



Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho
Instituto de Química de Araraquara

**"Estudo da composição de meios de cultura para a produção de
cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*"**

Tatiana Antonio

Dissertação apresentada ao Instituto
de Química de Araraquara da
Universidade Estadual Paulista, para
obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

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

Bolsa: CAPES

Araraquara

2007

DADOS CURRICULARES

Tatiana Antonio

1) Dados Pessoais

- 1.1) Nascimento: 31/05/1979
- 1.2) Nacionalidade: brasileira
- 1.3) Naturalidade: São Carlos- SP
- 1.4) Estado civil: solteira
- 1.5) Filiação: Ana Maria Antonio
- 1.6) Profissão: bióloga
- 1.7) Documento de identidade: 30.366.264-5
- 1.8) Cadastro de pessoa física: 278182628-65
- 1.9) Endereço: Rua Benjamim Constant, 419-São Carlos - SP

2) Formação Acadêmica

- 2.1) Bacharel e Licenciatura em Ciências Biológicas, concluído em 24/01/2005, na UNESP, campus de Assis.

3) Trabalhos Científicos Publicados

- 3.1) Antonio, T.; Corrêa, T. Araujo, M. L. G. C. Meios de Cultivo de *Streptomyces clavuligerus* para a produção de Cefamicina C. Anais XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM 2007 (trabalho completo PFE0121-CD-ROM), Curitiba, PR, 29/ 07 a 01/ 08/ 2007.

AGRADECIMENTOS

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

Ao amigo **Mauro** pelas orações e apoio em todas as fases da minha vida

À minha mãe, **Ana Maria**, pelo incentivo, carinho e esforço durante todo esse período, e pela vida que ela generosamente me concedeu, com muito amor e por todos os seus ensinamentos. Obrigada por existir **Mãe**, graças a você realizei este trabalho!

Ao **João** pelo carinho, interesse, apoio e incentivo tão paternais e importantes em minha vida.

À Profa. Dra. **Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo** pela orientação, carinho e amizade demonstrados nesse período e também por ter me acolhido e me ensinado desde o nosso primeiro contato.

Ao **Rodrigo**, pela paciência, pelo interesse e apoio ao meu trabalho. E também pelo companheirismo, carinho e afeto tão presentes e fundamentais em minha vida. Dedico a você, grande parte deste trabalho!

Aos meus familiares, **tias, tios e avó** por todo carinho, apoio e compreensão.

À querida **Maria do Carmo**, pela paciência e pelos ensinamentos, além de sua enorme colaboração.

À **Mari** pela dedicação ao trabalho e pelo interesse em aprender sempre, além de sua enorme colaboração.

Aos demais colegas de trabalho, e as amigas, **Helen e Juliana**, pelas horas de alegria e pelo apoio nas horas não tão alegres. Que nossa amizade ultrapasse este período.

Aos amigos pré-mestrado, cujas amizades compartilho até hoje.

RESUMO

Os grupos de antibióticos mais importantes clinicamente são os dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclina. *Streptomyces clavuligerus* produz vários compostos β -lactâmicos, com destaque para os antibióticos envolvidos na rota biossintética da cefalosporina C (penicilina N, deacetoxicefalosporina C e cefamicina C) e o ácido clavulânico (AC) que, embora não tenha atividade biológica significativa, é um potente inibidor de β -lactamases (penicilinas e cefalosporinas). A cefamicina C (CefC) é uma 7-metoxi-cefalosporina que apresenta maior atividade que a cefalosporina C (CPC), produzida somente por fungos, por ser resistente a β -lactamases. Apesar das rotas biossintéticas de AC e CefC serem completamente independentes em *S. clavuligerus*, são controladas pelo mesmo elemento multifuncional (*ccaR*), o que dificulta a indução da produção de um ou outro composto durante o processo fermentativo. No presente trabalho, procurou-se obter maiores concentrações de CefC manipulando-se componentes em meio solúvel de cultivo de *S. clavuligerus*, selecionados dentre compostos que, segundo a literatura, atuam como agentes reguladores da síntese daquele antibiótico. As fermentações foram realizadas em frascos agitados (28°C, 260 rpm) para selecionar fontes de C e de N e, então, avaliar o processo no melhor meio-padrão, variando-se concentrações combinadas de L-lisina (10 a 108 mM) e α -cetoglutarato (3 a 110 mM) através de metodologia de planejamento experimental. A presença de α -cetoglutarato acarretou em aumento indesejável de pH, afetando negativamente o processo e os melhores resultados (entre 300 e 400 mg CPC totais/L após 72 horas de fermentação) foram obtidos no meio adotado como meio-controle, contendo amido e extrato protéico de semente de algodão como principais fontes de C e N, respectivamente, e L-lisina. Este meio-controle foi avaliado, sem α -cetoglutarato e com 55 mM deste composto, em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 5L de volume útil (a 28°C, 500 rpm, pH 6,8). Observou-se maior produção no meio-controle, cerca de 490 mg/L de CPC totais em 60 horas de processo.

