

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA”
INSTITUTO DE QUÍMICA – CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Efeito da lisina na produção de compostos beta-lactâmicos
produzidos por *Streptomyces clavuligerus***

TATIANA CORRÊA

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
junto ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo
Bolsa: CAPES**

ARARAQUARA – 2008

**Este trabalho é dedicado ao meu marido Bruno Marques e ao meu filho João
Pedro, por terem dado novo sentido à minha vida.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, que guia meus passos e me dá força para seguir em frente hoje e sempre.

Ao meu pai, minha mãe e minha irmã, que sempre torcem por mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Lucia pela orientação. Mostrou ser uma mulher de força, dedicação e paciência, muito importante no desenvolvimento desse trabalho.

Ao grupo de estudos do DEQ-UFSCar, pertencente ao projeto temático desenvolvido sob o título de "Produção de Ácido Clavulânico, Cefamicina C e Outros Metabólitos Bioativos de *Streptomyces*", pelas discussões e debates construtivos.

À Prof. Dra. Paloma Liras por ceder linhagens necessárias para o desenvolvimento do bioensaio.

Ao Prof. Dr. Eduardo Maffud e ao aluno de doutorado Edson Crusca Júnior, pela assistência nas análises finais deste trabalho.

As técnicas Maria e Telma pelo auxílio indispensável no laboratório e também fora dele.

À Luisa, pela disposição em todos os momentos necessários.

Aos amigos Tatiana, Fernando, Belli, Adriana, Euclides e agora ao pequeno Pietro, pelas incontáveis vezes em que estiveram presentes nos momentos de descontração.

Ao Bruno e João Pedro, pelo apoio incondicional.

À CAPES pelo auxílio pesquisa cedido para a realização deste projeto.

SUMARIO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Antibióticos beta-lactâmicos	4
2.2. <i>Streptomyces clavuligerus</i>	4
2.3. Cefamicina C	5
2.4. Componentes de meio para a produção de beta-lactâmicos por <i>S. clavuligerus</i>	5
2.5. Rota biossintética	8
3. OBJETIVO	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Microrganismos	17
4.2. Meios de Cultura	17
4.2.1. Meio para as bactérias-teste	17
4.2.2. Meio de esporulação de <i>S. clavuligerus</i>	17
4.2.3. Meio de germinação de esporos ou reativação de micélios	18
4.2.4. Meios de preparo do inóculo principal e meios de produção	18
4.2.4.1. Meios de cultivo de <i>S. clavuligerus</i> contendo amido e/ou glicerol	19
4.2.4.2. Meio de produção suplementado com compostos integrantes da rota biossintética de CefC	20

4.2.4.3. Meios de produção contendo diferentes fontes de carbono	21
4.2.4.4. Meios de cultivo testados para a obtenção de meio padrão de produção	22
4.2.4.5. Meio padrão de produção para a determinação da atividade de LAT e CAT	23
4.2.4.6. Meio padrão de produção contendo α -cetoglutarato e diferentes concentrações de L-lisina	23
4.2.4.7. Meios suplementares contendo amido e diferentes concentrações de L-lisina	24
4.3. Métodos Analíticos	24
4.3.1.. Massa Seca	24
4.3.2. Concentração de Amido	24
4.3.3. Determinação da atividade de LAT e CAT	25
4.3.4. Determinação de L-lisina	26
4.3.5. Procedimento Experimental	27
4.3.5.1. Cultivos submersos	27
(a) Condições gerais	27
(b) Pré-culturas	27
(c) Fermentação Principal	28
4.3.5.2. Bioensaio de difusão em ágar	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Cultivo em meios contendo glicerol e/ou amido	34
5.2. Cultivo em meio suplementado com compostos integrantes da rota biossintética de CefC	35
5.3. Cultivo em meios suplementados com diferentes fontes de carbono	37

5.4. Seleção do meio padrão de produção de CefC	39
5.5. Determinação da atividade de LAT e CAT	41
5.6. Avaliação do cultivo em meio padrão adicionado de α-cetoglutarato e diferentes concentrações de L-lisina em processo em batelada	43
5.7. Suplementação do meio padrão com diferentes concentrações de L-lisina	47
5.8. Atividade de LAT e CAT em meio padrão suplementado com 10 mM de L-lisina.	50
6. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

FIGURA 2.1	Estrutura molecular de (A) ácido clavulânico, (B) penicilinas, (C) cefalosporinas e (D) cefamicinas (na CefC, o radical R = OCONH ₂) (BAGGALEY et al., 1997; TOWNSEND, 2002).	5
FIGURA 2.2	Rota biossintética de formação de ácido clavulânico (AC) e outros clavams em <i>S. clavuligerus</i> ; nomenclatura: CEAS – N-carboxiacetilarginina sintase, BLS – beta-lactam sintetase, PAH – proclavaminato amidinohidrolase, CAS – clavaminato sintase, CAD – clavaldeído desidrogenase (JENSEN et al., 2000).	9
FIGURA 2.3	Rota biossintética de CefC ou cefabacina em <i>S. clavuligerus</i> , <i>Nocardia lactamdurans</i> e <i>Lysobacter lactamdurans</i> (DAOC–deacetoxicefalosporina C, DAC–deacetilcefalosporina C) (LIRAS, 1999)..	10
FIGURA 2.4	Rotas do catabolismo da lisina em <i>Streptomyces</i> spp. Enzimas envolvidas nas rotas: (1) lisina descarboxilase, (2) cadaverina aminotransferase, (3) 1-piperidina desidrogenase, (4) lisina ε-aminotransferase (LAT), (5) 1-piperidina-6-carboxilato desidrogenase; a linha tracejada representa uma rota intermediária hipotética (MADDURI et al., 1989).	12
FIGURA 4.1	Aminograma obtido a partir de análise do <i>pool</i> de aminoácidos padrão com coluna de troca iônica e derivatização pós-coluna (OPA) acoplado a um detector de fluorescência (<i>exc</i> : 350 nm e <i>emss</i> : 450 nm).	27
FIGURA 4.2	Procedimento utilizado para as pré-culturas de todas as fermentações	29
FIGURA 4.3	Procedimento utilizado na suplementação da fermentação principal com compostos integrantes da rota biossintética de CefC.	29
FIGURA 4.4	Procedimento utilizado na suplementação da fermentação principal com diferentes fontes de carbono..	30
FIGURA 4.5	Procedimentos utilizados nas suplementações da fermentação principal com amido e diferentes concentrações de L-lisina.	31

FIGURA 5.1.	Resultados de biomassa obtidos em cultivo de <i>S. clavuligerus</i> em batelada, em meios contendo glicerol e/ou amido. Meios: P1 – amido + glicerol; P2 – glicerol; P3 – amido	34
FIGURA 5.2	Resultados de cefalosporinas totais obtidos em cultivo de <i>S. clavuligerus</i> em batelada, em meios contendo glicerol e/ou amido. Meios: P1 – amido + glicerol; P2 – glicerol; P3 – amido.	35
FIGURA 5.3	Resultados da biomassa obtidos em cultivo de <i>S. clavuligerus</i> em meio suplementado com compostos integrantes da rota biossintética de CefC. Condições: A0 (controle) - sem suplementação; Suplementações: A1 – L-lisina a 6,1 g/L; A2 – Succinato de sódio a 9,0 g/L; A3 – Ácido aspártico a 4,43 g/L; A4 – L-lisina a 6,1 g/L e Succinato de Sódio a 9,0 g/L; A5 – L-lisina a 6,1 g/L e Ácido aspártico a 4,43 g/L.	36
FIGURA 5.4	Resultados de cefalosporinas totais obtidos em cultivo de <i>S. clavuligerus</i> em meio suplementado com compostos integrantes da rota biossintética de CefC. Condições: A0 (controle) - sem suplementação; Suplementações: A1 – L-lisina a 6,1 g/L; A2 – Succinato de sódio a 9,0 g/L; A3 – Ácido aspártico a 4,43 g/L; A4 – L-lisina a 6,1 g/L e Succinato de Sódio a 9,0 g/L A5 – L-lisina a 6,1 g/L e Ácido aspártico a 4,43 g/L.	36
FIGURA 5.5	Resultados de biomassa de cultivo de <i>S. clavuligerus</i> em meios suplementados com diferentes fontes de carbono: Meio B1: amido (10 g/L); Meio B2: amido (8 g/L) + maltose (2 g/L); Meio B3: Amido (8 g/L) + Succinato de Sódio (4,5g/L); Meio B4: TSB (Tryptic Soy Broth da Difco).	38
FIGURA 5.6	Resultados de cefalosporinas totais de cultivo de <i>S. clavuligerus</i> em meios suplementados com diferentes fontes de carbono: Meio B1: amido (10 g/L); Meio B2: amido (8 g/L) + maltose (2 g/L); Meio B3: Amido (8 g/L) + Succinato de Sódio (4,5g/L); Meio B4: TSB (Tryptic Soy Broth da Difco), adicionado de amido.	39
FIGURA 5.7	Biomassa obtida nos meios de cultivo de <i>S. clavuligerus</i> utilizados para a seleção do meio padrão de produção de CefC	40

FIGURA 5.8	Consumo de amido nos meios de cultivo de <i>S. clavuligerus</i> utilizados para a seleção do meio padrão de produção de CefC	41
FIGURA 5.9	Atividade das enzimas L-lisina ϵ -aminotransferase (LAT) e Cadaverina aminotransferase (CAT) obtida a partir de amostras coletadas durante cultivo de <i>S. clavuligerus</i> em meio padrão de produção de CefC contendo amido como principal fonte de carbono e energia e Proflo como principal fonte de nitrogênio (Tabela 4.13)	42
FIGURA 5.10	Resultados de cefalosporinas totais obtidos em cultivo de <i>S. clavuligerus</i> em meio padrão de produção de CefC contendo amido como principal fonte de carbono e energia e Proflo como principal fonte de nitrogênio (Tabela 4.13)	43
FIGURA 5.11	Resultados de biomassa obtidos em cultivo em batelada de <i>S. clavuligerus</i> em meio padrão (Tabela 4.13) sem complementação (condição controle) e complementado com: condições - C1 a C5: α -cetoglutarato (10 mM) e L-lisina (condições C1 e C1B: 10 mM; C2: 25 mM; C3: 50 mM; C4: 100 mM; C5: 150 mM).	44
FIGURA 5.12	Resultados de cefalosporinas totais obtidos em cultivo em batelada de <i>S. clavuligerus</i> em meio padrão (Tabela 4.13) sem complementação (condição Controle) e complementado com: Condições C1 a C5: α -cetoglutarato (10 mM) e L-lisina (condições C1 e C1B: 10 mM; C2: 25 mM; C3: 50 mM; C4: 100 mM; C5: 150 mM).	45
FIGURA 5.13	Atividade das enzimas LAT e CAT obtida em 24 horas de cultivo em batelada de <i>S. clavuligerus</i> em meio padrão (Tabela 4.13) complementado com: Condições - C1 a C5: α -cetoglutarato (10 mM) e L-lisina (C1 e C1B: 10 mM; C2: 25 mM; C3: 50 mM; C4: 100 mM; C5: 150 mM)	46
FIGURA 5.14	Resultados de biomassa obtidos em cultivo de <i>S. clavuligerus</i> em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação de amido (6 g/L) após 48 horas de processo e de diferentes concentrações de L-lisina, após 72 horas. Condição controle: sem suplementação; Condições de suplementação de L-lisina: indicadas no gráfico.	47

- FIGURA 5.15** Resultados de amido residual obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação de amido (6 g/L) após 48 horas de processo e de diferentes concentrações de L-lisina, após 72 horas. Condição controle: sem suplementação; Condições de suplementação de L-lisina: indicadas no gráfico. 48
- FIGURA 5.16** Resultados de cefalosporinas totais obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação de amido (6 g/L) após 48 horas de processo e de diferentes concentrações de L-lisina, após 72 horas. Condição controle: sem suplementação; Condições de suplementação de L-lisina: indicadas no gráfico. 49
- FIGURA 5.17** Resultados de L-lisina residual obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação de amido (6 g/L) após 48 horas de processo e de diferentes concentrações de L-lisina, após 72 horas. Condição controle: sem suplementação; Condições de suplementação de L-lisina: indicadas no gráfico. 49
- FIGURA 5.18** Resultados de biomassa obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação e de 10 mM de L-lisina (concentração final no frasco), após 72 horas de processo. Controle: sem suplementação de lisina 50
- FIGURA 5.19** Resultados de cefalosporinas totais obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação de amido (6 g/L) após 48 horas e de 10 mM de L-lisina (concentração final no frasco), após 72 horas de processo. Controle: sem suplementação de L-lisina. 51
- FIGURA 5.20** Resultados de atividade de LAT e CAT obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação de amido (6 g/L) após 48 horas e de 10 mM de L-lisina (concentração final no frasco), após 72 horas de processo. Controle: sem suplementação de L-lisina 52

FIGURA 5.21 Resultados do consumo de L-lisina obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação de amido (6 g/L) após 48 horas e de 10 mM de L-lisina (concentração final no frasco) após 72 horas de processo. Controle: sem suplementação de L-lisina.

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

TABELA 4.1	Meio agar nutriente de cultivo de linhagens de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumonia</i>	17
TABELA 4.2	Meio de esporulação de <i>S. clavuligerus</i> (SÁNCHEZ e BRAÑA, 1996).	18
TABELA 4.3	Meio de germinação de esporos ou reativação de micélios congelados de <i>S. clavuligerus</i> indicado pela ATCC (meio ISP1) adicionado de extrato de malte (KIESER et al 2000).	18
TABELA 4.4	Meios de preparo de inóculo	19
TABELA 4.5	Meios de fermentação contendo glicerol e/ou amido.	19
TABELA 4.6	Meio para preparo do inóculo principal	20
TABELA 4.7	Meio de produção para o cultivo de <i>S. clavuligerus</i> .	20
TABELA 4.8	Meios de suplementação do meio de produção	21
TABELA 4.9	Meios de produção contendo diferentes fontes de carbono	21
TABELA 4.10	Meios suplementares dos meios de produção	21
TABELA 4.11	Meio de preparo do inóculo principal da seleção do meio padrão de produção	22
TABELA 4.12	Meios testados para a seleção do meio padrão de produção	22
TABELA 4.13	Meio padrão de produção de CefC	23
TABELA 4.14	Meio padrão de produção adicionado de α -cetoglutarato e diferentes concentrações de L-lisina	23
TABELA 4.15	Meios suplementares contendo amido e diferentes concentrações de L-lisina.	24
TABELA 5.1	Valores de pH obtidos durante o cultivo de <i>S. clavuligerus</i> em meios suplementados com diferentes fontes de carbono: Meio B1: amido (10 g/L); Meio B2: amido (8 g/L) + maltose (2 g/L); Meio B3: Amido (8 g/L) + Succinato de Sódio (4,5g/L); Meio B4: TSB (Tryptic Soy Broth da Difco).	38

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAA. – Ácido L-alfa-aminoadípico
LAT. – lisina ϵ -aminotransferase
ccaR – cephamycin and clavulanic acid Regulator
CefC – Cefamicina C
AC – Ácido clavulânico
CPC – Cefalosporina C
DO – Oxigênio dissolvido
MOPS– ácido 3-[N-Morpholino]-propanosulfônico
NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
CAT – cadaverina aminotransferase
Proflo – Extrato protéico de semente de algodão
TSB – Tryptic Soy Broth
ART – Açúcares redutores totais
DNS – Ácido 3-5-dinitrosalicílico
OPA– *orto*-phtalaldeído
MFP– Meio de fermentação principal
MS – Meio suplementar
UFC– Unidade formadora de colônia

RESUMO

Muitos compostos beta-lactâmicos são sintetizados por bactérias do gênero *Streptomyces*. As cefalosporinas, entre elas a cefamicina C (CefC) são apenas alguns exemplos de antibióticos sintetizados por *Streptomyces clavuligerus*. Os antibióticos beta-lactâmicos são formados, em procariotos e eucariotos, a partir de três aminoácidos, o ácido L-alfa-aminoadípico (AAA), a L-cisteína e a L-valina. Em procariotos, o AAA é formado por desaminação da L-lisina pela enzima lisina ϵ -aminotransferase (LAT). A L-lisina exerce um papel fundamental na síntese destes compostos atuando como indutora da LAT, a primeira enzima da rota biossintética de CefC. Desta forma, uma variação adequada na concentração de lisina no meio de produção deve proporcionar melhorias na produção da CefC. Além da lisina, as fontes de carbono e nitrogênio também exercem fundamental importância, uma vez que participam de vários mecanismos reguladores, tanto do metabolismo primário como do secundário, durante o processo fermentativo. O presente trabalho teve como objetivo investigar a influência da presença e concentração de fontes de carbono, de L-lisina e de compostos relacionados à rota biossintética de antibióticos beta-lactâmicos em *S. clavuligerus* ATCC 27064, com ênfase no aumento da produção de CefC. Foram realizadas fermentações variando-se a natureza e a concentração de determinados compostos no meio de produção (fontes de carbono, de nitrogênio, etc) e, também, as condições de suplementação de L-lisina e outros compostos ao longo do processo. Com relação à fonte de carbono e energia (substrato limitante), os resultados demonstraram que o amido propiciou a maior produção de cefalosporinas totais, enquanto o glicerol foi mais adequado ao crescimento celular. Os resultados permitiram obter um meio padrão adequado para a produção de cefalosporinas, contendo amido e extrato de semente de algodão como principais fontes de carbono e energia e de nitrogênio, respectivamente, adicionado de 100 mM de L-lisina no início da fermentação. Este meio resultou em aumentos de 140 a 312% na produção de cefalosporinas totais, relativamente aos demais meios e condições testados. Através da suplementação do meio padrão com L-lisina, verificou-se a reincidência de picos de atividade da LAT durante a fase estacionária de crescimento. No presente trabalho, esta reincidência não refletiu em maior produção mas cabe aqui sugerir que, otimizando-se as condições de suplementação, é possível prolongar a atividade da LAT e, assim, obter maiores concentrações de antibiótico.

