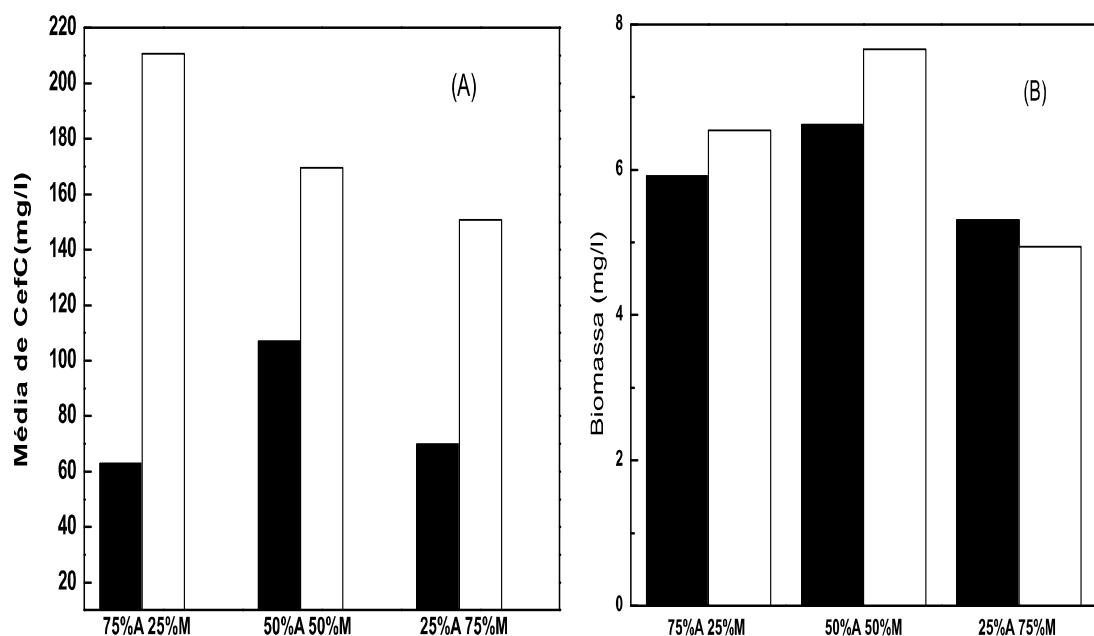


Figura 10. Resultados obtidos em cultivo submerso, variando-se a fonte de C, amido (A) ou maltose (M), em 72 horas: **(A)** valores médios de CefC e respectivos desvios padrão e **(B)** biomassa (coluna preta- linhagem selvagem ATCC 27064 e coluna branca –linhagem 45.41).

Como se pode observar, a produção de CefC variou de acordo com cada linhagem e proporções dos carboidratos. A linhagem 45.41 apresentou o máximo valor de produção, com a maior proporção de amido, e ligeiros decréscimos em decorrência do aumento da proporção de maltose. Independente deste comportamento produtivo e condições testadas, esta linhagem (45.41) se mostrou com a capacidade produtiva aumentada em até três vezes comparada à linhagem selvagem. Por sua vez, o valor máximo de produção com iguais porcentagens dos carboidratos no meio e semelhança nos valores de produção, nas outras condições testadas, foram observados para a linhagem selvagem (Figura 10 A).

Quanto à biomassa, a linhagem 45.41 apresentou valores ligeiramente maiores que a linhagem selvagem, com exceção da condição com maior porcentagem de maltose. A linhagem selvagem, por outro lado, apresentou o máximo valor de biomassa frente às iguais proporções dos carboidratos, (Figura 10 B). Ambas as linhagens apresentaram concentração celular menor frente à máxima proporção de maltose, em concordância com o observado por Aharonowitz e Demain, (1978) e Vining et al., (1987).

Assim, pode-se concluir que a linhagem 45.41 mostrou-se mais robusta em termos globais do processo fermentativo frente às diferentes fontes de C testadas, visto que sua produção e concentração celular apresentam-se menos afetados, por um provável efeito de repressão na produção de CefC causada pela maltose, diante das condições avaliadas, em comparação a linhagem selvagem. Além disso, nos seguintes experimentos, o amido voltou a ser utilizado como principal fonte de C, em todos os meios de produção, uma vez que a maltose sozinha ou conjugada ao amido não propiciou os melhores resultados de produção de CefC, por ambas as linhagens, selvagem e 45.41, e também não propiciou produções específicas satisfatórias.

Visto que a mudança de fonte de C no meio de produção não levaria a aumento nos níveis de produção, um experimento foi realizado e seu objetivo foi investigar o comportamento produtivo das linhagens mutante 45.41 e selvagem em meios contendo várias diaminas na ausência de lisina. Este aminoácido tão fundamental a produção de CefC foi retirado do meio de produção, pois queria se investigar apenas o efeito das diaminas. Os resultados referentes a este experimento são mostrados na Figura 11.