ABSTRACT

The most important groups of antibiotics, from a clinical standpoint, are β -lactams, aminoglycosides and tetracyclines. *Streptomyces clavuligerus* produces several β -lactam compounds, primarily the antibiotics involved in the biosynthetic route of cephalosporin C (penicillin N, deacetoxycephalosporin C and cephamycin C) and clavulanic acid (CA), which, despite its slight biological activity, is a potent inhibitor of β -lactamases (penicillinases and cephalosporinases). Cephamycin C (CMC) is a 7-methoxycephalosporin with higher bioactivity than cephalosporin C (CPC) because it is more resistant to β -lactamases. Although the biosynthetic routes of CA and CMC are completely independent in *S. clavuligerus*, they are controlled by a common multi-functional element (ccaR), which hinders induction of the production of one or the other compound during the fermentation process. In this work, we sought to obtain higher concentrations of CMC by handling compounds in a soluble medium of *S. clavuligerus*, which were selected from compounds that, according to the literature, act as regulating agents in the synthesis of that antibiotic. Fermentation was carried out in flasks under shaking (28°C, 260 rpm), in order to select sources of C and N. The process was then evaluated in the best standard medium, by varying combined concentrations of lysine (10 to 108 mM) and α -ketoglutarate (3 to 110 mM) using an experimental planning methodology. The presence of α -ketoglutarate caused an undesirable increase in pH, negatively affecting the process. The best results (between 300 and 400 mg/L of total CPC after 72 h of fermentation) were obtained in the medium used as the control, which contained starch and cottonseed protein extract as main sources, respectively, of C and N, and L-lysine. This control medium was evaluated in a stirred and aerated tank bioreactor with 5L of useful volume (28°C, 500 rpm, pH 6.8) without α -ketoglutarate and with 55 mM of this compound. The highest production volume was found to occur in the control medium, i.e., about 490 mg/L of total CPC after 60h of process.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1) INTRODUÇÃO	1
2) OBJETIVOS	5
3) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1) Influências das Fontes de carbono e energia.	6
3.2) Influência das Fontes de nitrogênio	7
3.3) Compostos estimuladores da biossíntese de cefalosporinas	7
3.4) Disponibilidade de oxigênio dissolvido	9
4) MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1) MATERIAIS	10
4.1.1) Microrganismos	10
4.1.2) Meios de Cultura	10
4.1.3) Equipamentos	20
4.2) MÉTODOS	21
4.2.1) Métodos analíticos	21
4.2.2) PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	22
5) RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1) Experimento 1 – Seleção da fonte de C no meio de produção	25
5.2) Experimento 2 – Seleção da fonte de N do meio de produção	26
5.3) Consumo de amido na presença de diferentes fontes de N	28
5.3.1) Parte 1 - Experimento 3	28
5.3.2) Parte 2- Experimento 4	29
5.4) Experimento 5 – Ensaio com o mutante DSMZ 41826 (Vining et al, 1987).	31
5.5) Experimento 6- Seleção da fonte de N no meio de produção	33
5.6) Experimento 7 – Adição de α -cetoglutarato no meio de produção	36
5.7) Combinação de L-lisina e α -cetoglutarato no meio de produção	38
5.7.1) Considerações gerais	38
5.7.2) Experimento 8– 1º Planejamento Experimental	38