Palavras-chave: antibióticos beta-lactâmicos, *Streptomyces clavuligerus*, cefamicina C, meios de cultura, L-lisina, lisina ϵ -aminotransferase.

ABSTRACT

Many beta-lactamic compounds are synthesized by bacteria from the *Streptomyces* ssp. The cephalosporins and among them the cephamycin C (CefC) are some examples of antibiotics synthesized by *Streptomyces clavuligerus*. The beta-lactam antibiotics are formed, both in eukaryote and prokaryote, by three amino acids, the L- α -aminoadipic acid (AAA), the L-cysteine and the L-valine. In prokaryote the AAA is formed by desamination of the L-lysine by the lysine ϵ -aminotransferase (LAT) enzyme. The L-lysine plays a fundamental role in the synthesis of these compounds acting as an inductor of the LAT, the first enzyme in the biosynthetic route of the CefC. Therefore, an adjusted variation on the lysine concentration in the production medium should provide improvement in the production of CefC. Besides lysine, the carbon and nitrogen sources also exert a crucial importance, once they are part of many regulating mechanisms from primary and secondary metabolism during fermentation. The objective in this paper is to investigate the influence of the presence and concentration of sources of carbon, L-lysine and composites related to the beta-lactam antibiotics biosynthetic route in *S. clavuligerus* ATCC 27064, with emphasis in the increase of the CefC production. Fermentation had been carried through varying the nature and concentration of certain composites in the production environment (sources of carbon, nitrogen, etc) and also the lysine and other compounds supplementation conditions along with the process. In relation to the sources of carbon and energy (limiting substrate), the results show that starch provides a higher production of total cephalosporins while glycerol has been more appropriate to cellular growth. The results allowed obtaining an appropriate standard medium to develop cephalosporins, containing starch and cotton seed extract as main sources of carbon and energy and nitrogen, respectively, adding 100mM of L-lysine in the beginning of the fermentation. This medium resulted in increases of 140 to 312% in the production of total cephalosporins, relatively to the previous medium and conditions tested. Through the supplementation of the standard medium with L-lysine, has been verified the relapse of LAT activity peaks during the stationary growth phase. On this paper, this relapse did not cause a higher production, but it is pertinent to suggest that, optimizing the supplementation conditions, it is possible to elongate the LAT activity and, therefore, achieve higher concentrations of the antibiotic.

Key-words: beta-lactam antibiotics, *Streptomyces clavuligerus*, cephamycin C, culture medium, L-lysine, lysine ϵ -aminotransferase.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O termo Biotecnologia foi empregado pela primeira vez no início dos anos 60 e surgiu da junção de duas outras palavras: biologia e tecnologia. A Biotecnologia apresenta uma visão global da ciência e, sendo interdisciplinar, seu notável desenvolvimento foi, sem dúvida, o resultado das contribuições de outras áreas, entre elas a genética, a microbiologia, a bioquímica, a biologia molecular, entre outras. Uma das áreas da Biotecnologia que tem se desenvolvido de maneira mais proeminente relaciona-se aos processos fermentativos, como a produção de antibióticos.

A partir de 1928, com a descoberta da penicilina, muitos tipos de antibióticos foram desenvolvidos no mundo. Na década de 40, durante a Segunda Guerra Mundial, os antibióticos passaram a integrar os processos industriais fermentativos, principalmente nos Estados Unidos, baseando-se inicialmente na síntese da penicilina, e posteriormente, da espstreptomicina. Com o passar dos anos, a produtividade e rendimentos desses antibióticos têm crescido de maneira surpreendente, principalmente por meio de melhoramentos em linhagens de microrganismos e processos. Nas últimas duas décadas, as vias biossintéticas, as enzimas envolvidas e as estruturas genéticas associadas têm sido elucidadas em muitos microrganismos produtores.

Grande parte das importantes drogas farmacêuticas produzidas industrialmente, incluindo os antibióticos, são produtos do metabolismo secundário de microrganismos e plantas. A maioria dos metabólitos secundários é sintetizada com baixos rendimentos e produtividade. Para aumentar essa produtividade, é necessário decifrar o mecanismo regulatório que controla a biossíntese destes metabólitos, ou seja, entender os fatores que regulam o fluxo do metabolismo primário (crescimento celular) para o metabolismo secundário. Por exemplo, um produto final ou intermediário de uma via primária freqüentemente serve como um precursor de outro produto ou via. Em Bioquímica, precursores e cofatores constituem a junção entre esses metabolismos. Estes podem ser regulados em níveis diferentes, sendo alguns deles os produtos, enzimas, cofatores e precursores de uma via específica de um particular metabólito secundário. Entender o controle regulatório de uma via biossintética pode gerar uma base para desenvolver modificações genéticas em microrganismos a fim de aumentar a produção dos metabólitos secundários.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Antibióticos beta-lactâmicos

Até o início da década de 70, as várias gerações de antibióticos beta-lactâmicos semi-sintéticos eram obtidas a partir de transformações químicas de penicilina e cefalosporinas naturais sintetizadas somente por fungos filamentosos. A partir do início da década de 70 foram sendo descobertas várias outras classes de compostos beta-lactâmicos naturais sintetizados por bactérias, principalmente actinomicetos do gênero *Streptomyces*. Enquanto fungos filamentosos produzem somente antibióticos beta-lactâmicos com estruturas análogas às de penicilina e cefalosporinas, bactérias sintetizam uma variedade de estruturas beta-lactâmicas como cefalosporinas, cefamicinas, cefabacinas, carbapenemas, monobactams e clavas.

Os antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas) são produzidos, tanto por eucariotos como por procariotos a partir de três aminoácidos, o ácido L-alfa-aminoadípico (AAA), a L-cisteína e a L-valina. Enquanto em eucariotos o AAA é um intermediário na rota biossintética da lisina, em procariotos a lisina é precursora do AAA, e é formado a partir da desaminação da lisina pela enzima lisina ϵ -aminotransferase (LAT). Essa enzima é regulada pelo elemento multifuncional *ccaR* (de "cephamycin and clavulanic acid Regulator"), codificado pelo gene *ccaR* presente no *cluster* de genes da síntese de cefamicina C (CefC) e regulador das sínteses de ácido clavulânico (AC) e CefC em *Streptomyces clavuligerus* (ALEXANDER e JENSEN, 1998; JENSEN et al., 2000; BIGNELL et al., 2005) (Rotas apresentadas no item 2.5., Figuras 2.2 e 2.3).

A atividade antibacteriana dos compostos beta-lactâmicos consiste na sua habilidade de se ligar a um receptor protéico do microrganismo e inibir a síntese de sua parede celular. A estrutura beta-lactâmica inibe a atividade das enzimas transpeptidases e carboxipeptidases, envolvidas na biossíntese do peptidoglicano da parede celular. Esta inibição resulta na inativação da infecção da célula pela bactéria (OMSTEAD et al, 1985; ESSACK, 2001).

2.2 - *Streptomyces clavuligerus*

O gênero *Streptomyces* consiste de microrganismos aeróbios, quimiorganotróficos gram positivos, formadores de hifas vegetativas (0,5 – 2,0 μm de diâmetro) e micélio aéreo. Seus representantes degradam caseína, amido e L-tirosina entre outros, usando grande variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. A temperatura

ótima para seu cultivo está entre 25 e 35°C e seu pH varia entre 6,5 e 8,0. Apresentam grande distribuição no solo e poucas espécies são patogênicas para animais e humanos. Algumas linhagens produzem antibióticos, como por exemplo, a espécie *S. clavuligerus*.

A espécie *S. clavuligerus* produz vários compostos beta-lactâmicos, com destaque para os antibióticos intermediários da rota biossintéticas da cefalosporina C (penicilina N, deacetoxicefalosporina C, deacetylcefalosporina C), CefC e para o AC que, embora não tenha atividade biológica significativa, é um potente inibidor de beta-lactamases (PRUES e KELLETT, 1983; BRUDTLAND, 2000). As estruturas de AC, penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas são apresentadas na Figura 2.1.

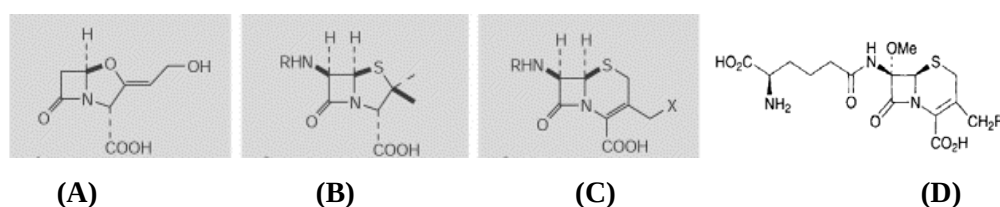


Figura 2.1 - Estrutura molecular de (A) ácido clavulânico, (B) penicilinas, (C) cefalosporinas e (D) cefamicinas (na CefC, o radical R = OCONH₂) (BAGGALEY et al., 1997; TOWNSEND, 2002).

2.3 - Cefamicina C

A cefamicina C foi a primeira da família das cefamicinas a ser isolada. Ela é produzida por *Nocardia lactamdurans*, *S. clavuligerus*, e por muitos outros actinomicetos. É um antibiótico beta-lactâmico produzido por *S. clavuligerus* em meio quimicamente definido na presença de fontes variadas de carbono, nitrogênio e fósforo (AHARONOWITZ e DEMAINE, 1977, 1978, 1979). A concentração destes compostos tem uma importante influência na relação entre a biomassa e a produção de CefC. É uma 7-metoxicefalosporina que apresenta maior atividade que a cefalosporina C (CPC) por ser resistente a beta-lactamases (LIRAS, 1999; BRAKHAGE et al, 2005).

2.4. – Componentes de meio para a produção de beta-lactâmicos por *S. clavuligerus*

A biossíntese de CefC em culturas de *S. clavuligerus* é influenciada por fontes de carbono, energia e nitrogênio (MADDURI et al, 1989). Uma formulação adequada do meio da fermentação principal para o crescimento e produção de compostos beta-lactâmicos pela *S. clavuligerus* deve favorecer o processo como um todo (boa biomassa, boa produção), uma vez que os cultivos microbianos em meios sintéticos para a obtenção

de metabólitos secundários são normalmente caracterizados pela dissociação relativa das fases de crescimento celular (trofofase) e de síntese de produto (idiofase). Normalmente, convém utilizar os mesmos componentes essenciais nos meios de preparo de inóculo e da fermentação principal, de forma a minimizar a duração da fase lag.

Estudos com fermentadores em pequena escala têm relevado a importância do controle das taxas de aeração e pH para aumentar a produtividade, em vista de várias enzimas envolvidas na biossíntese de CefC necessitarem de boa oxigenação. Em fermentações sem controle de oxigênio dissolvido (DO), ou com a DO controlada em 50%, a penicilina N, intermediária da rota de biossíntese da CefC, é acumulada rapidamente durante o crescimento e continua constante até o final do período de produção, impedindo a formação do antibiótico como produto final (ROLLINS et al, 1988).

A forte influência das fontes de carbono na produção de antibióticos tem sido estudada e descrita por vários grupos de pesquisa (LEBRIHI et al, 1988; ROMERO et al, 1984). *Streptomyces clavuligerus* não é capaz de consumir a glicose, e a sua utilização por outros microrganismos para produção de cefalosporinas não é recomendável por ser uma fonte de carbono facilmente assimilável pelos microrganismos. *Cephalosporium acremonium* crescendo na presença de altas taxas de glicose mostrou um aumento no acúmulo de penicilina N, intermediário da rota de síntese, reduzindo claramente sua conversão em CPC (ZANCA e MARTIN, 1983), devido à repressão da enzima responsável por essa conversão, a expandase (BEHMER e DEMAINE, 1983). O crescimento a *S. clavuligerus* na presença de fontes de carbono facilmente assimiláveis poderia causar um acúmulo de intermediários fosforilados da via da glicólise, inibindo assim a atividade da expandase (LEBRIHI et al, 1988).

A ótima taxa de síntese de CefC é obtida com concentrações de glicerol numa faixa entre 55 e 110 mM. No entanto, a produção de CefC também ocorre na ausência de glicerol, sugerindo que os aminoácidos precursores da biossíntese da CefC são formados a partir de outras fontes de carbono existentes no meio. O glicerol (até 110 mM) estimula a produção de CefC, já em concentrações acima de 110 mM ele exerce um pequeno efeito inibitório na biossíntese de CefC, como já foi descrito por Aharonowitz e Demain (1978). Esses mesmos autores testaram ácidos orgânicos como fontes de carbono. O succinato, o α -cetoglutarato e o fumarato de sódio apresentaram algum aumento na produção. Utilizaram também a maltose em comparação ao amido como substrato, sendo este último o mais favorável à produção de cefalosporinas. Quando *S. clavuligerus* foi cultivada em meio contendo ácidos orgânicos, como por exemplo o succinato, o qual é relativamente

pobre como fonte de carbono, foram criadas condições limitantes ao uso deste e, portanto, favoráveis à síntese do produto. A produção assemelhou-se ao meio contendo amido, ou seja, a produção específica foi alta e associada ao crescimento (AHARONOWITZ e DEMAINE, 1978).

Fontes orgânicas de nitrogênio (aminoácidos, extratos protéicos) são mais adequadas ao desenvolvimento celular do que fontes inorgânicas de nitrogênio (sais de amônio) (KIESER et al., 2000; TROVATTI et al., 2006). Experimentos preliminares mostraram que o amônio foi uma fonte de nitrogênio pobre para a produção de cefalosporinas (AHARONOWITZ e DEMAINE, 1978). Muitos aminoácidos podem servir de fonte de nitrogênio na presença de glicerol a 1% para o crescimento de *S. clavuligerus*. Porém, pelo nível de biomassa, em muitos casos, fica evidente que os aminoácidos não foram usados apenas como fonte de nitrogênio, mas também como fonte de carbono (AHARONOWITZ e DEMAINE, 1978).

Apesar de análises de parâmetros da fermentação em algumas culturas sugerirem que a diminuição da atividade específica da LAT deve ser associada com a exaustão de fontes de nitrogênio, essa correlação não se estende para todos os meios de cultura (MADDURI et al, 1989). A adição da lisina como fonte de nitrogênio nas culturas de *S. clavuligerus* que apresentam crescimento em meios quimicamente definidos aumenta a produção específica em 75% (MENDELOWITZ e AHARONOWITZ, 1982). Esse aumento significativo deve-se à conversão da lisina em AAA, um precursor direto de cefalosporinas, incluindo a CefC.

O sulfato e o tiosulfato (a 0,5 e 4 mM cada) são eficientemente utilizados para biossíntese de CefC. O tiosulfato, conhecido por ser eficientemente incorporado à CefC (MERCK CO, 1975), quando em concentrações milimolares, apresenta taxas melhores que o sulfato. O ácido sulfônico residual do tampão biológico MOPS (ácido 3-[N-Morpholino]-propanosulfônico) pode ser usado sozinho como fonte de enxofre para biossíntese de CefC; o tiosulfato de sódio deve ser adicionado no meio de cultura 30 horas após o início do processo fermentativo principal, uma vez que interfere no metabolismo celular e também estimula a produção de CefC (MERCK CO, 1975, OMSTEAD et al, 1985).

Fosfatos inorgânicos, dependendo da concentração, exercem um efeito inibitório na biossíntese do AC, porém, segundo Aharonowitz e Demain (1977), a biossíntese da CefC mostra-se pouco sensível à regulação do fosfato, uma vez que este reprime a biossíntese de enzimas (cefamicina sintetase e expandase) envolvidas em sua rota biossintética. A atividade específica de cefamicina sintetase é máxima com a concentração de fosfato em torno de 10 mM, enquanto que a atividade específica da expandase é máxima com apenas

1 mM de fosfato. A correlação existente entre a atividade específica das enzimas é estabelecida com concentrações de fosfato superiores a 10 mM. e mostra que a expandase é uma importante enzima no mecanismo pelo qual a concentração de fosfato afeta a biossíntese da CefC. (LEBRIHI et al. 1987). Este mesmo autor mostrou que um aumento na concentração de fosfato no meio de fermentação provocou uma queda na biossíntese da CefC. Nesse caso, não se obtém a completa dissociação da formação de CefC e AC devido ao fato de que a inibição da síntese deste último pelo fosfato ocorrer somente em meios com limitação de enxofre e não em meios suplementados com ele (a suplementação de enxofre é requisito para a biossíntese da CefC) (ROMERO et al, 1984).

2.5 - Rota biossintética

Os compostos intermediários das vias biossintéticas da cefalosporina e cefamicina são muito bem conhecidos, mas apenas recentemente as reações enzimáticas envolvidas têm sido estudadas (LEBRIHI et al, 1988).

As rotas biossintéticas de AC e CefC são totalmente distintas, apresentando precursores diferentes (Figuras 2.2 e 2.3) (FANG et al., 1996; PÉREZ-LLARENA et al., 1997; LIRAS, 1999; BIGNELL et al., 2005).

Em fungos como *Penicillium chrysogenum* e *Cephalosporium acremonium*, a produção de penicilinas e cefalosporinas é inibida pela lisina, mas em procariotos, como *Streptomyces*, a produção é estimulada. A presença de lisina no meio de cultivo de *S. clavuligerus* é um fator-chave para a produção de CefC, dissociando-a da síntese de AC, cujo precursor é a arginina. Em fungos produtores de beta-lactâmicos, o AAA é um intermediário na via biossintética da lisina. Nesse caso, a inibição por retroalimentação da primeira enzima da rota, a homocitrato sintase, interrompe o fluxo através desta via e inibe a formação do AAA (FANG et al, 1996). Em procariotos, o AAA formado a partir da L-lisina, a L-cisteína e a L-valina constitui o tripeptídeo precursor da CefC (Figura 2.3).