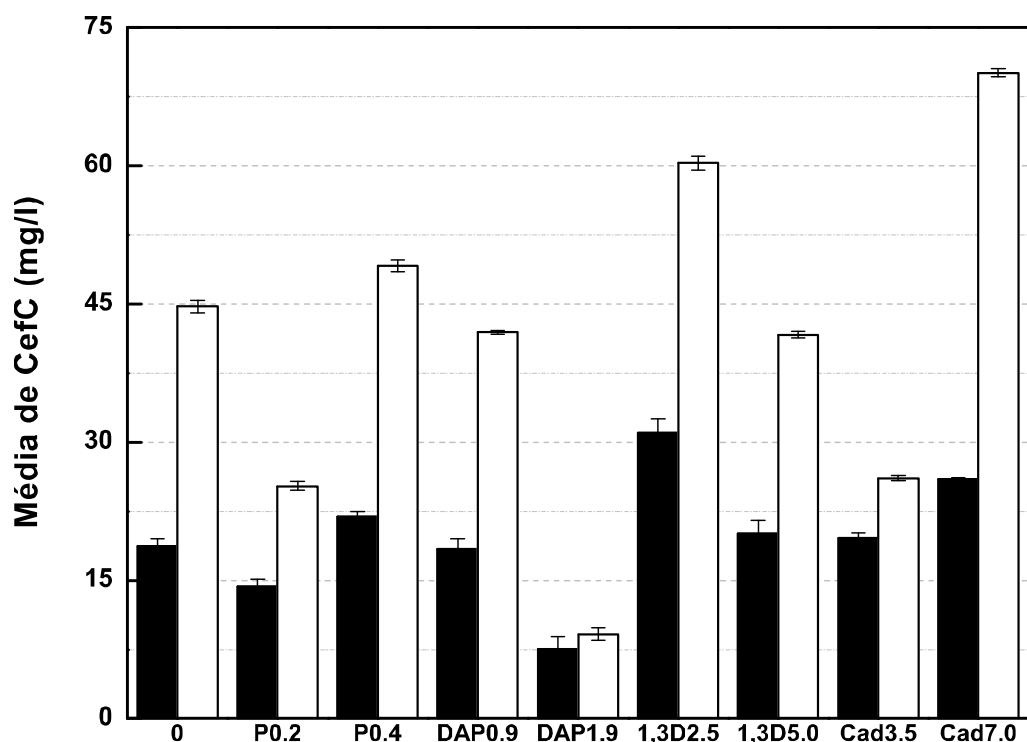


Figure 11. Valores médios da concentração de CefC e desvios padrão obtidos em 48 horas de cultivo em frascos agitados, com a linhagem selvagem (colunas pretas) e linhagem 45.41 (colunas brancas) (0: sem lisina ou cadaverina; P: putrescina; DAP: ácido 2,6-diaminopimélico; 1,3D: 1,3-diaminopropano; Cad: cadaverina) e concentração em g/l ao lado das abreviações.

Ao se observar a Figura 11, nota-se que em geral, após a adição das diaminas ao meio, a linhagem 45.41 manteve-se produzindo de duas a três vezes mais CefC que a linhagem selvagem, com exceção da condição DAP 1,9 g/l. Os maiores valores de CefC foram obtidos com cadaverina a 7,0 g/l, seguida pelo 1,3-diaminopropano a 2,5 g/l. Nestas condições, a produção de CefC pela linhagem 45.41 foi 2 e 2,88 vezes maior que a da linhagem selvagem. A linhagem mutante mostrou os melhores resultados de produção de CefC, até mesmo na condição 0, que representa ausência de qualquer uma das diaminas e da lisina. Leitão et al. (1999) também observaram efeitos positivos na produção de CefC pelo 1,3-diaminopropano, em *N. lactamdurans*, na mesma concentração. Os valores de concentração celular obtidos em 48 horas do cultivo em frascos agitados foram similares para ambas as linhagens, 45.41 e selvagem ATCC 27064, entre 3,0 a 5,5 g/l.

Desta forma, uma vez investigado o efeito de cada diamina sobre o processo global fermentativo das linhagens, um novo experimento foi realizado. Este foi caracterizado por ser um planejamento de dois fatores (lisina e cadaverina), três níveis, baseado no ponto central, de faces centradas. O objetivo foi investigar os efeitos individuais ou combinados da cadaverina e lisina na produção de CefC. As condições adotadas para as variáveis independentes e a produção de CefC obtida com as linhagens selvagem e mutante estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Faixa e níveis de concentração de lisina e cadaverina, em unidades originais e codificadas, de acordo com o planejamento de faces centradas, e a concentração de CefC em 48 horas (variável resposta) em cultivos em batelada, para cada linhagem.

Variáveis					Resposta CefC (mg/l)	
Corrida	Unidades Codificadas		Unidades originais		<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	<i>S. clavuligerus</i> 45.41
	Lisina (x ₁)	Cadaverina (x ₂)	Lisina (g/l)	Cadaverina (g/l)		
1	-1	+1	0	7,0	26,9	72,0
2	-1	0	0	3,5	19,8	26,0
3	-1	-1	0	0	14,5	25,0
4	0	+1	3,65	7,0	30,8	122,5
5	0	0	3,65	3,5	16,2	43,5
6	0	0	3,65	3,5	21,1	42,0
7	0	0	3,65	3,5	20,3	43,0
8	0	-1	3,65	0	22,5	55,0
9	+1	+1	7,3	7,0	42,0	144,9
10	+1	0	7,3	3,5	30,3	93,0
11	+1	-1	7,3	0	41,1	85,0

A metodologia da superfície de resposta foi empregada na análise estatística dos dados experimentais, e do modelo teórico (polinômio de segundo grau) para prever a produção de CefC para as linhagens selvagem e 45.41. Superfície de resposta em 3D para as linhagens 45.41 e selvagem estão demonstradas nas Figuras 12 e 13.