5.7.3) Experimento 9- 2º Planejamento Experimental	43
5.8) Experimento 10-Processo em biorreator tipo tanque agitado e aerado	47
6) Conclusões	51
7) Referências	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Estrutura molecular de (A) ácido clavulânico, (B) cefamicinas (Baggaley et al., 1997; Liras, 1999; Brakhage et al, 2005). 2
- Figura 1.2** - Rota biossintética em *Streptomyces clavuligerus* de formação de ácido clavulânico (AC) (CEAS – N-carboxiacetilarginina sintase, BLS – β -lactam sintetase, PAH – proclavaminato amidinohidrolase, CAS – clavaminato sintase, CAD – clavaldeído desidrogenase) (Jensen et al., 2000). 3
- Figura 1.3** - Rota biossintética em *Streptomyces clavuligerus* de formação de penicilina N, deacetoxicefalosporina C (DAOC), deacetilcefalosporina C (DAC) e cefamicina C (Elander, 2003). 4
- Figura 3.1** - Rota biossintética de Cef.C em *S.clavuligerus*. L-lisina, cisteína e valina são os três precursores primários para a biossíntese da Cef.C. O α -cetoglutarato é usado como co-fator para quatro enzimas da rota, aqui este papel é demonstrado para três destas enzimas. (Khetan et.al., 1999).
- Figura 4.1 – Experimento 8** – 1º Planejamento Fatorial 2² com duplicata do ponto central - condições de concentração de L-lisina e α -cetoglutarato no meio de produção de CefC por *S. clavuligerus* ATCC 27064, em frascos agitados 18
- Figura 4.2 – Experimento 9-** Esquema do Planejamento Fatorial 2² (configuração estrela) para investigar a influência da concentração inicial de L-lisina e α -cetoglutarato na produção de CPC totais 20
- Figura 4.3-** Etapas de cultivo em frascos agitados - 23
- Figura 4.4** - Procedimento de suplementação da fermentação principal dos experimentos 2, 5 e 7. 24
- Figura 5.1 - Experimento 1 (batelada)** – CPC totais e AC obtidos em meios contendo várias proporções de glicerol e amido, totalizando 14 g/L de substratos: A₁-8,4g/L amido e 5,6g glicerol; A₂- 9,8 g/L amido e 4,2 g/L glicerol; A₃.11,2 g/L amido e 2,8 g/L glicerol; A₄- 12,6 g/L amido e 1,4 g/L glicerol; A₅- 14 g/L amido. 25
- Figura 5.2 - Experimento 2 (com reposição de meio)** – CPC totais e AC obtidos em meios contendo L-lisina e várias fontes de N solúveis: M₁ - caseína de hidrólise ácida; M₂ - triptona tipo I (caseína de hidrólise enzimática); M₃ - extrato protéico de caroço de algodão (Proflo); M₄ - asparagina e tirosina. 26

- Figura 5.3 - Experimento 2 (com reposição de meio)** – Biomassa obtida em meios contendo L-lisina e várias fontes de N solúveis: **M1** - caseína de hidrólise ácida; **M2** - triptona tipo I (caseína de hidrólise enzimática); **M3** - extrato protéico de caroço de algodão (Proflo); **M4** - asparagina e tirosina. 27
- Figura 5.4 - Experimento 3 (batelada)** – Biomassa obtida em meios contendo como fontes de N solúveis: **M 1** - caseína de hidrólise ácida, Soytone e L-lisina; **M 2** - Proflo e L-lisina; **M 3** - "Tryptic Soy Broth" da Difco (TSB) 28
- Figura 5.5 - Experimento 3 (batelada)** – Consumo de amido em meios contendo como fontes de N solúveis: **M 1**- caseína de hidrólise ácida, Soytone e L-lisina; **M 2** - Proflo e L-lisina; **M 3** - "Tryptic Soy Broth" da Difco (TSB) 29
- Figura 5.6 - Experimento 4** - Resultados de biomassa (◇) e do consumo de amido (○) em meio contendo Proflo e L-lisina como fontes de N (Meio 2 do Experimento 3). 30
- Figura 5.7 - Experimento 4** - Resultados de CPC totais (■) em meio contendo Proflo e L-lisina como fontes de N (Meio 2 do Experimento 3). 30
- Figura 5.8 - Experimento 5 (com reposição de meio)** - Resultados de biomassa em meios suplementados com L-lisina (3 g/L) e várias concentrações de amido, obtidos com o mutante 32
- Figura 5.9 - Experimento 5 (com reposição de meio)** - Resultados de CPC totais em meios suplementados com L-lisina (3 g/L) e várias concentrações de amido, obtidos com o mutante *S. clavuligerus* DSMZ 41826 (Vining et al, 1987). 32
- Figura 5.10 - Experimento 6** - Resultados de CPC totais em meios contendo diferentes fontes de N: caseína de hidrólise ácida (■); caseína hidrólise enzimática ou Triptona tipo I (●); Soytone (▲); Proflo (▼). 34
- Figura 5.11 - Experimento 6** - Resultados de biomassa em meios contendo diferentes fontes de N: caseína de hidrólise ácida (■); caseína hidrólise enzimática ou Triptona tipo I (●); Soytone (▲); Proflo (▼). 35
- Figura 5.12 - Experimento 6** - Resultados do consumo de amido em meios contendo diferentes fontes de N: caseína de hidrólise ácida (■); caseína hidrólise enzimática ou Triptona tipo I(●); Soytone(▲); Proflo(▼). 35
- Figura 5.13 - Experimento 7-** Resultados de produção de CPC totais em meios adicionados de α -cetogluturato: 1mM (○) e 10mM (△) no início do processo e 1mM (▽) e 10mM (◇) em 72 horas de processo; condição controle, sem α -cetogluturato (□). 36