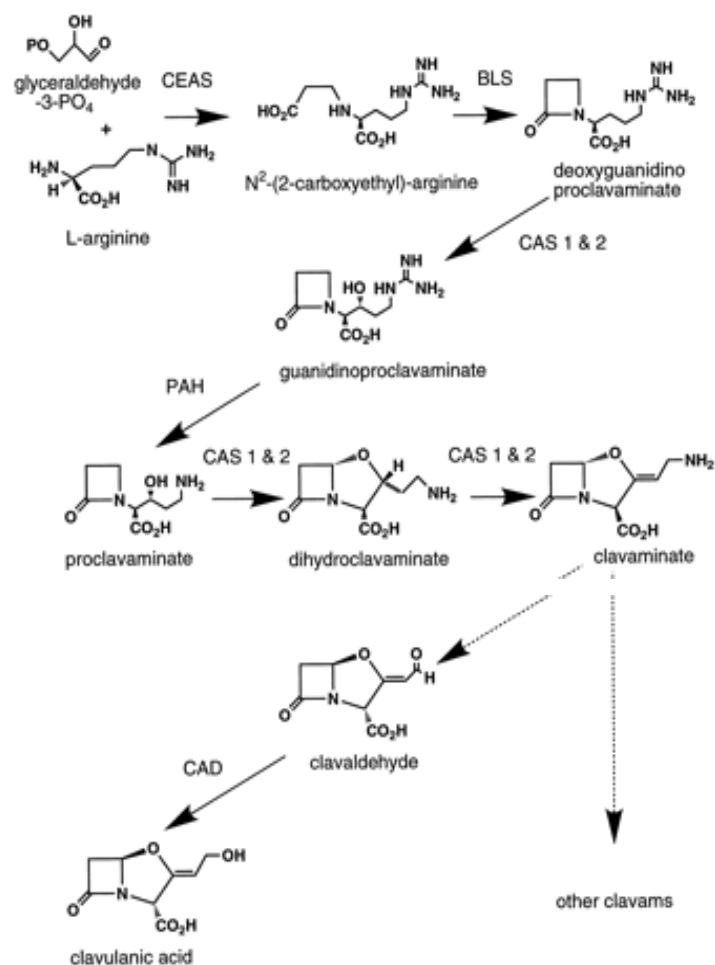


Figura 2.2 - Rota biossintética de formação de ácido clavulânico (AC) e outros clavams em *S. clavuligerus*; nomenclatura: CEAS – N-carboxiacetilarginina sintase, BLS – beta-lactam sintetase, PAH – proclavaminato amidinohidrolase, CAS – clavaminato sintase, CAD – clavaldeído desidrogenase (JENSEN et al., 2000).

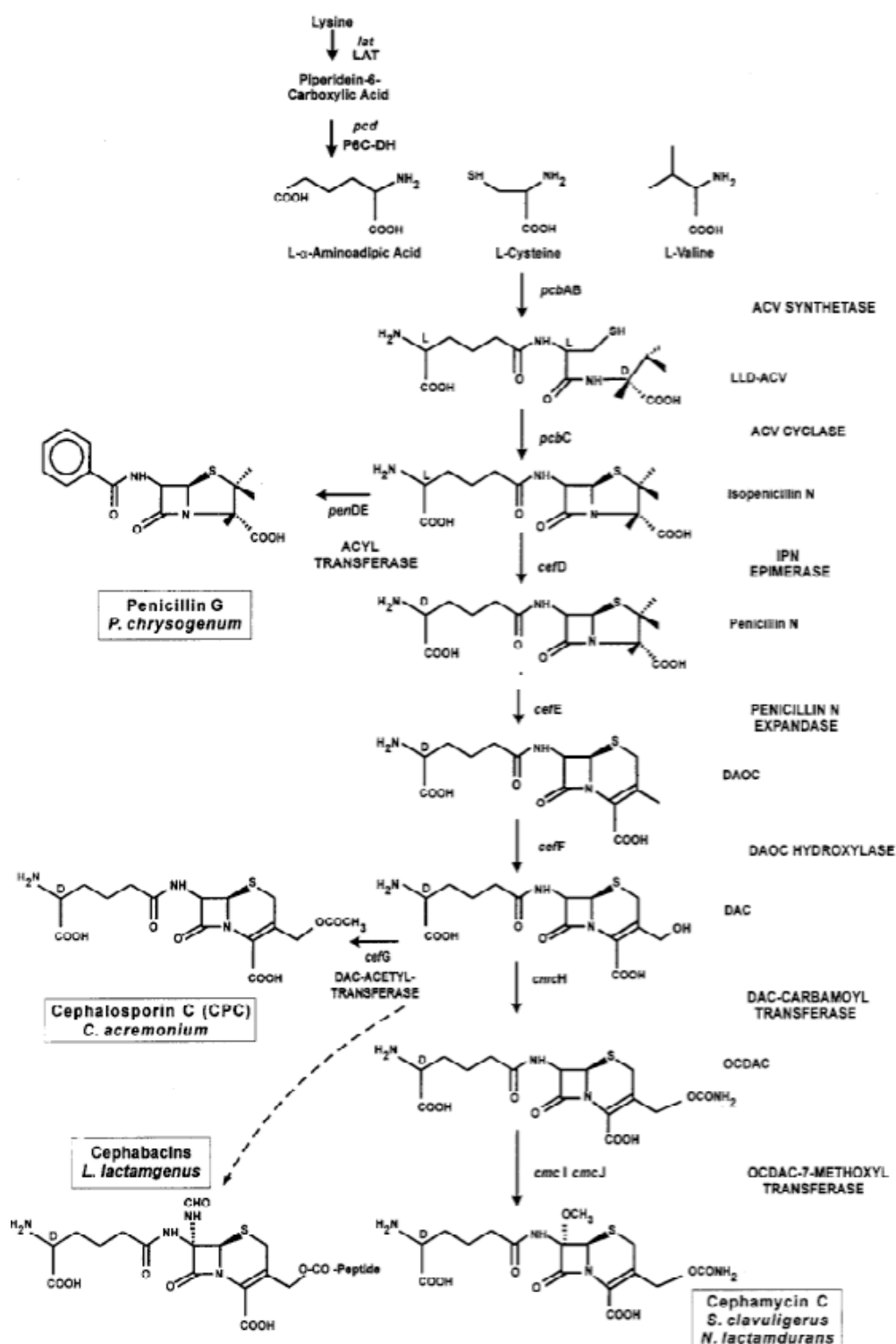


Figura 2.3 – Rota biossintética de CefC ou cefabacina em *S. clavuligerus*, *Nocardia lactamdurans* e *Lysobacter lactamdurans* (DAOC=deacetoxicefalosporina C, DAC=deacetilcefalosporina C) (LIRAS, 1999).

Desta forma, uma variação adequada na concentração de lisina deve conduzir a melhorias na produção da CefC (PÉREZ-LLARENA et al., 1997; BIGNELL et al., 2005). O estímulo da produção de antibióticos beta-lactâmicos em *S. clavuligerus* por meio da adição de lisina foi demonstrado primeiramente por Mendelovitz e Aharonowitz (1982). Esses autores adicionaram 10 e 20 mM de lisina ao meio para estimular a biossíntese de antibióticos, e conseguiram aumentos no rendimento de produto de 50 a 100%. Rius et al. (1996) sugerem que a L-lisina induz o aumento da produção de antibiótico atuando de duas maneiras sobre a LAT, como substrato e como indutora da enzima. Estudos genéticos também foram desenvolvidos nessa área. Uma linhagem recombinante de *S. clavuligerus* (LHM100) que contém uma cópia do gene que codifica a LAT (*lat*) foi analisada e comparada com a linhagem selvagem em suas concentrações intracelulares de metabólitos primários envolvidos na biossíntese de CefC. Esta linhagem apresentou um nível maior na produção do antibiótico em consequência do aumento no nível da LAT, cerca de 2 a 5 vezes maior que a selvagem, sugerindo que a LAT seja a enzima limitante na produção do AAA e apenas uma entre outras enzimas importantes na biossíntese da CefC (MALMBERG et al, 1995).

Uma vez que a LAT está envolvida com a desaminação da lisina, fica evidente que ao se alterar sua atividade, o nível intracelular do AAA e de outros aminoácidos deveriam ser alterados. Porém, Malmberg et al (1995) observaram em seus experimentos com uma linhagem recombinante contendo uma cópia adicional para o gene *lat*, que o aumento da atividade da LAT originou um aumento no nível intracelular de AAA, porém os níveis de cisteína e valina permaneceram inalterados.

Streptomyces sp pode metabolizar a lisina por meio de duas rotas diferentes: via cadaverina, obrigatória no metabolismo primário de todas as espécies, e via AAA, que ocorre somente em espécies produtoras de antibióticos beta-lactâmicos (Figura 2.4). O AAA não pode ser metabolizado por *S. clavuligerus*, e é então incorporado à CefC (MADDURI et al., 1989). Rius et al (1996) supõem que o AAA, precursor direto das cefalosporinas, influencia positivamente a produção de antibióticos sem induzir diretamente a LAT.

Estudos relatados em Kern et al (1980) apontaram que em *Streptomyces lactamdurans*, a conversão de L-lisina em L-AAA envolve a remoção do grupo ϵ -amino, formando L- α -aminoadipico- δ -semialdeído. Em solução, este semialdeído se apresenta intramolecularmente na forma desidratada de L-piperideína-6-carboxilato. O passo seguinte é mediado pela L-piperideína-6-carboxiato-deidrogenase, que converte o L-piperideína-6-

carboxilato em AAA utilizando NAD como cofator. Subsequentemente, o anel lateral de L-AAA dos antibióticos beta-lactâmicos é derivatizado pela lisina. A primeira enzima que catalisa essa conversão é a LAT. Madduri et al. (1989) verificaram a associação desta enzima com a produção de beta-lactâmicos em culturas de *S. lactandurans* e constataram que mutantes bloqueados na produção de beta-lactâmicos também não apresentavam atividade da LAT, sugerindo que a via para a biossíntese do antibiótico seja ativada pela lisina.

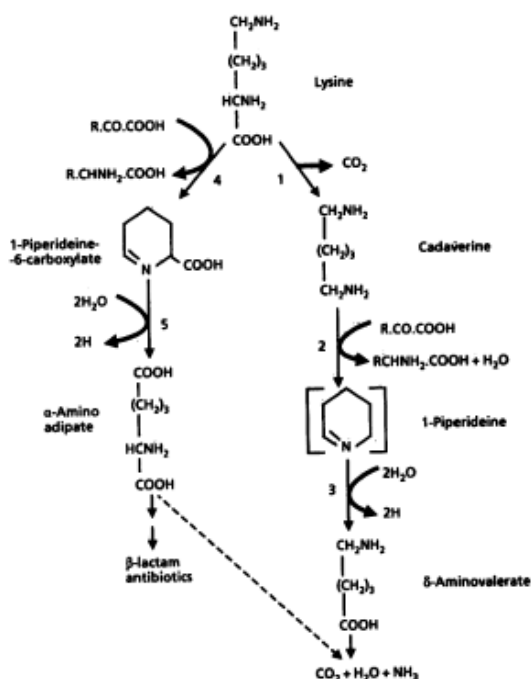


Figura 2.4 – Rotas do catabolismo da lisina em *Streptomyces* spp. Enzimas envolvidas nas rotas: (1) lisina descarboxilase, (2) cadaverina aminotransferase, (3) 1-piperidina desidrogenase, (4) lisina ϵ -aminotransferase (LAT), (5) 1-piperidina-6-carboxilato desidrogenase; a linha tracejada representa uma rota intermediária hipotética (MADDURI et al., 1989).

Madduri et al (1989), testaram 10 actinomicetos, e a LAT foi detectada em apenas 3 deles, os quais eram produtores de antibióticos beta-lactâmicos, enquanto a cadaverina aminotransferase foi encontrada em todas as cepas. Esses autores também constataram que a via para conversão da lisina em AAA está ausente em *Streptomyces lividans*, uma espécie não produtora de antibióticos beta-lactâmicos, sugerindo que esta via é a principal envolvida na produção de antibióticos. Os autores mostraram ainda que *S. lividans* é capaz de utilizar AAA somente como fonte de nitrogênio, ao contrário de *S. clavuligerus*.

LAT catalisa a primeira reação da conversão de L-lisina para AAA, precursor direto do tripeptídeo formador de CPC, incluindo CefC em *S. clavuligerus* (RIUS et al, 1996). O α -cetoglutarato é co-substrato da LAT e cofator da deacetoxicefalosporina C sintetase (expandase) e hidrolase, enzimas da rota biossintética de CefC (KHETAN et al, 1999). A adição de lisina no meio de cultura tem conduzido ao aumento na atividade da LAT, o que sugere que a conversão da lisina para AAA seja um passo limitante da biossíntese da CefC. O uso de α -cetoglutarato como fonte de carbono aumentou a produção de cefalosporinas em ensaios com frascos agitados (AHARONOWITZ e DEMAINE, 1978). Porém, lisina e α -cetoglutarato adicionados ao meio podem exercer outros efeitos fisiológicos, além de aumentarem o fluxo cofator/co-substrato, não ficando claro um efeito positivo deles na produção do antibiótico, atuando apenas como cofator e co-substrato. No entanto, trabalhos mostraram que a produtividade específica da CefC é diretamente proporcional às concentrações intracelulares de α -cetoglutarato e lisina e, também, à atividade da LAT (KHETAN et al, 1999). Estes autores verificaram, ainda, que a LAT converte a lisina em AAA usando o α -cetoglutarato como co-substrato, sugerindo que a lisina e o α -cetoglutarato são chaves importantes na regulação da biossíntese da CefC. Fang et al (1996) concordam que a transformação de lisina em AAA é uma das chaves para a produção de antibióticos beta-lactâmicos por *S. clavuligerus*.

OBJETIVO

3. OBJETIVO

Neste trabalho, propôs-se investigar a influência de compostos relacionados à rota biossintética de antibióticos beta-lactâmicos, com ênfase na L-lisina, no processo de produção de CefC por *S. clavuligerus*.

Para isso, foram realizadas as seguintes etapas:

1. Seleção de fontes de carbono e nitrogênio para compor um meio padrão apropriado ao crescimento celular e à produção de CefC.
2. Avaliação preliminar da atividade de lisina ϵ -aminotransferase e cadaverina aminotransferase no meio padrão.
3. Investigação da influência de L-lisina na produção de CefC por meio de:
 - a. adição de L-lisina ao meio de produção no início da fermentação;
 - b. suplementações de L-lisina ao meio de produção durante a fermentação.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismos

No processo de produção de compostos beta-lactâmicos foi utilizada a linhagem ATCC 27064 de *Streptomyces clavuligerus* (BUTTERWORTH, 1984), adquirida da própria ATCC na forma de células vegetativas (micélios) liofilizadas. Foram conservadas a -70°C em solução crioprotetora 20% glicerol v/v para posterior utilização nos experimentos.

Para padronizar o bioensaio de difusão em agar foram testadas várias linhagens de *Escherichia coli* (K100, K200, K12, K12 modificada proveniente do Instituto Butantan, ATCC 25922 do Instituto Adolfo Lutz, ESS 2235) e a linhagem *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665. A única que se mostrou adequada para a determinação de cefalosporinas totais, utilizando-se cefalosporina C como padrão, foi a linhagem super sensível a antibióticos beta-lactâmicos *E. coli* ESS 2235 (LIRAS e MARTIN, 2005).

4.2. Meios de cultura

4.2.1. Meio para as bactérias-teste

Para o cultivo das linhagens de *E. coli* e *K. pneumoniae*, foi utilizado o meio agar nutriente (Difco 0001), indicado pela ATCC (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Meio agar nutriente de cultivo de linhagens de *E. coli* e *K. pneumoniae*

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona	5,0
Extrato de Carne	3,0
Agar bacteriológico	15,0
pH	$6,8 \pm 0,1$

4.2.2. Meio de esporulação de *S. clavuligerus*

O meio para a obtenção de esporos do microrganismo foi o proposto por Sánchez e Braña (1996) e está descrito na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Meio de esporulação de *S. clavuligerus* (SÁNCHEZ e BRAÑA, 1996).

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

* tampão biológico

4.2.3. Meio de germinação de esporos ou reativação de micélios

O meio utilizado para reativação de micélios congelados de *S. clavuligerus* foi o indicado pela ATCC (meio ISP1) adicionado de extrato de malte (KIESER et al 2000). *S. clavuligerus* ATCC 27064 foi cultivada por 24 horas em batelada em frascos agitados a 260 rpm, 28°C, pH inicial 6,8 ± 0,1 (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Meio de germinação de esporos ou reativação de micélios congelados de *S. clavuligerus* indicado pela ATCC (meio ISP1) adicionado de extrato de malte (KIESER et al 2000).

Componentes	Quantidade (g)
Tryptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	10,0
MOPS	21,0
pH	6,8 ± 0,1
Água destilada em q.s.p.	1000 mL

4.2.4. Meios de preparo do inóculo principal e meios de produção

O meio base de preparo do inóculo principal foi baseado em Butterworth (1984), sendo a fonte de carbono e energia e a de nitrogênio variáveis, conforme o objetivo da fermentação principal.

4.2.4.1. Meios de cultivo de *S. clavuligerus* contendo amido e/ou glicérol

Tabela 4.4 – Meios de preparo de inóculo

Meio	P1	P2	P3
Componentes	Concentração (g/L)		
Amido solúvel	5,0	–	10,0
Glicérol	7,5	15,0	–
Soytone	15,0	15,0	15,0
Extrato de Levedura	1,0	1,0	1,0
Extrato de Malte	10,0	10,0	10,0
K ₂ HPO ₄	0,8	0,8	0,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75	0,75	0,75
MOPS	21,0	21,0	21,0
Solução de sais	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Tabela 4.5 – Meios de fermentação contendo glicérol e/ou amido.