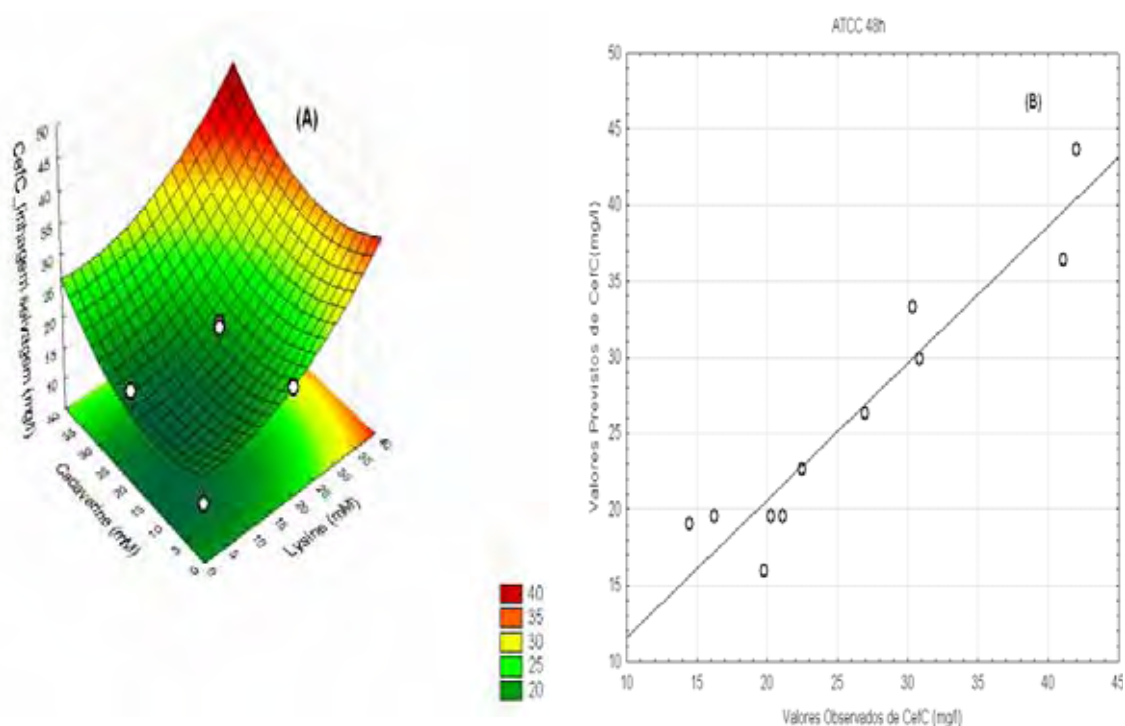


Figura 12. (A) Superfície de resposta (coeficiente de determinação de 0.902 a 90% de nível de confiança) e (B) valores observados vs. previstos de CefC (mg/l) em 48 horas de cultivo em frascos agitados, com a linhagem selvagem *S. clavuligerus* ATCC 27064.

O modelo quadrático está representado pela Equação 2 (variáveis independentes em unidades codificadas).

$$C_{\text{CephC_wild strain}} = 27.4 \pm 0.8 + 8.7 \pm 1.1 x_1 - 2.6 \pm 0.8 x_1^2 + 3.6 \pm 1.1 x_2 - 3.4 \pm 0.8 x_2^2$$

(Equação 2)

Os coeficientes da Equação 2 indicam que o modelo teórico prevê um aumento na produção de CefC causado pela lisina, de maneira linear.

A análise estatística dos dados obtidos com a linhagem selvagem mostrada na Tabela 3 valida o modelo, uma vez que o valor do F-test estimado em relação à falta de ajuste/erro puro foi menor que o valor tabelado ($F_{\text{falta de ajuste}} = 2,6 < F_{4,2} = 9,24$), a 90% de nível de confiança.

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrático*, a 90% de nível de confiança, para dados experimentais do ponto central, face centrada obtidos para a linhagem selvagem *S. clavuligerus* ATCC 27064.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{value}	p
Regressão	777,7	4	194,4	6,9	0,0307
Resíduos	84,8	6	28,2	–	–
Falta de ajuste	71,0	4	17,8	2,6	0,29837
Erro puro	13,8	2	6,9	–	–
Total	862,5	10	–	–	–

* $R^2 = 0,902$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média dos quadrados.

Assim, foi possível rejeitar a falta de ajuste e aceitar a hipótese de que a variação observada na produção de CefC resultou da adição de cadaverina e lisina ao meio de cultura padrão (separadamente e/ou combinadas), dentro da faixa de concentração investigada.

O tratamento estatístico dos dados do planejamento de faces centradas, referentes à linhagem 45.41 está demonstrado na Figura 13.