Figura 5.14 - Experimento 7 - Resultados de biomassa em meios adicionados de α -cetoglutarato: 1mM ($\circ$) e 10mM ($\triangle$) no início do processo e 1mM (∇) e 10mM ($\diamond$) em 72 horas de processo; condição controle, sem α -cetoglutarato ($\square$). 37

Figura 5.15 - Experimento 7 - Resultados de pH em meios adicionados de α -cetoglutarato: 1mM ($\circ$) e 10mM ($\triangle$) no início do processo e 1mM (∇) e 10mM ($\diamond$) em 72 horas de processo; condição controle, sem α -cetoglutarato ($\square$). 37

Figura 5.16 - Experimento 8 – 1º Planejamento Fatorial 2^2 com duplicata do ponto central -Resultados de biomassa em meios com diferentes combinações entre L-lisina e α -cetoglutarato: + - ($\blacksquare$); - - ($\bullet$); - + ($\oplus$); + + ($\boxtimes$); 0 0 ($\blacklozenge$) 0 0 ($\ast$); controle ($\boxtimes$) 39

Figura 5.17 - Experimento 8 – 1º Planejamento Fatorial 2^2 com duplicata do ponto central- Resultados CPC totais em meios com diferentes combinações entre L-lisina e α -cetoglutarato: + - ($\blacksquare$); - - ($\bullet$); - + ($\oplus$); + + ($\boxtimes$); 0 0 ($\blacklozenge$) 0 0 ($\ast$); controle ($\boxtimes$) 40

Figura 5.18 - Experimento 8- 1º Planejamento Fatorial 2^2 com duplicata do ponto central – Resultados de pH em meios com diferentes combinações entre L-lisina e α -cetoglutarato: + - ($\blacksquare$); - - ($\bullet$); - + ($\oplus$); + + ($\boxtimes$); 0 0 ($\blacklozenge$) 0 0 ($\ast$); controle ($\boxtimes$) 41

Figura 5.19 – Experimento 8- 1º Planejamento Fatorial 2^2 - Superfície de resposta ajustada - (A) tri e (B) bidimensional - e dados experimentais de concentração de CPC totais (mg/L) obtidos em 72 horas de processo *versus* concentrações de L-lisina e α -cetoglutarato; coeficiente de determinação igual a 0,98, a 95% de grau de confiança. 42

Figura 5.20 – Experimento 8- 1º Planejamento Experimental - Valores previstos *versus* observados 42

Figura 5.21 - Experimento 9 – 2º Planejamento Fatorial - Resultados de biomassa em meios com diferentes combinações entre L-lisina e α -cetoglutarato: - - ($\blacksquare$); + - ($\bullet$); - + ($\blacktriangle$); + + ($\blacklozenge$); $-\sqrt{2}$ 0 ($\blacklozenge$); $+\sqrt{2}$ 0 ($\boxtimes$); 0 $-\sqrt{2}$ ($\diamond$); 0 $+\sqrt{2}$ ($\boxtimes$); 0 0 ($\oplus$) e controle ($\square$) 43