Meio	P1	P2	P3
Componentes	Concentração (g/L)		
Amido solúvel	5,0	–	10,0
Glicérol	7,5	15,0	–
Soytone	10,64	10,64	10,64
Tiosulfato de sódio	1,0	1,0	1,0
L-lisina	5,3	5,3	5,3
K ₂ HPO ₄	2,0	2,0	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75	0,75	0,75
CaCl ₂	0,2	0,2	0,2
MOPS	21,0	21,0	21,0
Solução de sais	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

4.2.4.2. Meio de produção suplementado com compostos integrantes da rota biossintética de CefC

Tabela 4.6 – Meio para preparo do inóculo principal

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	15,0
Soytone	15,0
Extrato de Levedura	1,0
Extrato de Malte	10,0
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75
MOPS	21,0
Solução de sais	10,0 mL

Tabela 4.7 –Meio de produção para o cultivo de *S. clavuligerus*.

Componentes	Concentração (g/L)
Amido solúvel	8,0
Glicerol	2,0
Extrato de malte	0,5
Soytone	8,5
L-lisina	1,83
Extrato de levedura	0,5
Tiosulfato de sódio*	1,0
K ₂ HPO ₄	1,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75
CaCl ₂	0,2
MOPS	21,0
Solução de sais	5,0 mL

*adicionar após 30 h de processo

Tabela 4.8 – Meios de suplementação do meio de produção

Componentes	Meios*	A0 (controle)	A1	A2	A3	A4	A5
	Concentração (g/L)						
L-lisina	–	6,1	–	–	6,1	6,1	
Succinato de Na	–	–	9,0	–	9,0	–	
Ácido aspártico	–	–	–	4,43	–	4,43	

* preparados com água destilada e 5% de água de torneira

4.2.4.3. Meios de produção contendo diferentes fontes de carbono

Tabela 4.9 – Meios de produção contendo diferentes fontes de carbono

Componentes	Meios			
	B1	B2	B3	B4
	concentração (g/L)			
Amido solúvel	10,0	8,0	8,0	10,0
Maltose	–	2,0	–	–
Succinato de Na · 6 H ₂ O	–	–	4,5	–
Soytone	1,0	1,0	1,0	–
Caseína (hydr. ácida)	9,3	9,3	9,3	–
TSB (Tryptic Soy Broth)	–	–	–	30,0
L-lisina	1,83	1,83	1,83	–
Tiosulfato de sódio	0,2	0,2	0,2	–
Extrato de levedura	0,5	0,5	0,5	0,5
K ₂ HPO ₄	1,75	1,75	1,75	–
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75	0,75	0,75	–
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,2	0,2	0,2	–
NaCl	2,0	2,0	2,0	–
Solução de sais	5,0 mL	5,0 mL	5,0 mL	–
MOPS	21,0	21,0	21,0	–

Tabela 4.10 – Meios suplementares dos meios de produção

Componentes	Meios*		
	B1	B2	B3
	Concentração (g/L)		
Amido	19,2		
Maltose	–	19,2	–
Succinato de sódio · 6 H ₂ O	–		4,8
Tiosulfato de Na	4,2	4,2	4,2
L-lisina	4,9	4,9	4,9

* preparados em água destilada e 5% de água de torneira

4.2.4.4. Meios de cultivo testados para a obtenção de meio padrão de produção

Tabela 4.11 – Meio de preparo do inóculo principal da seleção do meio padrão de produção

Componentes	Concentração (g/L)
Amido	10,0
Soytone	15,0
Extrato de Levedura	1,0
K ₂ HPO ₄	0,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75
MOPS	21,0
Solução de sais	10,0 mL

Tabela 4.12 – Meios testados para a seleção do meio padrão de produção

Meio	1	2	3
Componentes	Concentração (g/L)		
Amido solúvel	10,0	10,0	10,0
Proflo*	-	8,5	-
Soytone	1,0	-	-
TSB	-	-	30
Extrato de Levedura	0,5	0,5	0,5
Tiosulfato de sódio	0,5	0,5	0,5
Caseína	9,3	-	-
L-lisina	1,83	1,83	-
K ₂ HPO ₄	0,875	0,875	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75	0,75	-
CaCl ₂	0,2	0,2	-
NaCl	2,0	2,0	-
MOPS	21,0	21,0	21,0
Solução de sais	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

4.2.4.5. Meio padrão de produção para a determinação da atividade de LAT e CAT

Tabela 4.13 –Meio padrão de produção de CefC

Componentes	Concentração (g/L)
Amido solúvel	10,0
Proflo	8,5
L-lisina	1,83
Tiossulfato de sódio	0,5
Extrato de levedura	0,5
K ₂ HPO ₄	1,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,2
NaCl	2,0
Solução de sais	5,0 mL
MOPS	21,0

4.2.4.6. Meio padrão de produção contendo α -cetoglutarato e diferentes concentrações de L-lisina

Tabela 4.14 – Meio padrão de produção adicionado de α -cetoglutarato e diferentes concentrações de L-lisina

	Condição Controle	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5
	Concentração (g/L)					
Amido solúvel	10	10	10	10	10	10
Proflo	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
L-lisina	1,83 (10 mM)	1,83 (10 mM)	4,58 (25mM)	9,15 (50mM)	18,30 (100mM)	27,45 (150mM)
α -cetoglutarato	–	1,46 (10 mM)	1,46 (10 mM)	1,46 (10 mM)	1,46 (10 mM)	1,46 (10 mM)
Tiossulfato de sódio	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Extrato de levedura	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
K ₂ HPO ₄	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
NaCl	2	2	2	2	2	2
Solução de sais	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
MOPS	21	21	21	21	21	21

4.2.4.7. Meios suplementares contendo amido e diferentes concentrações de L-lisina

Tabela 4.15 – Meios suplementares contendo amido e diferentes concentrações de L-lisina

Meio	Controle	Suplementar			
Concentração final no meio de fermentação					
L-lisina	–	10 mM	40 mM	70 mM	100 mM
Amido	6 g/L				
MOPS	21 g/L				

4.3. Métodos Analíticos

4.3.1. Massa Seca

O procedimento de determinação da concentração celular do caldo fermentativo consistiu de centrifugação (5000 rpm, por 10 min, 10°C) de 5 mL de amostra sob refrigeração (6°C). O sobrenadante foi armazenado em "freezer" (–20°C) para as demais análises e a massa decantada de células filtrada a vácuo através de membranas Millipore de 4,7 cm de diâmetro, porosidade 0,45 µm, previamente pesadas. O material celular foi seco a 105°C por 18–24 horas e, após resfriado em recipiente dessecador, pesado em temperatura ambiente. A biomassa foi expressa em termos de massa seca de células (g de massa seca/L de meio de cultura).

Devido à presença de pequeno teor de impurezas no meio padrão escolhido para a produção da cefalosporinas totais, tornou-se inconveniente o uso do método de filtração para a determinação da massa seca. Então, a metodologia foi modificada, lavando-se a massa celular proveniente da centrifugação (5000 rpm), duas vezes em solução salina 0,85%. O material celular seguiu o mesmo destino do método anterior e a biomassa foi expressa da mesma forma (g de massa seca de células/L de meio de cultura).

4.3.2. Concentração de Amido

A concentração de amido foi determinada através de análise de açúcares redutores totais (ART). Inicialmente procedeu-se a hidrólise ácida do amido e posteriormente a determinação de ART pelo método de DNS (ácido 3-5-dinitrosalicílico).

Para a realização da hidrólise ácida, adicionaram-se de 1 a 4 mL de amostra e 1 mL de ácido clorídrico 10 M em um tubo de ensaio. A solução resultante foi aquecida em água na temperatura de ebulição por pelo menos 30 minutos (hidrólise ácida). Após a hidrólise ácida, a solução foi esfriada em água fria e a neutralizada com 1,2 mL de solução de

hidróxido de sódio 10 M. Após a neutralização, ajustou-se o volume de solução em 10 mL com água destilada.

Para a análise de ART pelo método de DNS, inicialmente preparou-se uma solução de referência (1 mL de água destilada e 2 mL de reagente de DNS) e as soluções para determinação da concentração de ART (1 mL de solução a ser determinada ART ou padrão e 2mL de reagente de DNS). Após essa mistura, a solução resultante reagiu por 5 minutos a 100°C. Após a reação, resfriou-se a solução obtida e o volume foi ajustado em 25 mL com água destilada. A solução obtida foi misturada e determinou-se o valor da absorbância no comprimento de onda de 540 nm, utilizando a solução de referência como o branco.

A curva de calibração foi realizada utilizando glicose previamente seca em estufa a 60°C. Soluções de 0,1 a 2 g.L⁻¹ foram utilizadas para determinar a curva de calibração.

4.3.3. Determinação da atividade de LAT e CAT

No procedimento de determinação da atividade da lisina ϵ -aminotransferase (LAT) e cadaverina aminotransferase (CAT) (KERN et al, 1980; MALMBERG et al, 1995), foram coletados 10 mL de amostra em 18, 24, 30, 42 e 48 horas da fermentação principal, centrifugados a 10000 rpm, 10 min, 4°C e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas 2 vezes com solução salina 0,85%, centrifugando-se a nova suspensão a 8000 rpm, a 4°C por 10 minutos. A massa celular compactada foi ressuspensa em 20 mL de tampão fosfato 0,2M, pH 7,5. Em seguida, esta suspensão foi submetida a um sonicador, (Sonics-vibracell) por 30 pulsos de 3 segundos e intervalo de 9 segundos entre cada pulso. As células rompidas foram removidas por centrifugação a 15.000 rpm, a 2° C por 15 minutos.

O ensaio para a análise da enzima LAT foi baseada em KERN et al.(1980). A mistura incubada em banho a 30°C por 60 minutos consistiu em 1mL do extrato celular, 40 μ mol de L-lisina, 40 μ mol de α -cetogluturato, 0,15 μ mol de piridoxal 5'fosfato em um volume final de 2 mL completados com tampão fosfato 0,2M, pH 7,5. O ensaio para a análise de CAT foi baseado no método de Fothergill e Guest (1977). A mistura incubada em banho a 30°C por 60 minutos consistiu em 1mL do extrato celular, 300 μ mol de cadaverina, 25 μ mol de α -cetogluturato, 0,25 μ mol de piridoxal 5'fosfato em um volume final de 2 mL completados com tampão carbonato de sódio 0,25M, pH 10,25. Para cessar as duas reações, 0,8 mL das misturas foram adicionadas, separadamente, a 0,4 mL de ácido tricloroacético 5% em etanol absoluto. O precipitado de proteínas foi removido por centrifugação a 11.000 rpm, a 28°C por 10 minutos. A 1 mL do sobrenadante foi adicionado 1,5mL de solução 4mM de orto-aminobenzaldeído preparado em tampão

fosfato 0,2M, pH 7,5 e a mistura seguiu para banho a 37° por 60 minutos. O produto da reação foi medido em espectrofotômetro a 465 nm. A concentração de 1-piperideína-6-carboxilato formado foi determinado em mol/L, pela expressão Fothergill e Guest (1977):

$$C_{1-pip} = \frac{Abs}{\epsilon_{465} \cdot b}$$

onde

Abs = absorbância a 465 nm

ϵ_{465} = coeficiente de extinção = 2800 mol L⁻¹·cm⁻¹

b = passo óptico da cubeta de leitura = 1 cm

Este coeficiente de extinção é muito utilizado entre os pesquisadores que realizam esta análise, decorrente da dificuldade de se obter os compostos intermediários da rota biossintética, como a piperideína e a 1-piperideína-6-carboxilato, em quantidades suficientes para se realizar uma curva de calibração.

A concentração de proteínas totais no extrato celular foi determinada pelo método de LOWRY et al (1951), usando albumina bovina como padrão. As atividades das enzimas foram expressas em U/mg de proteínas totais, onde U representa o consumo de 1 µmol de substrato por µmol de produto de reação por minuto.

4.3.4. Determinação de L-lisina

As análises de L-lisina foram efetuadas pelo método da derivatização pós-coluna com *orto*-phtalaldeído (OPA) utilizando uma coluna de troca iônica em um analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A, acoplado a um detector de fluorescência Shimadzu modelo RF-10a XL ajustado com o comprimento de onda de excitação e emissão de 350 nm e 450 nm respectivamente. O sistema é periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos (Sigma), obtendo-se um valor para o tempo de saída de cada aminoácido e um fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração de aminoácidos da amostra (Figura 4.1) (PEREIRA et al, 2005).

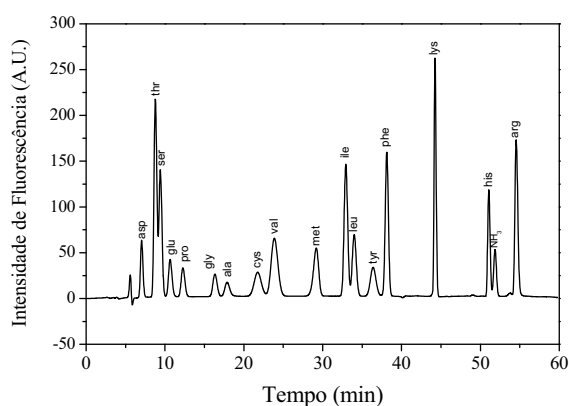


Figura 4.1 - Aminograma obtido a partir de análise do *pool* de aminoácidos padrão com coluna de troca iônica e derivatização pós-coluna (OPA) acoplado a um detector de fluorescência (*exc*: 350 nm e *emss*: 450 nm).

As amostras de caldo fermentativo foram diluídas 10 vezes em água deionizada e, em seguida, diluída 100 vezes em tampão citrato de sódio pH 2,2. Após este procedimento, as amostras diluídas foram filtradas com membrana de 0,45µm e 10 µl da solução resultante foram injetadas no analisador de aminoácidos.

4.3.5. Procedimento Experimental

4.3.5.1. Cultivos submersos

(a) Condições gerais

Todos os cultivos submersos foram realizados em frascos agitados em mesa rotatória - incubadora a 260 rpm, 28°C, e pH inicial $6,8 \pm 0,1$.

(b) Pré-culturas

- Germinação de esporos ou reativação de micélios

Frascos *erlenmeyer* de 250 mL contendo 20 mL de meio de germinação foram inoculados com suspensão de células contida criotubos (3 a 4 mL cada um) de forma a se obter 10% em volume de suspensão celular por volume final de meio.

- Preparo do inóculo principal

Frascos *erlenmeyer* de 500 mL contendo 45 mL de meio de preparo do inóculo principal foram inoculados com a suspensão de células obtida na etapa anterior, também a 10% em volume de suspensão celular por volume final, seguindo para mesa rotatória-incubadora por cerca de 24 horas.

(c) Fermentação principal

As fermentações para a produção de compostos beta-lactâmicos foram realizadas em 45 mL de meio de fermentação principal (MFP) em batelada, por um período de 72 a 144 horas. Todas as coletas foram realizadas com um intervalo de 24 horas entre elas, exceto na determinação da LAT e CAT, quando as amostras foram coletadas a cada 6 horas. O inóculo do meio de produção era obtido através de pré-culturas de 24 horas (reativação dos micélios congelados e preparo do inóculo propriamente dito). Foi adicionado em cada frasco, 10% de inóculo. A sequência de pré-culturas dos processos fermentativos e os procedimentos da fermentação principal estão esquematizados na Figura 4.2.

O teste em meios contendo glicerol e/ou consistiu de uma batelada por 144 horas. As amostras foram submetidas a análises de pH, concentração de células (biomassa) e cefalosporinas totais. A seleção do meio padrão de produção de CefC teve a duração de 96 horas, e amostras submetidas a análises de pH, concentração de células (biomassa), cefalosporinas totais e consumo de amido. O experimento para a determinação da atividade da LAT e CAT teve a duração de 48 horas, coletas a partir das 18 horas de fermentação (dentro da fase exponencial de crescimento do microrganismo, onde era obtida a biomassa suficiente para a realização das análises) e análises de pH, concentração de células, cefalosporinas totais, e atividades da LAT e CAT. A avaliação do cultivo em meio padrão adicionado de α -cetoglutarato e diferentes concentrações de L-lisina teve a duração de 72 horas e amostras submetidas a análises de pH, concentração de células, cefalosporinas totais e atividade da LAT e CAT.

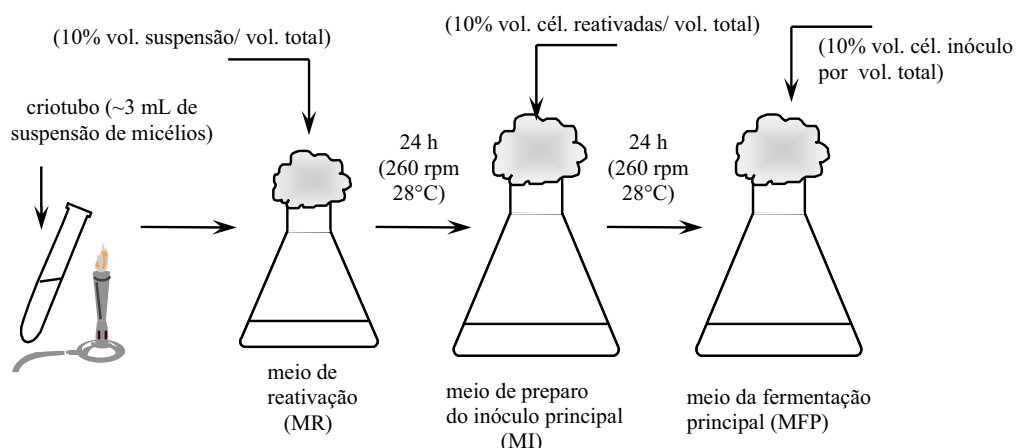
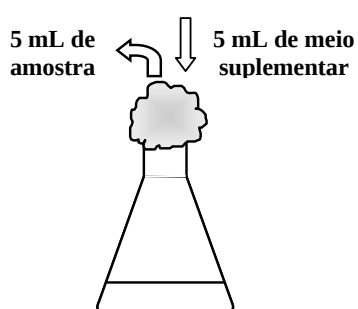


Figura 4.2: Procedimento utilizado para as pré-culturas das fermentações.