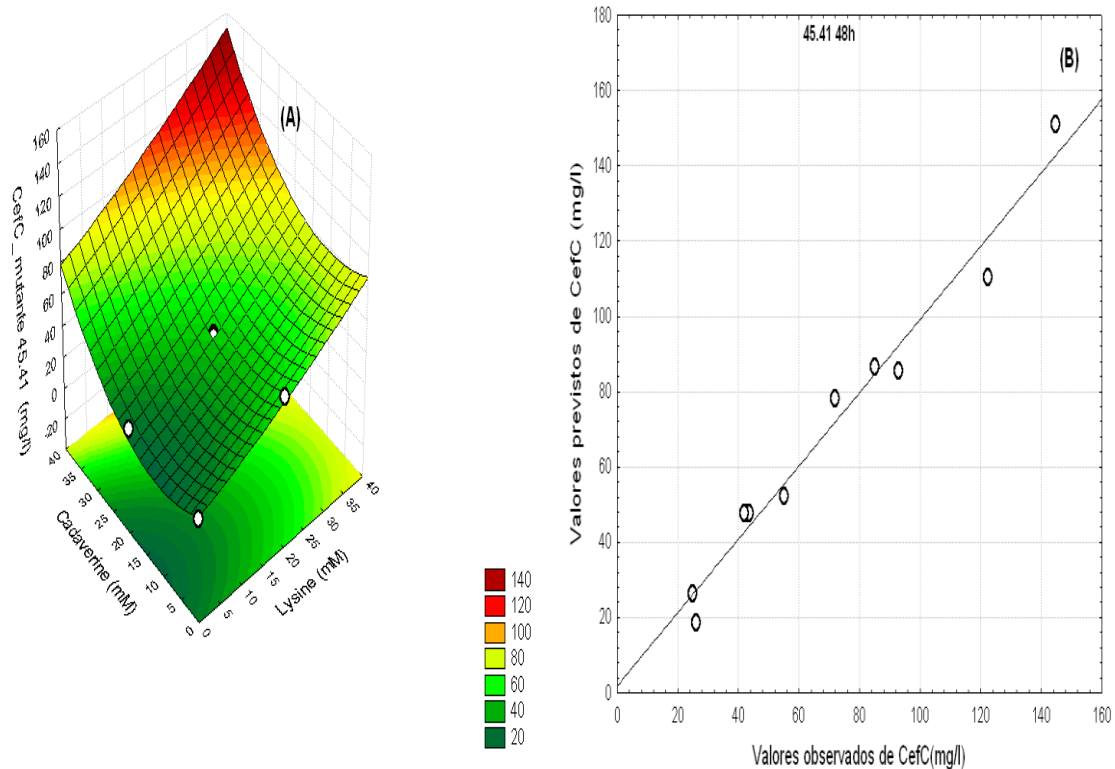


Figura 13. (A) Superfície de resposta (coeficiente de determinação de 0.973 a 90% de nível de confiança) e (B) valores observados vs. previstos de CefC (mg/l) em 48 horas de cultivo em frascos agitados, com a linhagem 45.41.

O modelo quadrático para a linhagem 45.41 foi simplificado pela eliminação de termos estatísticos insignificantes e está expresso pela Equação 3 (variáveis independentes em unidade codificadas).

$$C_{\text{CephC}_{45.41 \text{ strain}}} = 72.9 \pm 0.2 + 33.3 \pm 0.3 x_1 + 29.1 \pm 0.3 x_2 - 16.7 \pm 0.2 x_2^2 \quad (\text{Equation 3})$$

A análise estatística dos dados (Tabela 4) mostra a validade do modelo, uma vez que $F_{\text{model}}=52,8 > F_{3,7}=3,07$, com um p-valor pequeno ($p \cong 0.044$) a 90% de nível de confiança e bom coeficiente de determinação $R^2=0,973$. Por outro lado, foi possível observar que $F_{\text{falta de ajustet}}= 207,3$ é muito maior que o tabelado $F_{5,2}=9,29$, o que pode levar a rejeitar o modelo. No entanto, esta é uma típica situação na qual o erro puro tende a zero, implicando em um valor de $F_{\text{falta de}}$

ajuste muito alto e, então, deve ser reconsiderado, uma vez que outras evidências mostradas nas Tabelas 2 e 4, favorecem a aceitação do modelo.

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão quadrático*, a 90% de nível de confiança, para dados experimentais do ponto central, face centrada obtidos para a linhagem 45.41.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F _{value}	p
Regressão	14094,8	3	4698,3	52,8	0,0437
Resíduos	623,1	7	89,0	–	–
Falta de ajuste	621,9	5	124,4	207,3	0,004267
Erro puro	1,2	2	0,6	–	–
Total	14717,9	10	–	–	–

* $R^2 = 0,973$; SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: média dos quadrados.

Comparando os coeficientes da Equação 3 a superfície de resposta correspondente (Figura 13 A), foi possível observar que a concentração de CefC aumenta linearmente e pronunciadamente, com o aumento nas concentrações de lisina e cadaverina, na mesma ordem de magnitude.

Após os resultados observados nos experimentos em mesa-rotativo incubadora, realizou-se um experimento em biorreator de bancada, cujo objetivo foi avaliar a existência de possíveis efeitos combinados entre os compostos que demonstraram os melhores resultados, em termos de produção. Os valores de CefC obtidos nos meios de cultivo que combinavam 3,65 ou 7,3 g/l de lisina e 7,0 g/l de cadaverina foram da mesma ordem de magnitude (Tabela 2). Assim, o processo em batelada realizado no biorreator foi feito com um meio contendo 3,65 g/l de lisina, 7,0 g/l de cadaverina, e 2,5 g/l de 1,3-diaminopropano. Este último composto foi adicionado devido aos bons resultados obtidos quando as diaminas foram testadas individualmente (Figura 9). Estes resultados estão demonstrados na Figura 14.