Figura 5.22 - Experimentos 9 – 2º Planejamento Fatorial- Resultados de pH em meios com diferentes combinações entre L-lisina e α -cetoglutarato: - - ($\blacksquare$); + - ($\bullet$); - + ($\blacktriangle$); + + ($\blacklozenge$); $-\sqrt{2}$ 0 ($\blacklozenge$); $+\sqrt{2}$ 0 ($\boxtimes$); 0 $-\sqrt{2}$ ($\diamond$); 0 $+\sqrt{2}$ ($\boxtimes$); 0 0 ($\oplus$); 0 0 ($\oplus$); controle ($\square$) e controle ($\circ$) 44

Figura 5.23 - Experimento 9 – 2º Planejamento Fatorial - Resultados de CPC totais em meios com diferentes combinações entre L-lisina e α -cetoglutarato: - - ($\blacksquare$); + - ($\bullet$); - + ($\blacktriangle$);

$++ (\triangleup)$; $-\sqrt{2} \ 0(\blacklozenge)$; $+\sqrt{2} \ 0(\otimes)$; $0 -\sqrt{2} \ (\blacklozenge)$; $0 +\sqrt{2} \ (\otimes)$; $0 \ 0(\oplus)$; $0 \ 0 (\ominus)$; **controle** ($\square$) e **controle** ($\circ$)

45

Figura 5.24 – Experimento 9 - 2º Planejamento Fatorial 2²- Superfície de resposta ajustada - (A) tri e (B) bidimensional - e dados experimentais de concentração de CPC totais (mg/L) obtidos em 72 horas de processo *versus* concentrações de L-lisina e α -cetoglutarato; coeficiente de determinação igual a 0,73468, a 95% de grau de confiança.

46

Figura 5.25 – Experimento 9 - 2º Planejamento Experimental - Valores previstos *versus* observados de produção de CPC totais (mg/L) em 72 horas de processo.

46

Figura 5.26 - Experimento em biorreator- Resultados de biomassa obtido no Meio 1($\circ$) e no Meio 2 ($\blacklozenge$)

48

Figura 5.27 - Experimento em biorreator- Resultados da análise reológica do Meio 1($\circ$) e Meio 2 ($\blacklozenge$)

48

Figura 5.28- Experimento em biorreator -Resultados de consumo de amido obtidos no Meio 1 (meio-controle) ($\circ$) e no Meio 2 ($\blacklozenge$).

49

Figura 5.29 - Experimento 10- Resultados da produção de β -lactâmicos totais a partir do Meio 1($\circ$) e do Meio 2 ($\blacklozenge$)

50

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Composição do meio agar nutriente (Difco 0001).	10
Tabela 4.2 – Composição do meio de germinação ou reativação de micélios.	11
Tabela 4.3 – Composição geral dos Meios de Preparo de inoculo	11
Tabela 4.4 - Composição do MI utilizado nos Experimentos 1 e 2	11
Tabela 4.5 - Composição do MI utilizado nos Experimentos 3,4 e 6.	12
Tabela 4.6 - Composição do MI do Experimento 5.	12
Tabela 4.7 - Composição do MI dos Experimentos 7,8,9e10.	12
Tabela 4.8 -Composição geral dos Meios de Fermentação Principal MFP	12
Tabela 4.9 -Composição do MFP do Experimento 1	13
Tabela 4.10 - Composição dos MFP e do MS do Experimento 2	14
Tabela 4.11 – Composição dos diferentes MFP do Experimento 3.	15
Tabela 4.12 – Composição do meio-base de fermentação principal (MFP) e do MS do Experimento 5.	15
Tabela 4.13 - Composição dos MFP do Experimento 6.	16
Tabela 4.14 - Composição dos MFP do Experimento7.	16
Tabela 4.15 - Composição do meio base dos MFP dos Planejamentos Experimentais (Experimentos 8 e 9)	17
Tabela 4.16 - Experimento 8- Condições de variáveis independentes do Planejamento Fatorial 2^2 com duplicata do ponto central: concentrações iniciais de L-lisina (variável x_1) e de α -cetoglutarato (variável x_2) no meio de produção ou de fermentação principal.	17
Tabela 4.17 –Experimento 9- Condições das variáveis independentes do Planejamento Fatorial 2^2 , com duplicata do ponto central e configuração estrela: concentrações iniciais de L-lisina (variável x_1) e de α -cetoglutarato (variável x_2) no meio de produção.	19
Tabela 4.18 - Composição dos MFP do Experimento em biorreator	20