O cultivo em meio padrão suplementado com compostos integrantes da rota biossintética da CefC consistiu de uma batelada inicial em 50 mL por 24 horas e a partir deste período, houve a suplementação do meio por 72 horas (a cada 24 horas), perfazendo um total de 96 horas de processo (Figura 4.3). Amostras foram submetidas a análises de pH, concentração de células e cefalosporinas totais. O cultivo em meios suplementados com diferentes fontes de carbono consistiu de uma batelada inicial de 72 horas em 40 mL e, a partir deste período, procedeu-se a suplementação do meio a cada 24 horas, por mais 72 horas, perfazendo um total de 144 horas de processo (Figura 4.4). As amostras foram submetidas a análises de pH, concentração de células e cefalosporinas totais.



A partir de 24 h de fermentação:

- suplementação de meio MS e amostragem a cada 24 horas;
- volume reacional constante = 50 mL

Figura 4.3: Procedimento utilizado na suplementação da fermentação principal com compostos integrantes da rota biossintética de CefC.

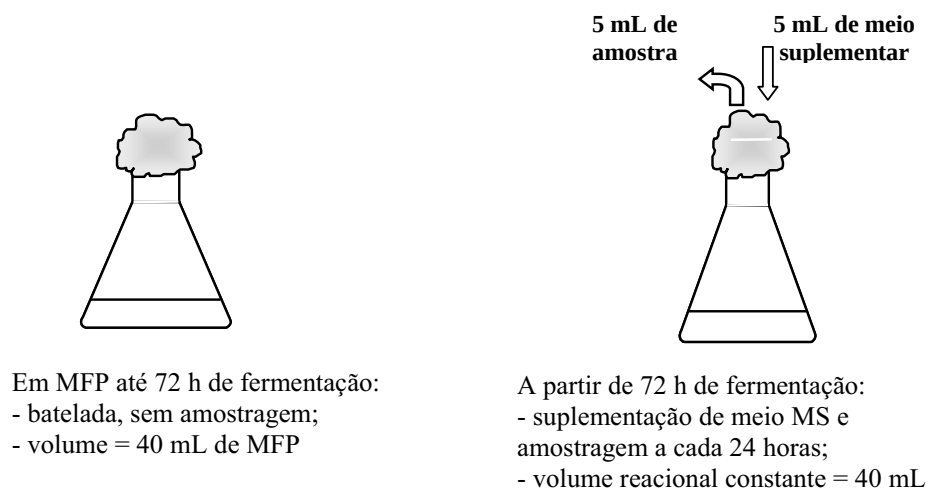


Figura 4.4: Procedimento utilizado na suplementação da fermentação principal com diferentes fontes de carbono.

Nos cultivos em meio padrão suplementado com L-lisina, a fermentação principal consistiu de uma batelada inicial em 40 mL de MFP. A partir de 48 horas, foram iniciadas as 4 suplementações de amido e, a partir de 72 horas, 3 suplementações de L-lisina, a cada 24 horas, perfazendo um total de 144 horas de processo (Figura 4.5). As amostras foram submetidas a análises de pH, concentração celular, cefalosporinas totais, atividades de LAT e CAT, consumo de amido e de L-lisina .

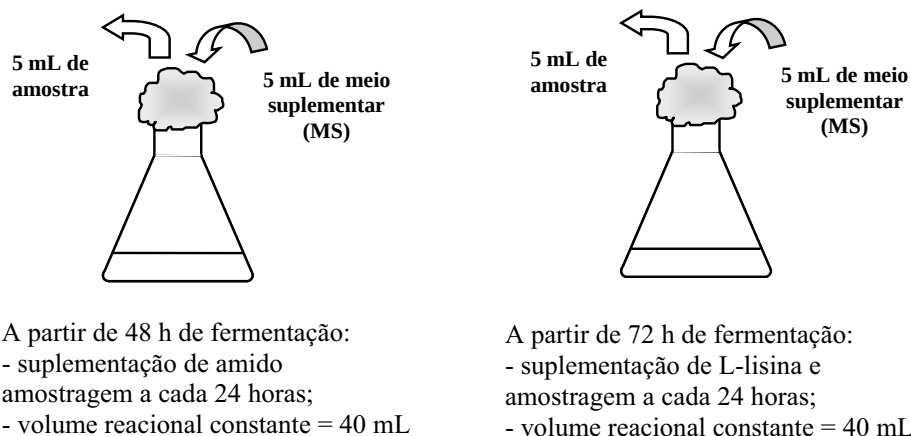


Figura 4.5: Procedimentos utilizados nas suplementações da fermentação principal com amido e L-lisina.

4.3.5.2. Bioensaio de difusão em ágar

A bactéria teste foi cultivada em meio ágar nutriente por 24 horas em estufa a 36- 37°C. Bactérias cultivadas em meio sólido podem ser mantidas sob refrigeração (4°C) por até 2 meses. Para estocagem a -80°C, preparou-se uma suspensão de células adicionando-se 10 mL de solução de glicerol 20% v/v em cada tubo contendo bactérias cultivadas em 10 mL de meio ágar inclinado. A suspensão resultante ($\sim 10^8$ UFC/mL, onde UFC = unidades formadoras de colônias) foi distribuída em alíquotas de 2 mL em criotubos. Para a reativação das bactérias mantidas a -80°C, o conteúdo de um criotubo foi adicionado em cerca de 50 mL de meio nutriente sem agar e cultivado a 36°C por 24 horas.

A suspensão bacteriana foi preparada adicionando-se 9 mL de solução salina (0,9%) em tubo contendo bactérias cultivadas em agar nutriente inclinado. A DO da suspensão resultante foi lida a 600 nm, em espectrofotômetro.(1 DO).

A cada 100 mL de meio nutriente ágar ainda fluido (45°C) foi adicionado 1 mL de suspensão de bactéria teste obtida como descrito. Em cada placa de 150 mm de diâmetro, era vertido 30 mL de meio nutriente a 1% v/v.

A indisponibilidade do padrão de CefC criou a necessidade de se utilizar um método indireto de quantificação deste composto, o bioensaio de difusão em ágar utilizando-se CPC como padrão (LIRAS e MARTIN, 2005).

Separadamente, foram preparadas as soluções-padrão de CPC, uma delas concentrada e outra diluída, mantendo-se o mesmo fator de diluição estabelecido para a amostra.

Estabelecendo-se um fator de diluição igual a 4, prepararam-se as soluções-padrão de CPC e as amostras segundo este fator. Utilizando-se soluções-padrão a 60 e 15 mg/L, prepararam-se amostras pura e diluída 1/4, ou 1/2 e 1/8, conforme estimativa da concentração do produto no caldo fermentado.

Após solidificação do meio, perfurou-se o número necessário de poços de 5 mm de diâmetro, nos quais foram adicionados 20 µL das soluções preparadas de amostra e de padrão de antibiótico, adequadamente diluídas. As placas foram incubadas a 36-37°C por 24 horas. Então, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição.

A concentração da amostra (em mg/L) foi determinada por interpolação logarítmica das medidas dos diâmetros dos halos de inibição, através dos seguintes cálculos:

$$\theta = \frac{(\sum A_H + \sum A_L) - (\sum P_H + \sum P_L)}{(\sum A_H + \sum P_H) - (\sum A_L + \sum P_L)} \cdot \log(\text{fator de diluição})$$

onde

A e P - valores dos diâmetros dos halos de inibição das amostras e dos padrões de Cefalosporinas, respectivamente

H e L - subscritos indicando alta e baixa concentração, respectivamente

Fator de diluição - razão entre a concentração mais alta e a mais baixa das soluções, tanto dos padrões como das amostras

Finalmente, a concentração da amostra era determinada por:

$$C_{\text{amostra}} = 10^{\theta} * \text{conc. mais alta do padrão} * 1$$

$$\text{ou } C_{\text{amostra}} = 10^{\theta} * \text{conc. mais baixa do padrão} * \text{fator de diluição}$$

RESULTADOS

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo em meios contendo glicerol e/ou amido

O processo de produção foi realizado em batelada nos meios contendo amido e/ou glicerol descritos na Tabela 4.5. Pode-se verificar que os meios contendo glicerol (P1 e P2) apresentaram uma biomassa um pouco mais elevada, entre 7,5 e 8,5 g/L, do que no meio contendo somente amido (P3), cuja concentração máxima de células foi de cerca de 7 g/L, obtida em 72 horas de processo (Figura 5.1). Desta forma, os resultados indicaram que o glicerol foi mais adequado ao crescimento celular, enquanto o meio contendo amido apresentou menor concentração celular, que é um fator favorável ao aumento de disponibilidade de oxigênio dissolvido ao microrganismo.

Lebrihi et al (1988) obtiveram resultados semelhantes de biomassa em estudo comparativo de crescimento celular em meios contendo glicerol ou amido. Enquanto a biomassa final foi maior em meio contendo glicerol como fonte de carbono, o contrário foi observado em relação à produção de CefC, que se mostrou mais lenta e em menor quantidade na presença daquele substrato.

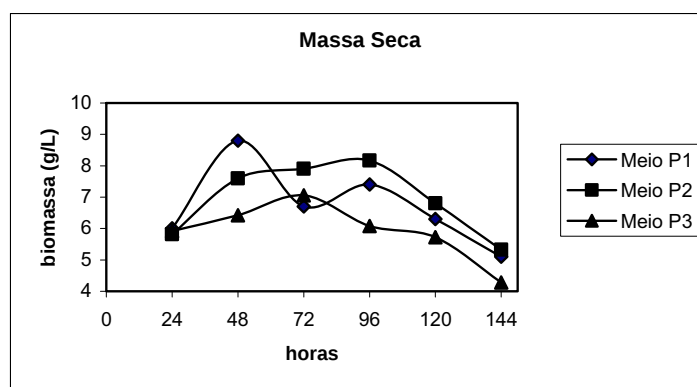


Figura 5.1: Resultados de biomassa obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em batelada, em meios contendo glicerol e/ou amido. Meios: P1 – amido + glicerol; P2 – glicerol; P3 – amido

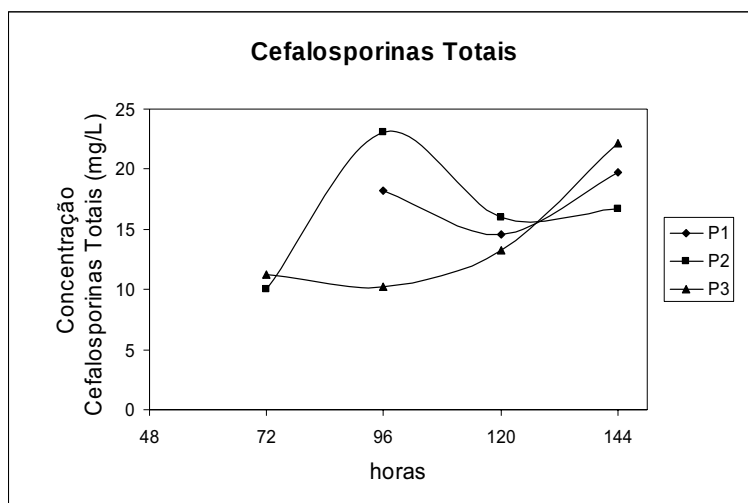


Figura 5.2: Resultados de cefalosporinas totais obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em batelada, em meios contendo glicerol e/ou amido. Meios: P1 – amido + glicerol; P2 – glicerol; P3 – amido.

Os resultados apresentados na Figura 5.2 indicaram que a produção de cefalosporinas totais apresentou baixo rendimento em todas as condições, quando comparada com dados da literatura (RIUS et al, 1996, KHETAN et al, 1999). Observa-se valores crescentes de biomassa em meios contendo amido, ressaltando que a lenta e contínua hidrólise do amido pelo microrganismo simula condições de limitação pelo carbono evitando, assim, mecanismos de repressão e/ou inibição da síntese de antibióticos causados pelo excesso de fontes de carbono facilmente assimiláveis, como o glicerol (AHARONOWITZ e DEMAINE, 1978; LEBRIHI et al, 1988).

5.2. Cultivo em meio suplementado com compostos integrantes da rota biossintética de CefC

Nesses experimentos utilizou-se um meio de produção contendo extrato protéico de soja (Soytone) e amido, descrito na Tabela 4.7, suplementado, a partir de 24 horas de processo, com compostos (L-lisina, succinato de sódio e ácido aspártico) indicados na literatura como intermediários da rota biossintética de produto (Tabela 4.8). Os compostos foram suplementados individualmente e/ou combinados. Não houve prévia adaptação do meio de preparo do inóculo ao meio de fermentação principal (Tabela 4.6)

Através da Figura 5.3 pode-se observar que houve pouca variação entre os dados de biomassa, que apresentaram valores máximos entre 5 e 7 g/L em todas as condições e queda a partir de 48 horas.

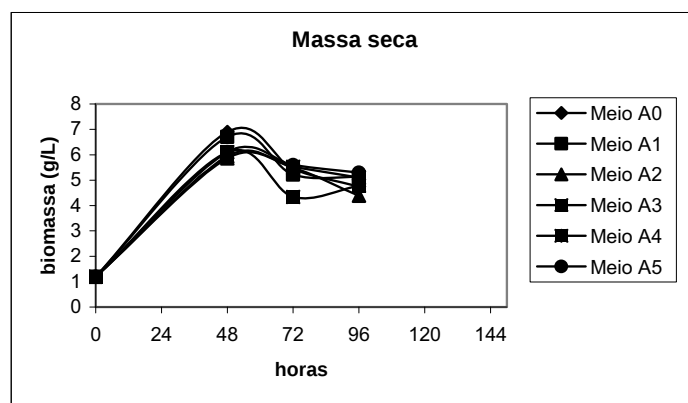


Figura 5.3: Resultados da biomassa obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio suplementado com compostos integrantes da rota biossintética de CefC. Condições: A0 (controle) - sem suplementação; Suplementações: A1 – L-lisina a 6,1 g/L; A2 – Succinato de sódio a 9,0 g/L; A3 – Ácido aspártico a 4,43 g/L; A4 – L-lisina a 6,1 g/L e Succinato de Sódio a 9,0 g/L; A5 – L-lisina a 6,1 g/L e Ácido aspártico a 4,43 g/L.

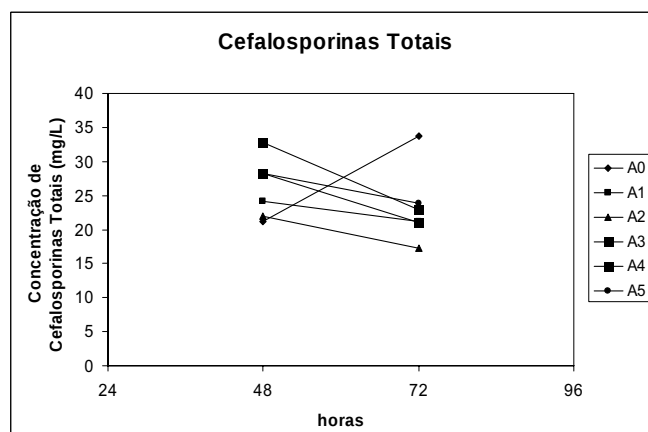


Figura 5.4: Resultados de cefalosporinas totais obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio suplementado com compostos integrantes da rota biossintética de CefC. Condições: A0 (controle) - sem suplementação; Suplementações: A1 – L-lisina a 6,1 g/L; A2 – Succinato de sódio a 9,0 g/L; A3 – Ácido aspártico a 4,43 g/L; A4 – L-lisina a 6,1 g/L e Succinato de Sódio a 9,0 g/L; A5 – L-lisina a 6,1 g/L e Ácido aspártico a 4,43 g/L.

A produção de cefalosporinas totais, determinada somente a partir de 48 horas, apresentou valores entre 20 e 30 mg/L (Figura 5.4). Somente a condição controle A0, sem suplementação, foi crescente. Pode-se sugerir que, de uma maneira geral, a inadequação das condições operacionais de suplementação foi a principal causa para estes resultados negativos, porém, outros fatores relevantes também podem ter contribuído. Aharonowitz e Demain (1978) verificaram que o ácido succínico, entre outros ácidos orgânicos, favorece

a produção por ser um composto intermediário na biossíntese de cefalosporinas. Porém, esses mesmos autores observaram que, diferentemente do crescimento em carboidratos, o crescimento em ácidos orgânicos ou seus sais é acompanhado de uma elevação no pH que pode afetar negativamente a produção de CefC (MERCK CO, 1972). No presente trabalho, mesmo adicionando-se o tampão biológico MOPS e suplementando-se com baixas concentrações de succinato de sódio, o pH atingiu valores próximos de 8 (dados não apresentados) que podem explicar os baixos valores de produção.

Por sua vez, nem o ácido aspártico, um aminoácido integrante do fluxo de carbono da rota biossintética das cefalosporinas (MENDELOVITZ e AHARONOWITZ, 1982), nem a L-lisina que, como já mencionado, é um importante precursor da cefamicina C (MALMBERG et al, 1995), favoreceram a produção sob as condições experimentais avaliadas no presente trabalho.