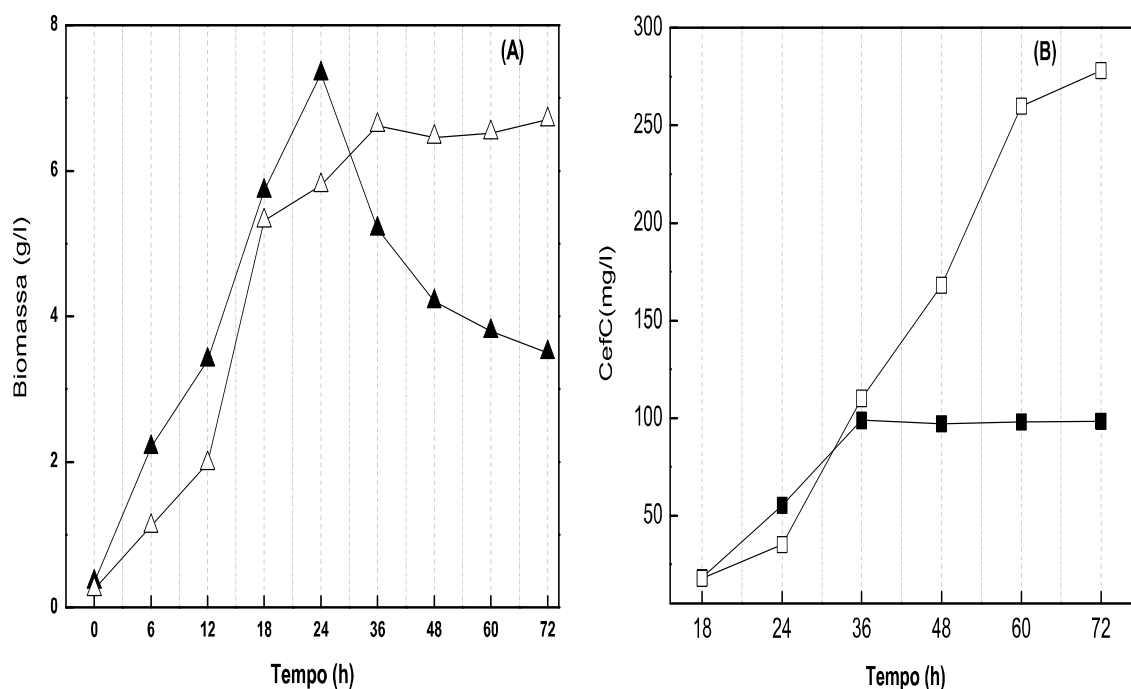


Figura 14. (A) Biomassa e (B) concentração de CefC obtidos em biorreator de bancada agitado e aerado, com *S. clavuligerus* ATCC 27064 (símbolos sólidos) e linhagem 45.41 (símbolos abertos).

Os máximos valores de biomassa obtidos foram aproximadamente os mesmos para ambas as linhagens (~7,5 g/l). No entanto, a concentração celular da linhagem selvagem caiu drasticamente após 24 horas de cultivo. Este comportamento não foi observado, para a linhagem selvagem, quando o meio de cultivo era isento de diaminas e acrescido de lisina, ou seja, no meio de produção padrão de CefC (Antonio et al., 2007). Assim, sugere-se que esta queda possa ter ocorrido devido a um possível efeito negativo que as diaminas possam exercer quando presentes no meio de cultivo. Por outro lado, a queda da concentração celular observada para a linhagem selvagem pode estar relacionada ao fato de que esta linhagem seja sensível ao antibiótico produzido. Assim, o aumento na produção pode ter feito com que a concentração celular diminuísse (Figura 14 A).

A produção de antibióticos pela linhagem selvagem se tornou constante após 36 horas. Neste mesmo período os níveis de CefC atingiram seu máximo valor, cerca de 100 mg/l, o mesmo obtido em cultivos em mesa rotativo-incubadora com o meio padrão de produção. Comportamento oposto foi observado para a linhagem 45.41. A biomassa manteve-se praticamente

constante após atingir seu máximo valor, e a produção cresceu três vezes comparada a da linhagem selvagem. Estas mesmas diferenças foram observadas entre as linhagens nos cultivos em mesa-rotativo incubadora e confirmadas no biorreator. Nota-se assim, que o aumento de escala, não refletiu em aumento nos níveis de produção de CefC, uma vez que os máximos valores de produção, cerca de 300 mg/l, mantiveram-se praticamente os mesmos.

A linhagem 45.41 respondeu positivamente a todas as diaminas testadas (putrescina, cadaverina, e 1,3-diaminopropano) sendo que a cadaverina propiciou as maiores concentrações de CefC. Evidências bioquímicas e genéticas do catabolismo da lisina via cadaverina em *Streptomyces* spp foram primeiramente apresentadas por Madduri et al., (1989), os quais também demonstraram, no entanto, que o catabolismo da lisina via ácido α -aminoadípico ocorre apenas em espécies produtoras de antibióticos β -lactâmicos (Figura 15).