1) INTRODUÇÃO

Os grupos de antibióticos mais importantes clinicamente são os dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclina. Os β -lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas, atuam como inibidores da síntese da parede celular bacteriana, destacando-se tanto em virtude de sua importância histórica como clínica. A penicilina e a cefalosporina naturais, descobertas respectivamente em 1928 e 1948, são produzidas por fungos filamentosos e têm sido matéria prima para a obtenção de várias gerações de importantes compostos semi-sintéticos mais potentes, através de transformações químicas. No início da década de 1970, porém, foram descobertas novas classes de compostos β -lactâmicos comercialmente importantes sintetizados, principalmente, por bactérias da família dos Actinomicetos, como as dos gêneros *Streptomyces* e *Nocardia* (Elander, 2003; Brakhage, 1998).

A produção industrial de β -lactâmicos nos últimos 50 anos é um dos exemplos mais relevantes da Biotecnologia, rendendo vendas anuais em torno de 15 bilhões de dólares, equivalentes a 65% do mercado mundial de antibióticos. Esta produção ainda é centralizada em países da Europa, como Inglaterra e Alemanha, porém, com o aumento dos custos de mão de obra, energia e matéria prima, grande parte tem sido transferida para países como China, Coreia e Índia que, gradualmente, vêm tornando-se os maiores produtores mundiais (Elander, 2003).

Streptomyces clavuligerus produz vários compostos β -lactâmicos, como os antibióticos envolvidos na rota biossintética da cefalosporina C (penicilina N, deacetoxicefalosporina C e cefamicina C) e cerca de vinte clavams, entre os quais se destaca o ácido clavulânico (AC) que, embora não tenha atividade biológica significativa, é um potente inibidor de β -lactamases (Prues e Kellett, 1983; Brudtland, 2000). Dentre os antibióticos β -lactâmicos, destaca-se a cefamicina C (CefC), uma 7-metoxi-cefalosporina que apresenta maior atividade que a cefalosporina C por ser resistente a β -lactamases (penicilinas e cefalosporinas) (Liras, 1999; Brakhage et al, 2005). As estruturas do AC e da CefC estão ilustradas na Figura 1.1.

As rotas biossintéticas do AC e da CefC em *S. clavuligerus* (Figuras 1.2 e 1.3) são totalmente independentes, porém, mutantes de *S. clavuligerus* não produtores de CefC também não produzem AC (Sánchez e Braña, 1996). Bem recentemente, descobriu-se que as sínteses de AC e CefC são reguladas simultaneamente pelo elemento multifuncional

ccaR ("cephamycin and clavulanic acid Regulator"), codificada pelo gene *ccaR*, localizado no agrupamento de genes da biossíntese de CefC (Alexander e Jensen, 1998; Bignell et al., 2005). Apesar disto, é possível dissociar as sínteses destes compostos manipulando-se a presença/concentração de determinados compostos no meio de cultivo de *S. clavuligerus*, selecionados dentre fontes de C e energia, N, fosfato, enxofre, etc, que, segundo a literatura, atuam em maior ou menor grau como agentes reguladores da síntese de muitos antibióticos (Romero et al, 1984; Fang e Demain, 1995; Chen et al., 2002; Jensen et al., 2004).

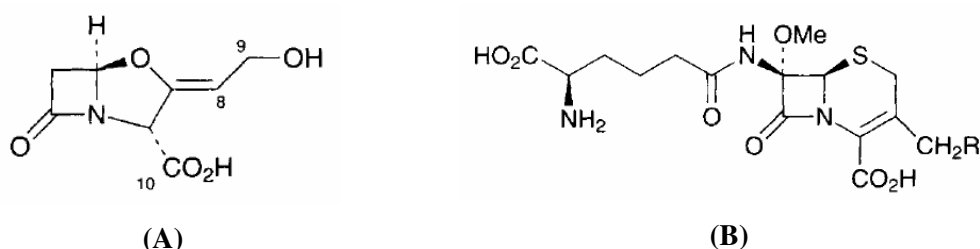


Figura 1.1 – Estrutura química de: (A) Ácido clavulânico (AC); (B) Cefamicinas - na cefamicina C (CefC), o radical R é OCONH₂.