5.3. Cultivo em meios suplementados com diferentes fontes de carbono

Aharonowitz e Demain (1978) compararam vários compostos, individualmente, como principal fonte de carbono em processos com *S. clavuligerus*. A comparação entre amido, glicerol e maltose apontou o primeiro deles como o mais favorável à produção de cefalosporinas, enquanto maltose e glicerol propiciaram maior concentração celular. Como já mencionado anteriormente, os autores atribuem este fato à lenta e contínua hidrólise do amido, que cria condições limitantes ao uso do carbono e, por isto, favorece a síntese de produto. Em busca de maiores concentrações de produto, selecionou-se o amido como componente, sozinho ou combinado com outra fonte de carbono, de todos os meios testados no presente experimento.

As fontes de carbono utilizadas nos presentes cultivos foram selecionadas com base na literatura, dentre as mais adequadas para a síntese de CefC (AHARONOWITZ e DEMAINE, 1978; OMSTEAD et al, 1985). Os meios de produção e de suplementação foram descritos nas Tabelas 4.9 e 4.10. Com os meios B1, B2 e B3, investigou-se a influência da adição de fontes de carbono indutoras da produção de antibióticos beta-lactâmicos em *S. clavuligerus*, em processos em batelada com suplementação a partir de 72 horas. O meio B4 foi utilizado em processo em batelada, sendo constituído por Tryptic Soy Broth (Difco), complementado com amido e extrato de levedura (ROLLINS et al, 1988).

A biomassa apresentou bons resultados nos meios B1, B2 e B3 (Figura 5.5), com bom crescimento até 72 horas de processo. Porém, a partir de 120 horas, a concentração celular

apresentou uma queda brusca causada, possivelmente, por inadequação de condições operacionais estabelecidas para a suplementação, como a vazão média de alimentação, concentração dos compostos no meio suplementar, entre outros fatores. Já em meio B4, o crescimento não foi tão satisfatório, uma vez que o pH apresentou valores muito elevados (Tabela 5.1).

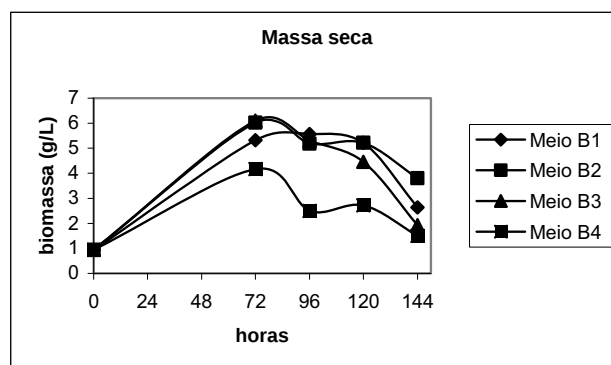


Figura 5.5 – Resultados de biomassa de cultivo de *S. clavuligerus* em meios suplementados com diferentes fontes de carbono: Meio B1: amido (10 g/L); Meio B2: amido (8 g/L) + maltose (2 g/L); Meio B3: Amido (8 g/L) + Succinato de Sódio (4,5g/L); Meio B4: TSB (Tryptic Soy Broth da Difco).

Tabela 5.1 – Valores de pH obtidos durante o cultivo de *S. clavuligerus* em meios suplementados com diferentes fontes de carbono: Meio B1: amido (10 g/L); Meio B2: amido (8 g/L) + maltose (2 g/L); Meio B3: Amido (8 g/L) + Succinato de Sódio (4,5g/L); Meio B4: TSB (Tryptic Soy Broth da Difco).

Tempo	Meio B1	Meio B2	Meio B3	Meio B4
72h	7,3	7,26	7,72	8,9
96h	7,25	7,21	7,86	8,95
120h	7,16	7,09	8,5	8,9
144h	7,17	7,1	8,26	8,92

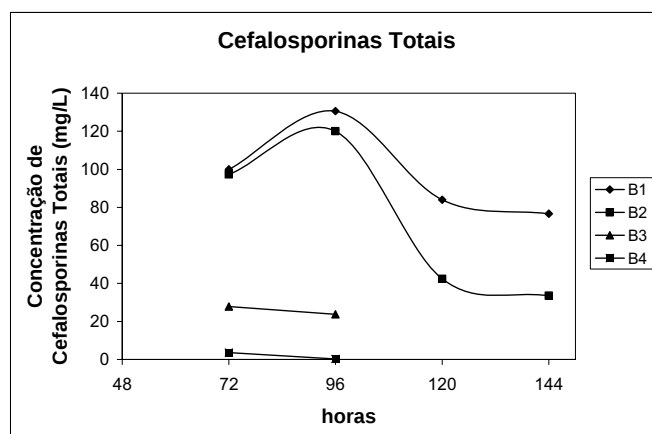


Figura 5.6: Resultados de cefalosporinas totais de cultivo de *S. clavuligerus* em meios suplementados com diferentes fontes de carbono: Meio B1: amido (10 g/L); Meio B2: amido (8 g/L) + maltose (2 g/L); Meio B3: Amido (8 g/L) + Succinato de Sódio (4,5g/L); Meio B4: TSB (Tryptic Soy Broth da Difco), adicionado de amido.

Observa-se através da Figura 5.6, que o meio B1, contendo somente amido como fonte de carbono, e o meio B2, contendo amido e maltose, resultaram na melhor produção de cefalosporinas totais. Em Aharonowitz e Demain (1978), o meio contendo maltose também apresentou boa produção de cefalosporinas. No meio contendo succinato (meio B3) observou-se uma elevação do pH durante o crescimento celular que pode ter prejudicado a produção de antibiótico. No meio B4, a falta do tampão biológico MOPS acarretou um aumento relevante do pH, que atingiu um valor próximo de 9,0 em 96 horas. Estas condições foram inadequadas tanto para o crescimento como para a produção do antibiótico. Como mencionado, este meio foi baseado em Rollins et al (1988) e originalmente não continha tampão, pois a fermentação foi conduzida com o pH controlado, em biorreatores de 10 litros. Os autores obtiveram ótima produção do antibiótico, cerca de 300 mg/L em 80 horas de fermentação.

5.4. Seleção do meio padrão de produção de CefC

Nessa série de fermentações, alguns meios de produção investigados anteriormente foram reavaliados. Tais meios foram o B1 e o B4 do experimento anterior e um meio contendo extrato protéico de semente de algodão (Proflo), testado em trabalho paralelo desenvolvido em nossos laboratórios, que gerou bons resultados de produção (137 mg/L em 72 horas de processo) (ANTONIO et al, 2007). Os meios de preparo de inóculo e de produção foram descritos nas Tabelas 4.11 e 4.12, respectivamente. Os meios de produção

denominados aqui como meios 1, 2 e 3 referem-se, respectivamente, ao antigo meio B1, ao meio contendo Proflo, supracitado, e ao antigo meio B4. Esse último foi novamente testado adicionando-se, desta vez, o tampão biológico MOPS como tentativa de controlar o pH em torno de 7.

Nos três meios utilizou-se uma concentração inicial de amido suficiente para se obter uma biomassa entre 5 e 7 g/L, considerando-se como informação disponível na literatura, um rendimento celular médio de $Y_{X/S} = 0,5$ obtido por Gouveia et al (2001) em meio contendo glicerol. Ainda, utilizou-se uma razão mássica C/N aproximadamente igual a 5, com base em fórmula molecular empírica proposta para *Streptomyces cattleya* em trabalho de Bushell e Fryday (1983).

Observou-se na Figura 5.7, que a partir de 48 horas de processo, a biomassa manteve-se aproximadamente estável nos meios 1 e 3, com valores entre 5 e 7 g/L. No meio 2, a biomassa apresentou um valor muito alto em 24 horas da fermentação, incompatível com a concentração de amido no meio. Este resultado foi decorrente de imprecisões nas medidas de biomassa. O Proflo contém uma pequena porcentagem de material insolúvel que, às vezes, permanecia na amostra na forma de uma nata sobrenadante que, como não passava pela membrana microporosa durante a filtração, mascarava os resultados de massa seca.

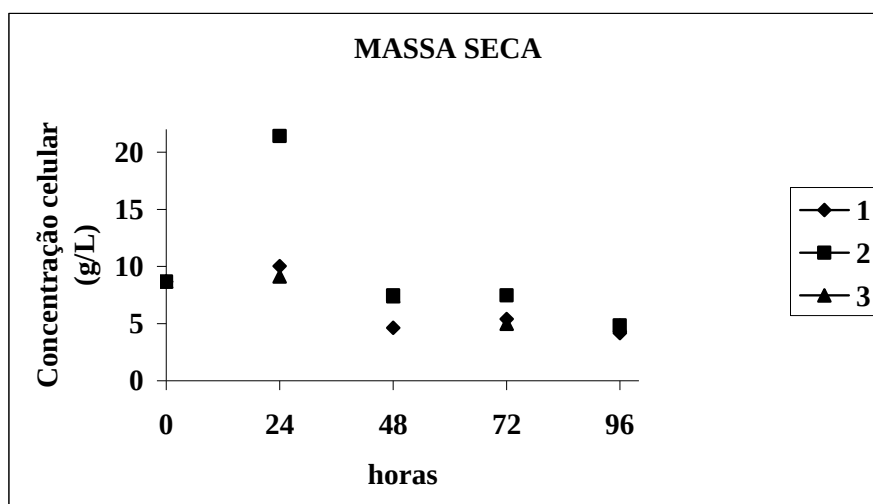


Figura 5.7 - Biomassa obtida nos meios de cultivo de *S. clavuligerus* utilizados para a seleção do meio padrão de produção de CefC

O amido praticamente esgotou-se nas primeiras 48 horas (Figura 5.8), demonstrando ser, conforme evidenciado na literatura, uma fonte de carbono apropriada para o cultivo de *S. clavuligerus*.

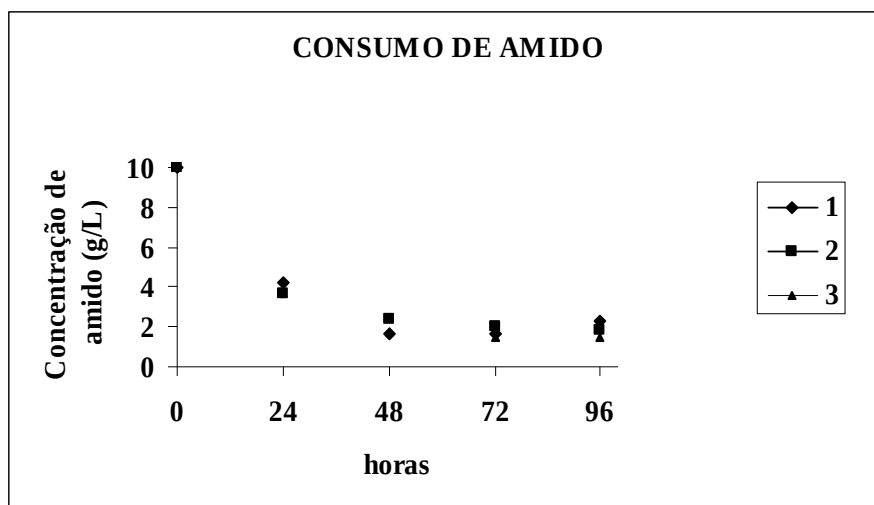


Figura 5.8 – Consumo de amido nos meios de cultivo de *S. clavuligerus* utilizados para a seleção do meio padrão de produção de CefC

Os resultados dos bioensaios realizados com as amostras deste experimento foram descartados. Não foi possível realizar a interpolação logarítmica com os resultados, uma vez que os halos medidos apresentaram-se maiores que os convenientes para realizar tal interpolação. Neste período, estava sendo feita a padronização do método de bioensaio, e a linhagem mais adequada da bactéria teste (*E. coli* ESS 2235) foi adquirida cerca de 40 dias após a realização deste experimento, não havendo assim volume de amostra suficiente para repetir a análise e confiabilidade nos resultados após o longo período de armazenamento. Após a observação dos tamanhos dos halos, o meio 2, contendo Proflo foi o mais indicado para produção de cefalosporinas totais, visto que se apresentaram ligeiramente maiores que os presentes nas outras condições testadas (dados não apresentados).

5.5. Determinação da atividade de LAT e CAT

Nesta etapa do trabalho, foram realizadas as primeiras análises de atividade de L-lisina- ϵ -aminotransferase (LAT) e cadaverina aminotransferase (CAT). O meio utilizado foi o meio padrão de produção selecionado no experimento anterior, contendo amido como principal fonte de carbono e energia, e Proflo como principal fonte de nitrogênio, descrito na Tabela 4.13.

Como os experimentos eram conduzidos em frascos agitados, os volumes coletados de amostra tinham de ser suficientemente pequenos para realizar todas as análises pertinentes ao processo e, ainda, não provocar alterações significativas de volume no meio reacional. Por outro lado, o procedimento de rompimento celular exigia uma quantidade mínima de

células para a extração das proteínas e posterior análise de atividade das enzimas. Desta forma, após vários testes, padronizou-se um volume de 10 mL para a amostragem. Esta etapa experimental foi importante para que fosse possível coletar uma quantidade pequena de amostra e, ao mesmo tempo, a fermentação pudesse continuar sem o esgotamento de meio.

Pode-se observar através da Figura 5.9, que a enzima CAT apresentou maior atividade que LAT, uma evidência de que a L-lisina foi mais consumida para a síntese de intermediários do metabolismo primário. LAT apresentou uma atividade máxima de 2,35 U/mg proteínas totais, um valor dentro da faixa observada em outros trabalhos com a mesma linhagem. Rius et al (1996) verificaram valores entre 0,8 e 3,0 U/mg de LAT para uma variação de L-lisina presente no meio entre 0 e 150 mM. O momento de máxima expressão de LAT diferenciou-se dos observados em Malmberg et al (1995), que verificaram picos de atividade em 25 horas de processo para a linhagem mutante LHM100 e em 31 horas para a linhagem selvagem. No presente trabalho, o valor máximo foi observado na primeira amostra, em 18 horas de processo. As diferenças entre os dados aqui obtidos e os da literatura podem ser explicadas pela variação dos meios utilizados, que contém componentes de naturezas e concentrações distintas e, por isso, afetam o processo de formas diferentes.

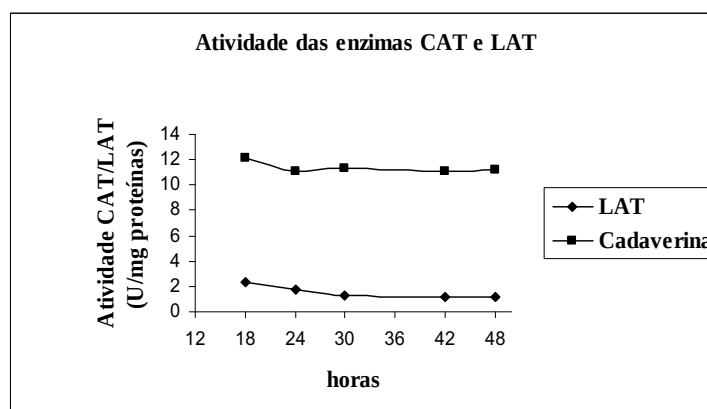


Figura 5.9 – Atividade das enzimas L-lisina ϵ -aminotransferase (LAT) e Cadaverina aminotransferase (CAT) obtida a partir de amostras coletadas durante cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão de produção de CefC contendo amido como principal fonte de carbono e energia e Proflo como principal fonte de nitrogênio (Tabela 4.13)

Após 18 horas, a atividade diminuiu ligeiramente, estabilizando-se em 30 horas, enquanto a produção de cefalosporinas totais aumentou até 42 horas (Figura 5.10). Este comportamento explica a associação entre a LAT e a subsequente produção de

cefalosporinas. Como já mencionado anteriormente, o substrato de LAT é a L-lisina, que é transformada em AAA, precursor direto das cefalosporinas totais (MADDURI et al., 1989). Assim, com o consumo da L-lisina e conseqüente formação do AAA, a produção de cefalosporinas é estimulada. No presente experimento, observou-se que a partir do momento em que, aparentemente, LAT começou a perder sua atividade, a produção de cefalosporinas aumentou.

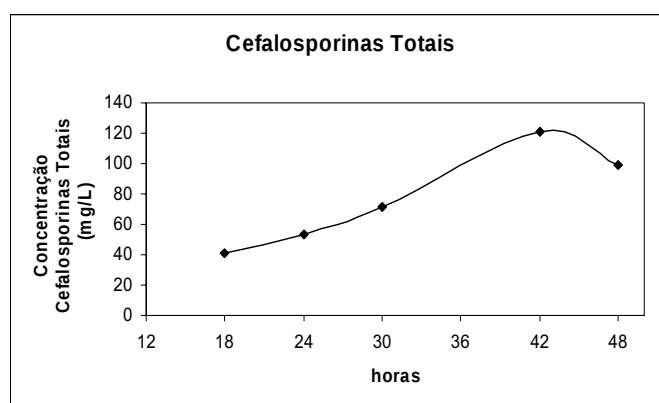


Figura 5.10 – Resultados de cefalosporinas totais obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão de produção de CefC contendo amido como principal fonte de carbono e energia e Proflo como principal fonte de nitrogênio (Tabela 4.13)

5.6. Avaliação do cultivo em meio padrão adicionado de α -cetoglutarato e diferentes concentrações de L-lisina em processo em batelada

Nessa etapa do trabalho foram realizadas fermentações em batelada em meio padrão (Tabela 4.13) complementado com α -cetoglutarato e várias concentrações de L-lisina (Tabela 4.14). O α -cetoglutarato atua como co-fator da LAT na rota biossintética de CefC e promoveu a maior produção de cefalosporinas em trabalho de Aharonowitz e Demain (1978), dentre vários ácidos orgânicos testados por estes autores.