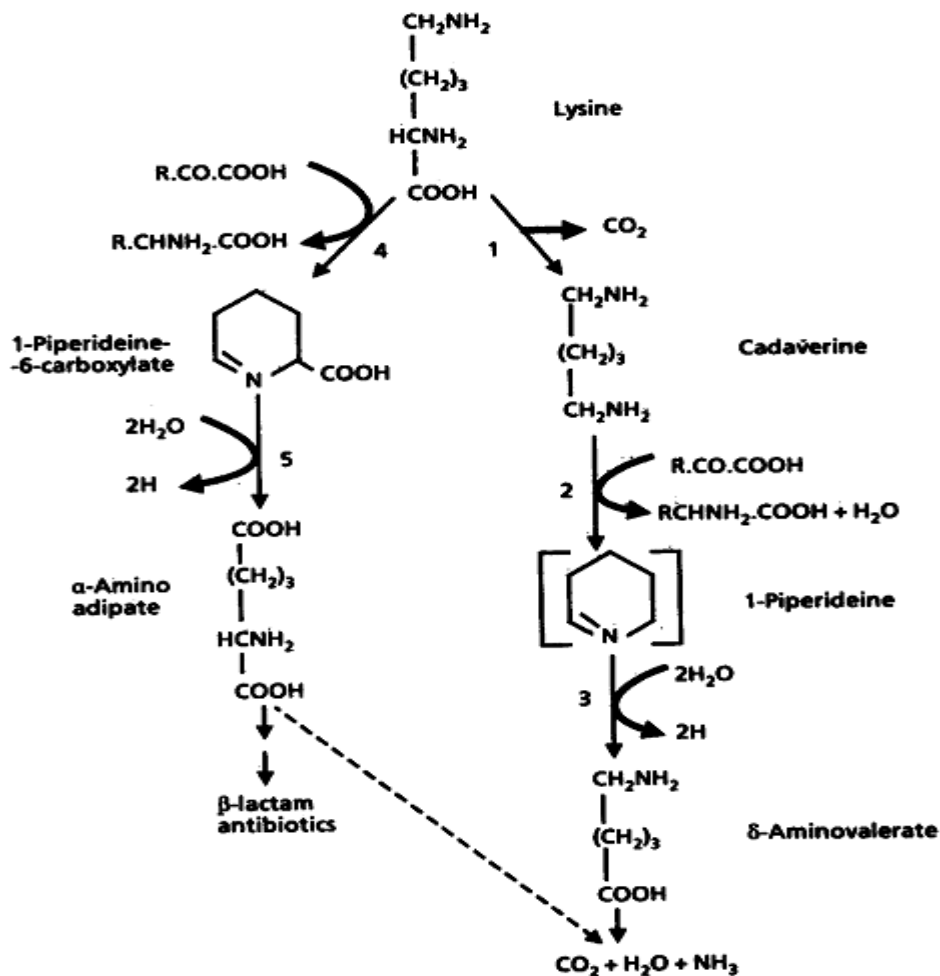


Figura 15. Catabolismo da lisina em *Streptomyces* spp. As enzimas são: 1, lisina descarboxilase; 2, cadaverina aminotransferase; 3, 1-piperideina deidrogenase; 4, lisina ϵ -aminotransferase; 5, 1-piperideina-6-carboxilato deidrogenase. O passo da direita é essencial para o crescimento da *Streptomyces* spp. na presença de lisina (5); o passo da esquerda só está presente em linhagens de *Streptomyces* spp. produtoras de β - lactâmicos.

Apesar de alguns autores sugerirem que a adição de cadaverina aos meios de cultura alavanca a produção de antibióticos β -lactâmicos (DEMAIN e VAISHNAV, 2006), não há dados sobre isto para nenhuma espécie produtora. Sugere-se que, o acúmulo intracelular das diaminas, neste caso cadaverina e 1,3-diaminopropano, possa ter sinalizado para a linhagem 45.41 a necessidade de aumento da produção de CefC, provavelmente como forma de defesa. Segundo Leitão et al.,(1999), o acúmulo de diaminas no meio de cultivo para

N.lactamdurans, funciona desta maneira e regula a transcrição de genes relacionados à rota biossintética de CefC. Além disso, sugere-se também, que o catabolismo da lisina via cadaverina, pode ter sido controlado pela presença de cadaverina no meio de cultivo, por meio de um mecanismo de controle tipo *feedback*. Desta forma, é como se a lisina que seria descarboxilada para formar cadaverina tivesse sido poupada, aumentando o suprimento de lisina direcionado a biossíntese de CefC através da via do alfa-aminoadipato (Figura 15).

No meio padrão, a linhagem 45.41 produziu 2,88 vezes mais que a linhagem selvagem, enquanto no planejamento de faces centradas, a linhagem 45.41 foi até quatro vezes mais produtiva que a linhagem selvagem, dependendo da condição testada (Tabela 2). Assim, pode se sugerir que a linhagem 45.41 responda mais aos efeitos regulatórios das diaminas que a linhagem selvagem e que também seja menos sensível a um possível efeito regulatório exercido pelo aumento nos níveis de antibiótico no meio.

Outra diamina testada nos experimentos, e que estimulou a produção de antibióticos quando adicionada ao meio foi o 1,3-diaminopropano. Leitão et al. (1999) mostraram que diaminas exógenas de três carbonos são efetivas em promover a biossíntese de CefC em *N. lactamdurans*, sugerindo que isto ocorre dando início a um mecanismo regulatório ao nível transcricional de alguns genes de enzimas biossintéticas. Neste estudo, a produção de CefC em frascos agitados, com respeito a ambas as linhagens, foi aumentada pela adição do 1,3-diaminopropano (Figura 11). A produção obtida no biorreator de bancada, em meio contendo 1,3-diaminopropano, cadaverina, e lisina, com a linhagem mutante foi à mesma observada em mesa-rotativo incubadora, com o meio de produção padrão. No entanto, o primeiro meio continha cinco vezes mais lisina que o último meio, sugerindo um uso melhorado da lisina na produção de antibióticos, possivelmente induzido pelas diaminas exógenas.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados observados, foi possível concluir que:

1. A linhagem 45.41 mostrou-se mais robusta ao longo do trabalho, em termos de produção de CefC frente às variações de compostos testadas, uma vez que a sua capacidade produtiva apresentou-se pouco afetada, por compostos como as diaminas ou fontes de C não tão adequadas, em comparação a linhagem selvagem. Também foi possível concluir que sua capacidade produtiva aumentada se mostrou mais favorecida por compostos que não exerceram o mesmo papel para a linhagem selvagem, como as diaminas.