Por outro lado, para se induzir uma via biossintética para obtenção de determinado metabólito secundário em *S. clavuligerus* deve-se considerar a relativa dissociação entre a principal fase de produção deste tipo de metabólitos (idiofase) e a fase exponencial de crescimento (trofofase), de forma que a produção é favorecida em condições adversas ao pleno desenvolvimento celular. Tais condições também podem ser obtidas variando-se os componentes do meio durante a idiofase de forma a induzir a manutenção celular sob condições limitantes mais ou menos severas de nutrientes (Demain, 1984; Rollins et al., 1989; Fang e Demain, 1995).

A regulação da biossíntese de metabólitos secundários é similar à dos primários, envolvendo mecanismos de indução, regulação por retroalimentação e regulação catabólica. A ativação de uma via biossintética para a produção de antibióticos β -lactâmicos em *S. clavuligerus* é regulada de forma complexa, podendo ser influenciada pela natureza e concentração das fontes de C, N, fósforo, enxofre. Certos compostos

estimulam a produção de AC, como arginina ou ornitina, enquanto outros favorecem a produção de CefC, como a L-lisina, convertida em ácido α - aminoadípico em procariotos produtores de CefC, tiosulfato de sódio, que fornece o átomo de S da molécula de produto, bem como succinato de sódio, α -cetoglutarato, citrato de sódio, entre outros compostos do metabolismo primário que são intermediários do metabolismo secundário (Omstead et al., 1985; Khetan et al., 1999).

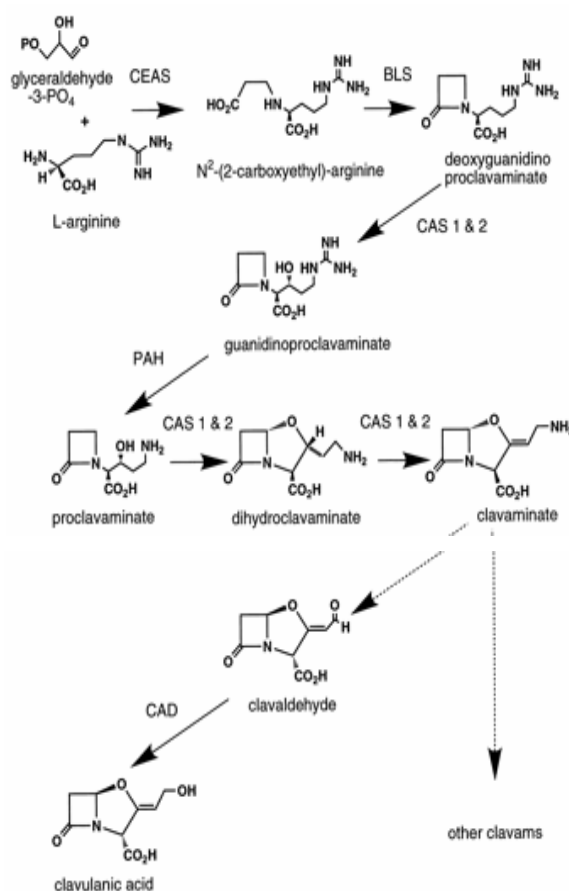


Figura 1.2 - Rota biossintética em *Streptomyces clavuligerus* de formação de ácido clavulânico (AC) (CEAS – N-carboxiacetilarginina sintase, BLS – β -lactam sintetase, PAH – proclavaminato amidinohidrolase, CAS – clavaminato sintase, CAD – clavaldeído desidrogenase) (Jensen et al., 2000).

2) OBJETIVOS

Este trabalho teve como principal objetivo formular um meio de cultivo de *S. clavuligerus* adequado para a produção de CefC, investigando-se qualitativa e/ou quantitativamente a influência de determinados compostos no processo selecionados com base em dados da literatura.

Para atingir este objetivo, foram realizadas as seguintes etapas:

- Seleção da fonte de carbono (C) e energia do meio de produção;
- Seleção da melhor fonte de nitrogênio (N) do meio de produção;
- Investigação da influência conjunta de α -cetoglutarato e L-lisina no processo de produção de CefC (expressa como CPC totais), através de Metodologia de Planejamento Fatorial 2²;
- Avaliação do melhor meio de produção, obtido em frascos agitados, em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 5 L de volume útil.

3) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

S. clavuligerus produz CefC em meios quimicamente definidos contendo uma variedade de fontes de C, N e fosfato (Aharonowitz e Demain, 1977, 1978, 1979). No entanto, a natureza e a concentração das fontes de N, C e fosfato têm uma influência marcante no rendimento assim como na relação entre biomassa e produção acumulada (Hu et al.1984).