Os valores da biomassa foram crescentes à medida que se aumentou a quantidade de L-lisina do meio, de forma que este aminoácido pode ter sido consumido como fonte de carbono durante o crescimento ou, ainda, acumulado intracelularmente como substrato de LAT. O α -cetoglutarato também pode ter contribuído para a formação de biomassa, uma

vez que Aharonowitz e Demain (1978) verificaram que este composto também é usado como fonte de carbono pelo microrganismo. O meio padrão (condição controle) apresentou a menor biomassa, visto que não continha L-lisina ou α -cetoglutarato complementares (Figura 5.11).

Após 48 horas, os valores de biomassa estabilizaram-se entre 5 e 7 g/L, valores apropriados para se obter caldos pouco viscosos que propiciam boa disponibilidade de oxigênio às células e, assim, favorecem a produção de CefC. O oxigênio é requerido para evitar um acúmulo indesejável de penicilina N no meio que, sendo um intermediário da rota biossintética, prejudica a formação de CefC. Por outro lado, Okabe et al (1992) verificaram que altas velocidades de agitação no início do processo fermentativo podem prejudicar o crescimento celular, porém, os autores não apresentaram nenhuma explicação para isto.

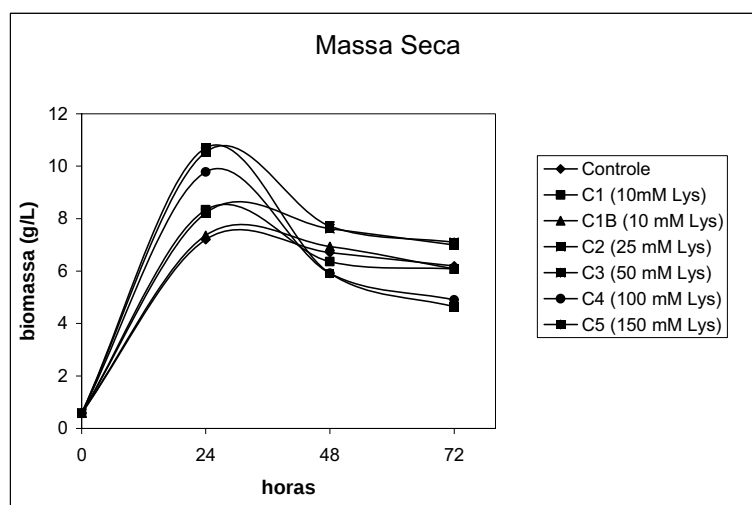


Figura 5.11 – Resultados de biomassa obtidos em cultivo em batelada de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) sem complementação (condição controle) e complementado com: condições - C1 a C5: α -cetoglutarato (10 mM) e L-lisina (condições C1 e C1B: 10 mM; C2: 25 mM; C3: 50 mM; C4: 100 mM; C5: 150 mM).

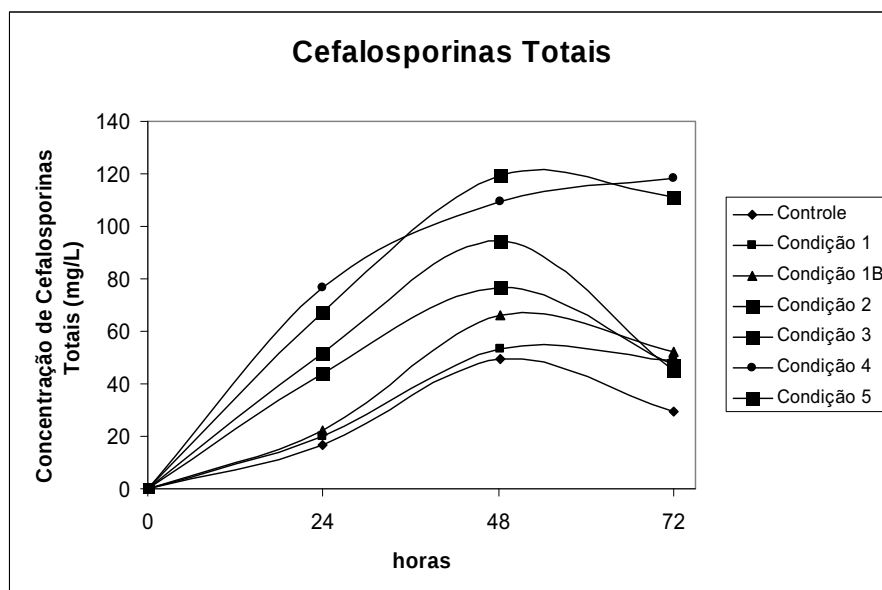


Figura 5.12 – Resultados de cefalosporinas totais obtidos em cultivo em batelada de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) sem complementação (condição Controle) e complementado com: Condições C1 a C5: α -cetoglutarato (10 mM) e L-lisina (condições C1 e C1B: 10 mM; C2: 25 mM; C3: 50 mM; C4: 100 mM; C5: 150 mM)

Na Figura 5.12, observa-se o aumento da produção de cefalosporinas totais com o aumento de L-lisina do meio. O efeito positivo da adição de L-lisina no meio de produção de antibióticos beta-lactâmicos vem sendo demonstrado por diversos autores (FANG et al, 1996; RIUS et al, 1996).

Rius et al (1996) verificaram que a complementação do meio de cultivo de *S. clavuligerus* com 50, 100 ou 150 mM de L-lisina resultou em aumentos na produção de antibiótico de 200 a 400%, em média. A adição de 10 mM de L-lisina em meio contendo fonte complexa de proteínas, que já contém o aminoácido em sua composição, não estimulou a produção. Por outro lado, a adição de 10 mM de L-lisina em meio quimicamente definido proporcionou um estímulo moderado da produção. Concentrações de 10 a 20 mM de L-lisina adicionados ao meio quimicamente definido resultaram em aumentos de 50 a 100% na produção de antibiótico. Já a concentração de 100 mM rendeu um aumento de 500% na produção, com mínimos efeitos no crescimento do microrganismo. Fang et al (1996) acreditam que, para aumentar a produção de beta-lactâmicos, é necessário adicionar uma quantidade considerável de L-lisina para competir com o seu catabolismo primário.

Na Figura 5.12, observa-se que nas condições 4 e 5, em que maiores quantidades de L-lisina foram adicionadas, não houve a queda na produção de cefalosporinas totais observada nas demais condições após 48 horas de processo. De uma maneira geral, obteve-se produção de 140 a 312% maior que a obtida na condição controle, sem L-lisina complementar. Desta forma, pode-se afirmar que, assim como amplamente verificado na literatura, a adição de L-lisina no meio de cultivo de *S. clavuligerus* influencia de maneira positiva a produção de cefalosporinas.

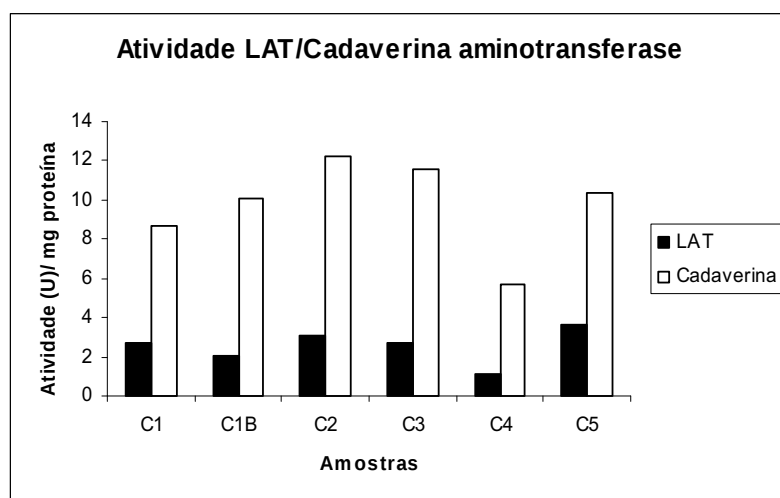


Figura 5.13 – Atividade das enzimas LAT e CAT obtida em 24 horas de cultivo em batelada de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) complementado com: Condições - C1 a C5: α -cetoglutarato (10 mM)) e L-lisina (C1 e C1B: 10 mM; C2: 25 mM; C3: 50 mM; C4: 100 mM; C5: 150 mM)

Pela Figura 5.13, nota-se uma baixa atividade da LAT no meio contendo 100 mM de L-lisina (condição C4). Em contrapartida, a produção máxima de cefalosporinas totais neste mesmo meio, cerca de 120 mg/L em 72 horas, foi da mesma ordem de grandeza da obtida em meio contendo 150 mM e maior que a dos demais meios. Esses dados permitem sugerir que a atividade de LAT pode ter tido prolongada ao longo do processo. Desta forma, nos experimentos seguintes, a concentração inicial de L-lisina no meio padrão de produção passou a ser 100 mM, em substituição aos 10 mM do aminoácido, utilizado anteriormente.

5.7. Suplementação do meio padrão com diferentes concentrações de L-lisina

A suplementação do meio padrão contendo doravante 100 mM de L-lisina iniciais, foi uma alternativa proposta para estender o tempo de processo e, assim, tentar aumentar a produção. Suplementou-se o meio com cinco concentrações crescentes de L-lisina (Tabela 4.15), a partir de 72 horas.

Em todas as condições, a biomassa apresentou alta concentração, entre 8 e 10 g/L, que diminuiu gradativamente a partir de 48 horas até o final da fermentação (Figura 5.14). Esta diminuição durante a etapa de suplementação de meio permite sugerir que as condições estabelecidas (concentração de amido, vazão média de alimentação) não foram eficazes para controlar a concentração celular em um valor constante. Segundo Trovatti et al (2006), a L-lisina, assim como outros aminoácidos, é lentamente consumida e não é uma boa fonte de carbono para a manutenção celular.

O amido, por sua vez, foi totalmente consumido até 48 horas (Figura 5.15), reforçando o fato de que aquele carboidrato é uma fonte de carbono apropriada para o cultivo de *S. clavuligerus* (AHARONOWITZ e DEMAIN, 1978).

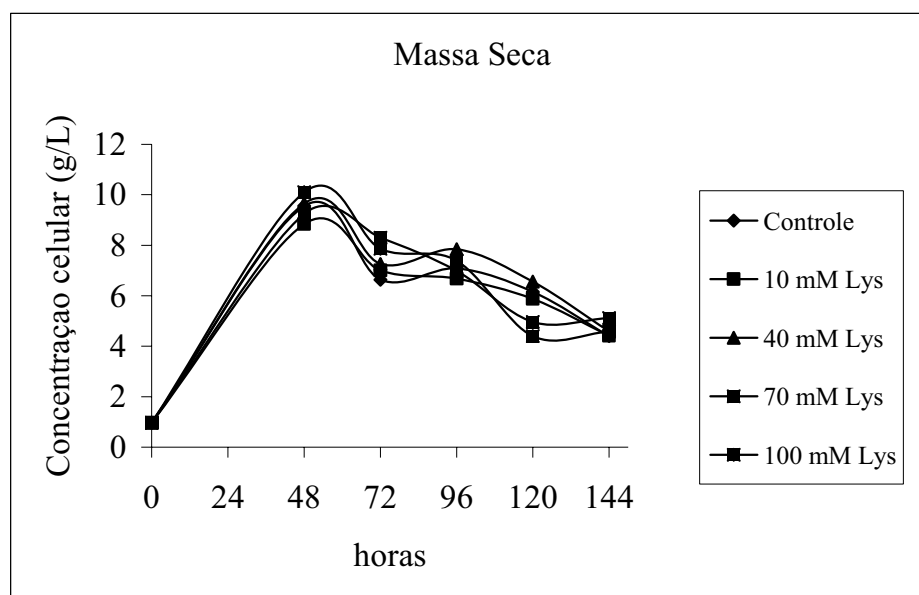


Figura 5.14 – Resultados de biomassa obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação de amido (6 g/L) após 48 horas de processo e de diferentes concentrações de L-lisina, após 72 horas. Condição controle: sem suplementação; Condições de suplementação de L-lisina: indicadas no gráfico.

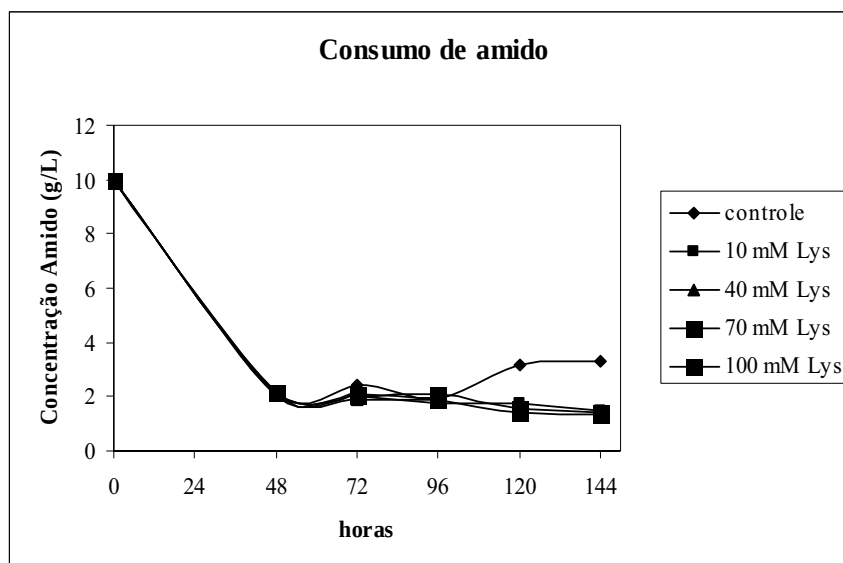


Figura 5.15 – Resultados de amido residual obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação de amido (6 g/L) após 48 horas de processo e de diferentes concentrações de L-lisina, após 72 horas. Condição controle: sem suplementação; Condições de suplementação de L-lisina: indicadas no gráfico.

De um modo geral, a produção de cefalosporinas totais foi satisfatória em todas as condições (Figura 5.16), obtendo-se concentrações entre 350 e 410 mg/L. As amostras de 144 horas da condição controle e do meio suplementado com 100 mM de L-lisina apresentaram resultados não confiáveis (muito altos) e, por esse motivo, seus valores não estão representados no gráfico.

O consumo de L-lisina foi muito semelhante em todas as condições até 72 horas (Figura 5.17). A partir deste momento, quando se iniciou a suplementação de meio, o consumo do aminoácido tornou-se diferenciado entre as condições. O acúmulo de L-lisina foi diretamente proporcional à concentração deste aminoácido no meio suplementar. Surpreendentemente, o meio controle, no qual se suplementou somente amido, apresentou um acúmulo de L-lisina da mesma ordem de grandeza do meio suplementado com 70 mM do aminoácido.

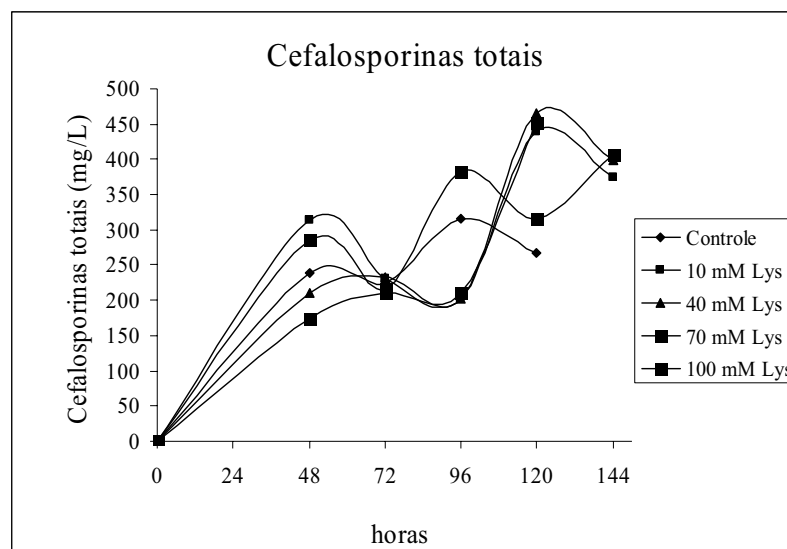


Figura 5.16 – Resultados de cefalosporinas totais obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação de amido (6 g/L – concentração final no frasco) após 48 horas de processo e de diferentes concentrações de L-lisina, após 72 horas. Condição controle: sem suplementação; Condições de suplementação de L-lisina: indicadas no gráfico.

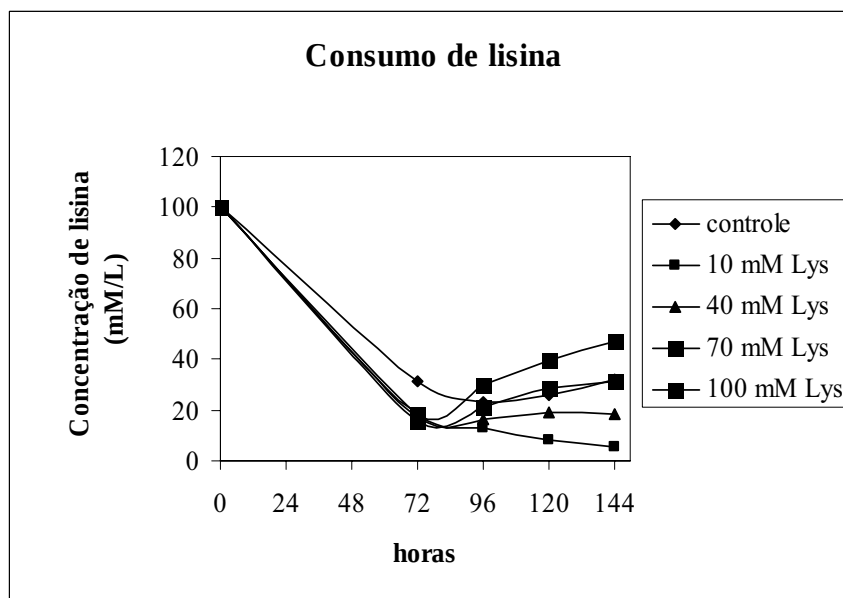


Figura 5.17 – Resultados de L-lisina residual obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação de amido (6 g/L) após 48 horas de processo e de diferentes concentrações de L-lisina, após 72 horas. Condição controle: sem suplementação; Condições de suplementação de L-lisina: indicadas no gráfico.