2. A manipulação de compostos indutores de produção presentes no meio de cultura aliados ao processo mutagênico clássico, ainda são úteis na busca do melhoramento de linhagens e aumento de suas capacidades produtivas.

3. Apesar das indicações na literatura das vantagens do uso das diaminas na produção de CefC não há relatos que mostrem essa efetividade em *S. clavuligerus*. Os resultados deste estudo indicam esta efetividade, comparativamente a linhagem 45.41 e selvagem.

REFERÊNCIAS

- AHARONOWITZ, Y.; DEMAIN, A. L. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 14, p. 159-164, 1978.
- AIKAWA, M.; LOPES-SHIKIDA, S. A. R.; LEMOS, M. F., PRADELLA, J. G. C.; PADILLA, G. Screening of spontaneous and induced mutants in *Streptomyces avermitilis* enhances avermectin production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 52, p. 558-562, 1999.
- 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., Curitiba. **Anais...** Curitiba: [S.n.], 2007. PFE0121. 1 CD-ROM.
- BALTZ, R. H. Mutation in *Streptomyces* In: QUEENER, M.; DAY, L. E. (Ed.). **The Bacteria**: antibiotic producing. New York: Academic Press, 1986. v. 9, p. 61-69.
- BALTZ, R. H. Genetic methods and strategies for secondary metabolite yield improvement in actinomycetes. **Anto. Van. Leeuwe.**, v. 79, p. 251-259, 2001.
- BIGNELL, D. R. D.; TAHLAN, K.; COLVIN, K. R.; JENSEN, S. E.; LESKIW, B. K. Expression of *ccaR*, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is dependent on *bldG*. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 49, n. 4, p. 1529-1541, 2005.
- 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.
- BRUNDTLAND, G. H. Overcoming antimicrobial resistance. Disponível em: <www.who.int/infectious-disease-report/2000/>. Acesso em: 27 nov. 2009.
- 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. **Curr. Tre. Biotechnol. Pharm.**, v. 3, p. 372-384, 2009.
- 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.
- BUSHELL, M. E.; KIRK, S.; ZHAO, H.J.; AVIGNONE-ROSA, C. A. Manipulation of the physiology of clavulanic acid biosynthesis with the aid of metabolic flux analysis. **Enzyme Microbial. Technol.**, v. 39, p. 149-157, 2006.

CAVALLIERI, A. P.; ARAUJO, M. L. G. C. **Adição de precursores em meio complexo solúvel para a produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus***. 2010. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

CHEN, K. C.; LIN, Y. H.; TSAI, C. M.; HSIEH, C. H.; HOUNG, J. Y. Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with glycerol feeding. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, p. 455-458, 2002.

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.

DEMAIN, L. A.; ELANDER, R. P. The β -lactam antibiotics: past, present and future. **Anto. Van Leeuwe.**, v. 75, p.5-19, 1999.

DEMAIN, L. A.; VAISHINAV, P. Involvement of nitrogen –containing compounds in beta-lactam biosynthesis and its control. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 26, p. 67-82, 2006.

DÉVI, S.; SRIDHAR, P. Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus*. **Process Bioch.**, v.36, p. 225-231, 2000.

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

ESSACK, Y. S. The development of β -lactam antibiotics in response to the evolution of β -lactamases. **Pharma. Res.**, v. 18, p. 1391-1399, 2001.

FANG, A.; KEABLES, P.; DEMAIN, A. L. Unexpected enhancement of β -lactam antibiotic formation in *Streptomyces clavuligerus* by very high concentrations of exogenous lysine. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 44, p. 705-709, 1986.

FANG, A.; DEMAIN, A. L. Dependence of nitrogen and phosphorus regulation of beta-lactam antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus* on aeration level. **J. Ind. Microbiol.**, v. 15, p. 407- 410, 1995.

FURLAN, R. L. A.; GARRIDO, L. M.; BRUNATTI, G.; PADILLA, G. A rapid and sensitive methods for screening of DNA intercalating antibiotics. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, n. 21, p. 1807-1815, 2002.

GARCIA-DOMINGUEZ, M.; MARTIN, J. F.; LIRAS, P. Characterization of sugar uptake in wild-type *Streptomyces clavuligerus*, which is impaired in glucose uptake, and in a glucose-utilizing mutant. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 12, p. 6808-6814, 1989.

GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA NETO, A.; BADINO, A. C.; HOKKA, C. O. Optimization of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnol. Lett.**, v. 23, p. 157-161, 2001.

- GORYANIN, I. I.; LEBEDEVA, G. V.; MOGILEVSKAYA, E. A.; METELKIN, E. A.; DEMIN, O. V. Cellular kinetic modeling of the microbial metabolism: functional biology of whole organisms. **Microbial. Proteo.**, v. 49, p. 437- 489, 2006.
- HIGGENS, C. E.; KASTNER, R. E. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a beta-lactam antibiotic producer. **Inter. J. System. Bacteriol.**, v. 21, p. 326-331, 1971.
- HÜTTER, R.; ECKHARDT, T. Genetic manipulation. In: GOODFELLOW, M. WILLIAMS, S. T; MORDASKI, M. (Ed.). **Actinomycetes in biotechnology**. London: Academic Press, 1988. p. 89-185.
- JENSEN, S. E.; PARADKAR, A. S.; MOSHER, R. H.; ANDERS, C.; BEATTY, P. H.; BRUMLIK, M. J.; GRIFFIN, A.; BARTON, B. Five additional genes are involved in clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 1, p. 192-202, 2004.
- KAGLIWAL, L. D.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. A novel medium for the production of cephamycin C by *Nocardia lactamdurans* using solid-state fermentation. **Bioresource Technol.**, v. 100, p. 2600-2606, 2009.
- KENNEDY, M.; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 23, p. 456-475, 1999.
- KHETHAN, A.; MALBERG, L. H.; KYUNG, Y. S.; SHERMAN, D. H.; HU, W. S. Precursor and cofactor as a check valve for cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnol. Prog.**, v. 15, p. 1020-1027, 1999.
- KIESER, T.; CHATER, K. F.; BIBB, M. J.; BUTTNER, M. J.; HOPWOOD, D. A., **Practical Streptomyces genetics**. Norwich: The John Innes Found., 2000. p. 613.
- KUMAR, P.; SATYANARAYANA, T. Optimization of culture variables for improving glucoamylase production by alginate-entrapped *Thermomucor indicae-seudaticae* using statistical methods. **Bioresource Technol.**, v. 98, p. 1252-1259, 2007.
- LEBRIHI, A.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P. Carbon catabolite regulation of cephamycin C expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 28, p. 44-51, 1988.
- LEITÃO, A. N.; ENGUITA, F. J.; DE LA FUENTE, J. L.; LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Inducing effect of diamines on transcription of the cephamycin C genes from the *lat* and *pcbAB* promoters in *Nocardia lactamdurans*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 2379-2384, 1999.
- LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. **Anton. Leeuw.**, v. 75, p. 109-124, 1999.

- LIRAS, P.; MARTIN, J. F. Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*. In: BARREDO, J. L. (Ed.). **Methods in biotechnology**. New Jersey: Humana Press, 2005. v. 18, p. 149-163.
- LIRAS, P.; DEMAIN, A. L. Enzymology of β -lactam compounds with cephem structure produced by actinomycetes. **Methods Enzimol.** v. 458, p. 401-429, 2009.
- LIRAS, P.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, A. Clavulanic acid, a β -lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p. 467-475, 2000.
- LOCCI, R. Streptomycetes and related genera In: WILLIAMS, S. T.; BERGEY, D. H. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. v. 4, p. 2451-2499.
- MENDELOVITZ, S.; AHARONOWITZ, Y. Regulation of cephamycin C synthesis, aspartokinase, dihydrodipicolinic acid synthetase, and homoserine dehydrogenase by aspartic acid family amino acids in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 21, p. 74-84, 1982.
- MERCK AND COMPANY. (United States). Edward Inamine; Jerome Birnbaum. **Production of cephamycin C by fermentation**. US1466055, 11 Dec. 1974, 02 Sept. 1975.
- MERCK AND COMPANY. (United States). Edward Inamine; Jerome Birnbaum. **Cephamycin C by fermentation**. US3977942, 21 Nov. 1975, 31 Aug. 1976.
- OKABE, M.; KUWAJIMA, T.; SATOH, M.; KIMURA, K.; OKAMURA, K.; OKAMETO, R. Preferential and high-yield production of a cephamycin c by dissolved oxygen controlled fermentation. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 73, p. 292-296, 1992.
- OMSTEAD, D. R.; HUNT, G. H. ; BUCKLAND, B. C. Commercial production of cephamycin antibiotics. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.) **Comprehensive biotechnology**, 1985. v. 3, p.187-210.
- PAREKH, S.; VINCI, V. A.; STROBEL, R. J. Improvement of microbial strains and fermentation process. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p. 287-301, 2000.
- PATNAIK, R. Engineering complex phenotypes in industrial strains. **Biotechnol. Prog.**, v. 24, p. 38-47, 2008.
- PRUES, D. L.; KELLETT, M. A. New clavam antibiotic from *Streptomyces clavuligerus*. **J. Anti.**, v. 20, p. 208-212, 1983.

- RIUS, N.; MAEDA, K.; DEMAIN, A. L. Induction of L-lysine in *Streptomyces clavuligerus* producer of cephalosporins. **Microbiol. Lett.**, v. 144, p. 207-211, 1996.
- ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 20, p. 318-325, 1984.
- SÁNCHEZ, L.; BRAÑA, A. F. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Microbiology**, v. 142, p. 1209-1220, 1996.
- SRIDHAR, P. Cephamycins, important milestone in beta-lactam. **Express Pharma Pulse**. Disponível em: < www.expresspharmapulse.com>. Acesso em: 25 fev. 2002.
- TROVATTI, E.; BADINO JUNIOR, A. C.; HOKKA, C. O.; ARAUJO, M. L. G. C. Influence of free amino acids on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in synthetic medium. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 49, p.173-179, 2006.
- VINING, L. C.; JENSEN, S. E.; WESTLAKE, D. W. S.; AHARONOWITZ, Y.; WOLFE, S. Cephamycin production and isopenicillin N synthetase activity in cultures of *Streptomyces clavuligerus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.27, p. 240-246, 1987.
- WEIL, J.; MIRAMONTI, J.; LADISCH, M.R. Cephalosporin C: mode of action and biosynthetic pathway. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 17, p. 85-87, 1995.
- YILMAZ, I. E.; ÇAYDASI, K. A.; ÖZCENGİS, G. Targeted disruption of homoserine dehydrogenase gene and its effect on cephamycin C production in *Streptomyces clavuligerus*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, p. 1-7, 2008.
- ZHANG, J.; GREASHAM, R. Chemically defined media for commercial fermentations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, p. 407-421, 1999.