Concluiu-se que, dentre as condições testadas no presente trabalho, a suplementação do meio padrão com 10 mM de L-lisina (concentração no meio reacional ao final da fermentação), foi a mais adequada para a produção de cefalosporinas totais.

5.8. Atividade de LAT e CAT em meio padrão suplementado com 10 mM de L-lisina

A atividade das enzimas LAT e CAT foi determinada nas amostras de caldo coletadas em 24, 48 e 120 horas de processo em meio padrão (contendo 100 mM inicial de L-lisina) suplementado, a partir de 48 horas com amido e a partir de 72 horas com 10 mM do aminoácido (concentração final no frasco) (Tabela 4.15).

Nas primeiras 48 horas de fermentação houve um rápido aumento da concentração de células (Figura 5.18). A partir deste período, a concentração de células começou a cair. Segundo a literatura, a adição inicial de L-lisina em altas concentrações (100 e 150 mM) em culturas de *S. clavuligerus* exerce um pequeno efeito negativo na velocidade inicial de crescimento (RIUS, 1996), porém não se observou este efeito no presente experimento.

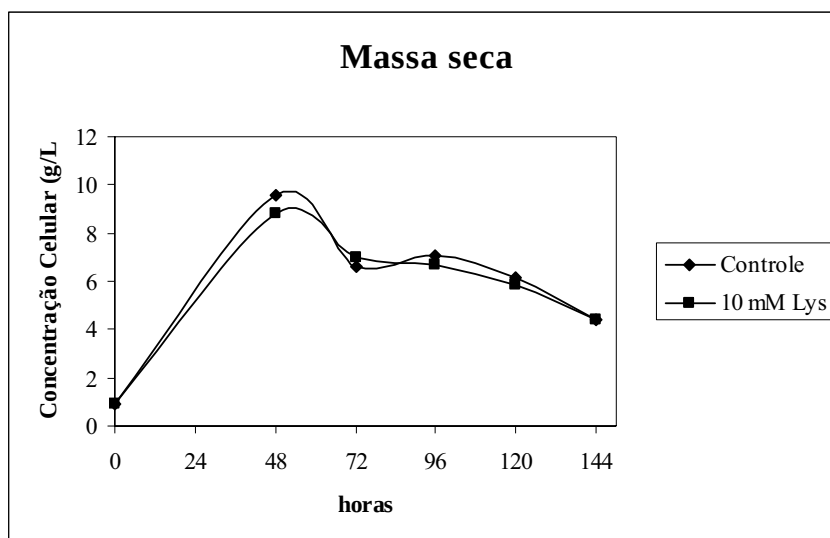


Figura 5.18 – Resultados de biomassa obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação e de 10 mM de L-lisina (concentração final no frasco), após 72 horas de processo . Controle: sem suplementação de L-lisina.

A produção de cefalosporinas totais (Figura 5.19) apresentou alguma semelhança nas duas condições e valores bem menores que aqueles obtidos no experimento anterior. Provavelmente, isto foi decorrente da idade dos micélios utilizados como inóculo, pois a capacidade produtiva de *S. clavuligerus* é afetada pelo período de estocagem do microrganismo em criotubos. Este problema está sendo investigado por pesquisadores do grupo, em trabalhos paralelos nesta linha de pesquisa. Assim, cada conjunto de ensaios foi realizado a partir de micélios de um único criotubo.

Ainda através da Figura 5.19, pode-se observar que a suplementação de 10 mM de L-lisina não exerceu um efeito notável na produção de cefalosporinas e poderia, então, ser dispensada. No presente estudo, a atividade de LAT apresentou um pico em 24 horas de processo, diminuindo em 48 horas e aumentando novamente, atingindo seu pico máximo em 120 horas (Figura 5.20). Porém, esta retomada da atividade da LAT não refletiu no aumento da produção de cefalosporinas totais, que começou a decair em 48 horas e não apresentou a recuperação desejada. Cabe mencionar que o processo como um todo pode ter sido prejudicado, entre outros fatores, por elevações súbitas de temperatura observadas durante a fermentação, decorrentes de defeito apresentado no sistema de controle da mesa incubadora. De qualquer forma, a reincidência de um pico de atividade da LAT em períodos posteriores ao crescimento exponencial permite sugerir a possibilidade de se manter boa atividade da enzima através de condições adequadas de adição de L-lisina.

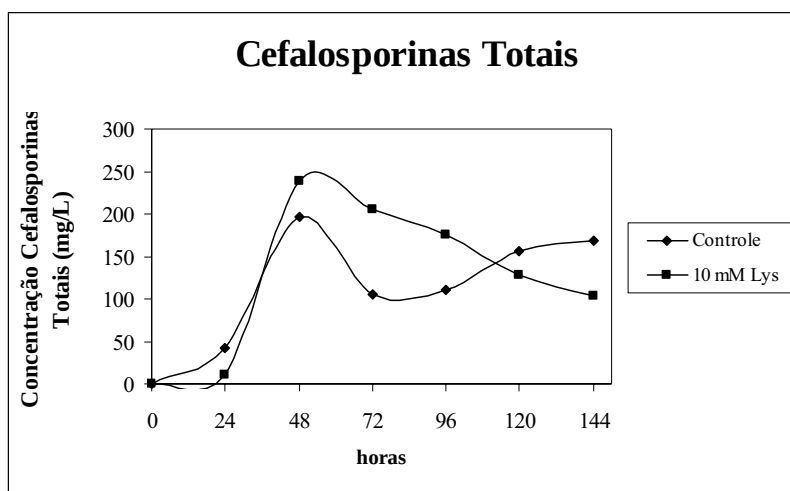


Figura 5.19 – Resultados de cefalosporinas totais obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação de amido (6 g/L) após 48 horas e de 10 mM de L-lisina (concentração final no frasco), após 72 horas de processo. Controle: sem suplementação de L-lisina.

KERN et al (1980) observaram, em *S. lactamdurans*, um pico de atividade específica de LAT no início da fermentação (~20 horas de processo) e um decréscimo assim que o antibiótico começou a ser sintetizado. O fato de, neste trabalho, a síntese da CefC iniciar-se após o pico de atividade de LAT em 24 horas, permite sugerir que o AAA tenha sido formado no início da fermentação para, mais tarde, ser consumido para a síntese de antibiótico. Em *Streptomyces sp* não foi identificada outra função fisiológica relevante para o AAA, diferente da de precursor de antibióticos beta-lactâmicos.

A atividade de LAT observada no início das fermentações do presente trabalho condiz com dados de vários pesquisadores (AHARONOWITZ e DEMAINE, 1978, 1979; KERN et al, 1980), que verificaram a síntese das enzimas envolvidas na produção de antibióticos durante a fase de crescimento. Malmberg et al (1995) também observaram a reincidência de picos de atividade LAT durante o processo fermentativo. Em linhagens selvagens de *S. clavuligerus*, estes autores constataram um segundo pico de atividade no início da fase estacionária de crescimento, seguido de um decréscimo.

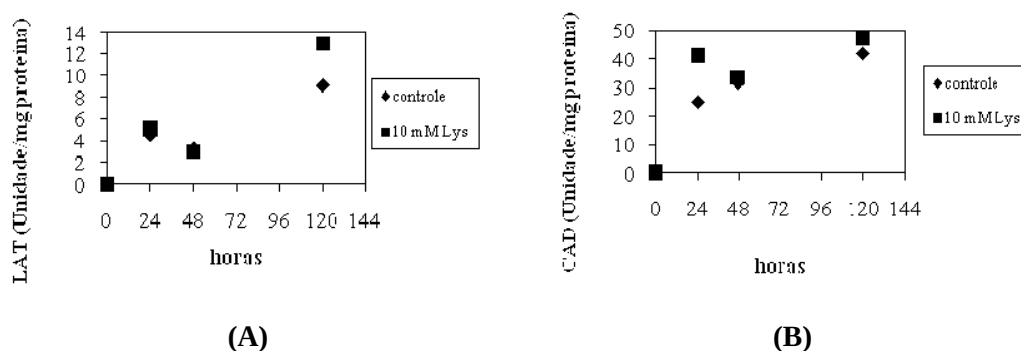


Figura 5.20 – Resultados de atividade de LAT **(A)** e CAT **(B)** obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de L-lisina, com suplementação de amido (6 g/L) após 48 horas e de 10 mM de L-lisina (concentração final no frasco), após 72 horas de processo. Controle: sem suplementação de L-lisina

O consumo de L-lisina, apresentado na Figura 5.21, foi constante e muito semelhante nas duas condições e praticamente não houve acúmulo do aminoácido no meio.

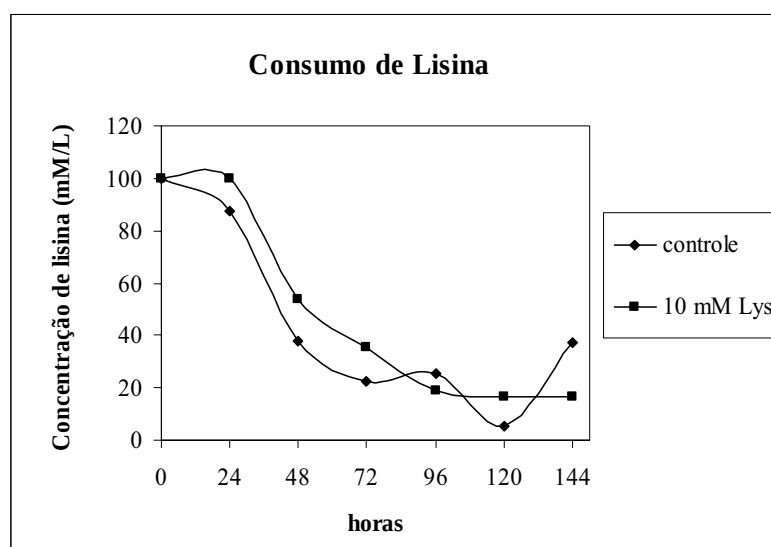


Figura 5.21 – Resultados do consumo de L-lisina obtidos em cultivo de *S. clavuligerus* em meio padrão (Tabela 4.13) contendo 100 mM de aminoácido, com suplementação de amido (6 g/L) após 48 horas e de 10 mM do aminoácido (concentração final no frasco) após 72 horas de processo. Controle: sem suplementação de L-lisina.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. Com base em composições de meios sintéticos de cultivo de *Streptomyces* sp descritos em trabalhos da literatura, foi possível formular um meio semi-sintético padrão adequado para a produção, em batelada, de cefalosporinas por *S. clavuligerus* ATCC 27064, contendo amido e extrato protéico de semente de algodão (Proflo) como principais fontes de carbono e energia e de nitrogênio, respectivamente, e L-lisina como indutor da síntese de antibióticos beta-lactâmicos.
2. Os dados experimentais obtidos nos frascos agitados permitiram verificar a influência positiva da L-lisina na produção de cefalosporinas totais, em concordância com a literatura, porém a suplementação com 10 mM não exerceu um efeito notável na produção. Não se pode afirmar estatisticamente, mas observou-se uma tendência da atividade de lisina e aminotransferase (LAT) estar associada com a produção dos antibióticos beta-lactâmicos.
3. O número de amostras foi limitado pelo volume de meio nos frascos agitados e, por isso, impossibilitou o monitoramento de forma mais contínua da atividade de LAT ao longo do processo fermentativo. Assim, não foi possível avaliar quantitativamente a dependência da atividade da enzima com a concentração de L-lisina. Cultivos microbianos em frascos agitados são sistemas inadequados para o estudo de diversos parâmetros que não podem ser controlados (pH, oxigênio dissolvido, etc). Em trabalhos futuros, esses experimentos poderão ser conduzidos em fermentadores, nos quais é possível controlar diversos parâmetros importantes na produção dos antibióticos e coletar um maior número de amostras.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, D. C.; JENSEN, S. E. Investigation of the *Streptomyces clavuligerus* cephamycin C gene cluster and its regulation by the ccaR protein. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 16, p. 4068-4079, 1998.
- AHARONOWITZ, Y.; DEMAINE, A. L. Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. **Arch. Microbiol.**, v. 115, p. 169-173, 1977.
- AHARONOWITZ, Y.; DEMAINE, A. L. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrob. Ag. Ch.**, v. 14, p. 159-164, 1978.
- AHARONOWITZ, Y.; DEMAINE, A. L. Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. **Can. J. Microbiol.**, v. 25, p. 61-67, 1979.
- ANTONIO, T.; CORRÊA, T.; ARAUJO, M. L. G. C. Meios de cultivo de *Streptomyces clavuligerus* para a produção de cefamicina C. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: [s.n.], 2007. PFE0121. 1 CD-ROM.
- BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Nat. Prod. Rep.**, v. 14, n. 4, p. 309-333, 1997.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. New York: McGraw-Hill, 1986.
- BEHMER, C. J.; DEMAINE, A. L. Further studies on carbon catabolite regulation of β -lactam antibiotic synthesis in *Cephalosporium acremonium*. **Curr. Microbiol.**, v. 8, p. 107-114, 1987.
- 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. Ag. Ch.**, 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: 13 jul. 2006.
- 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.
- BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: VANDAMME, E. J. (Ed.). **Biotechnology of industrial antibiotics**. New York: Dekker, 1984. p. 3-31.

- ELSON, S. W.; OLIVER, R. S. Studies on the biosynthesis of clavulanic acid: incorporation of ^{13}C -labelled precursors. **J. Antibiot.**, v. 31, p. 586-592, 1978.
- ESSACK, S. Y. The development of β -lactam antibiotics in response to evolution of β -lactamases. **Pharm. Res.**, v. 18, n. 10, 2001.
- FANG, A.; KEABLES, P.; DEMAINE, A. L. Unexpected enhancement of beta-lactam antibiotic formation in *Streptomyces clavuligerus* by very high concentrations of exogenous lysine. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 44, p. 705-709, 1996.
- FOTHERGILL, J. C.; GUEST, J. R. Catabolism of L-lysine by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 99, p. 136-155, 1977.
- 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.
- JENSEN, S. E.; ELDER, K. J.; AIDOO, K. A.; PARADKAR, A. S. Enzymes catalyzing the early steps of clavulanic acid biosynthesis are encoded by two sets of paralogous genes in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrob. Ag. Ch.**, v. 44, n. 3, p. 720-726, 2000.
- KERN, B. A.; HENDLIN, D.; INAMINE, E. L-lysine eps-aminotransferase involved in cephamycin C synthesis in *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrob. Ag. Ch.**, v. 17, n. 4, p. 679-685, 1980.
- 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.; E HOPWOOD, D. A. **Practical Streptomyces genetics**. Norwich: John Innes Foundation, 2000. 613 p.
- LEBRIHI, A.; GERMAIN, P.; LEFEBVRE, G. Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, p. 130-135, 1987.
- 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.
- LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. **Anton. Leeuw. Int. J. G.**, v. 75, p. 109-124, 1999.
- LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*: microbial processes and products. In: BARREDO, J. L. (Ed.). **Methods in biotechnology**. New Jersey: Humana Press, 2005. v. 18, p. 149-163.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FAAR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MADDURI, K.; STUTTARD, C.; VINING, L. C. Lysine catabolism in *Streptomyces* spp. is primarily through cadaverine: beta-lactam producers also make alfa-amino adipate. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 299-302, 1989.

MALMBERG, L. H.; HU, W. S.; SHERMAN, D. H. Effects of enhanced lysine ϵ -aminotransferase activity on cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 44, p. 198-205, 1995.

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. Ag. Ch.**, v. 21, p. 74-84, 1982.

MERCK AND COMPANY (United States). Edward Inamine; Jerame Birnbaum. **Production of cephamycin C by Fermentation**. GB 1466055, 25 Apr. 1974, 11 Mar. 1975.

OKABE, M.; KUWAJIMA, T.; SATOH, M.; KIMURA, K.; OKAMURA, K.; OKAMOTO, R. Preferential and high-yield production of a cephamycin C by dissolved oxygen controlled fermentation. **J. Ferment. Bioeng.**, 73, p. 292-296, 1992.

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

PEREIRA, V.; PONTES, M.; CÂMARA, J. S.; MARQUES, J. C. Fluorometric determination of ammonium ion by ion chromatography using postcolumn derivatization with *o*-phthaldialdehyde. **J. Chromatogr. A**, v. 1085, n. 1, p. 91-97, 2005.

PÉREZ-LLARENA, F. J.; LIRAS, P.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; MARTÍN, J. F. A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both beta-lactam compounds. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 6, p. 2053-2059, 1997.

PRUES, D. L.; KELLETT, M. A. New clavam antibiotic from *Streptomyces clavurigerus*. **J. Antibiot.**, v. 20, p. 208-212, 1983.

RIUS, N.; MAEDA, K.; DEMAINE, A. L. Induction of L-lysine in *Streptomyces clavuligerus*, producer of cephalosporins. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 144, p. 207-211, 1996.

ROLLINS, R. J.; JENSEN, S. E.; WESTLAKE, D. W. S. Effect of aeration on antibiotic production by *Streptomyces clavurigerus*. **J. Ind. Microbiol.**, v. 3, p. 357-364, 1988.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTIN, 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*. **Microbiol.**, v. 142, p. 1209-1220, 1996.

TOWNSEND, C. A. New reactions in clavulanic acid biosynthesis. **Curr. Op. Chem. Biol.**, v. 6, n. 5, p. 583-589, 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.

ZANCA D. M.; MARTÍN J. F. Carbon catabolite regulation of the conversion of penicillin N into cephalosporin C. **J. Antibiot.**, v. 36, p. 700-708, 1983.