3.1) Influência das Fontes de carbono e energia na produção de CefC

Normalmente, os metabólitos secundários são produzidos de forma dissociada do crescimento em meios sintéticos e, assim, sua biossíntese é favorecida por condições desfavoráveis ao pleno desenvolvimento do microrganismo. Em relação ao *S. clavuligerus*, a extensão do crescimento aumenta linearmente com o aumento da concentração de glicerol. Quando esse se encontra em baixas concentrações, a produção dos metabólitos secundários aparece associada ao crescimento, contudo, em concentrações acima de 0,2% observa-se uma distinta separação entre crescimento e metabolismo secundário. (Aharonowitz e Demain, 1978; Demain, 1984; Rollins et al., 1989; Fang e Demain, 1995).

Comparando-se crescimento e produção em glicerol e amido, Aharonowitz e Demain (1978) observaram que, enquanto a utilização de glicerol leva a uma típica relação bifásica, o amido é caracterizado por uma relação bem estreita entre produção e crescimento, ou seja, não há distinção entre trofofase e idiofase. Além disso, o amido propicia uma produção específica alta, pois o rendimento celular é menor neste substrato, comparativamente a outras fontes como maltose ou glicerol. A estreita relação entre produção e crescimento é creditada ao fato de que o amido é hidrolisado lentamente, em comparação a outras fontes de C e energia, gerando uma situação de limitação pelo C, a qual é mais favorável à produção.

Aharonowitz & Demain (1978) testaram várias fontes de C (a 0,5% w/v) como substrato limitante na produção de cefalosporinas por *S. clavuligerus* (amido solúvel, maltose, glicerol, lactose, galactose, glicose, ribose e celulose) em meio sintético contendo asparagina como fonte de N (0,2% w/v). Estes autores constataram que amido, maltose e glicerol propiciaram o melhor crescimento, mas o amido foi o mais favorável à produção. Lebrihi et al (1988) constataram que o glicerol resultou em produção de CefC final aproximadamente 40 % menor do que aquela obtida com o amido.

3.2) Influência das Fontes de nitrogênio na produção de CefC

Além das fontes de C e energia, as fontes de N têm papel importante na produção de metabólitos secundários. Em relação a *S.clavuligerus*, fontes orgânicas de N (aminoácidos, extratos protéicos) são mais adequadas ao desenvolvimento celular do que fontes inorgânicas de N (sais de amônio). Bons exemplos de extratos protéicos são os de caroço de algodão e de soja, além de caseínas (Kieser et al., 2000; Trovatti et al., 2006).

3.3) Compostos estimuladores da biossíntese de cefalosporinas

Os aminoácidos têm papel fundamental na rota biossintética de CefC. A L-lisina, é um bom exemplo disso. Sua presença nos meios de cultura quimicamente definidos, pode levar a um aumento da produção específica de até 75% (Mendelowitz e Aharonowitz, 1982). Esse aumento significativo deve-se à conversão da L-lisina em ácido L- α -aminoadípico pela L-lisina ϵ -aminotransferase (LAT). A LAT é a primeira enzima da rota biossintética de antibióticos β -lactâmicos em espécies de *Streptomyces* produtoras.

Assim como a L-lisina, o α -cetoglutarato também exerce papel importante na biossíntese de cefalosporinas, atuando como cofator da LAT e de outras enzimas da rota, como a expandase, e a hidroxilase, como se pode observar pela Figura 3.1 (Khetan et al, 1999).

Segundo Aharonowitz e Demain (1978), o α -cetoglutarato pode ser usado como fonte de C e energia, crescimento e produção. Assim, o α -cetoglutarato também pode ser utilizado como uma fonte secundária de C e energia, além de co-fator enzimático, quando presente em meios de cultivo.

Além de co-fatores e aminoácidos, estão envolvidos na biossíntese de CefC outros compostos importantes como o tiosulfato de sódio, MOPS e fosfatos. O tiosulfato de sódio (a 4 mM) é utilizado, uma vez que é eficientemente incorporado à molécula do antibiótico (Merck and Co., 1975), mesmo em concentrações milimolares. 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, enquanto 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 and Co., 1975, 1976; Omstead et al, 1985).

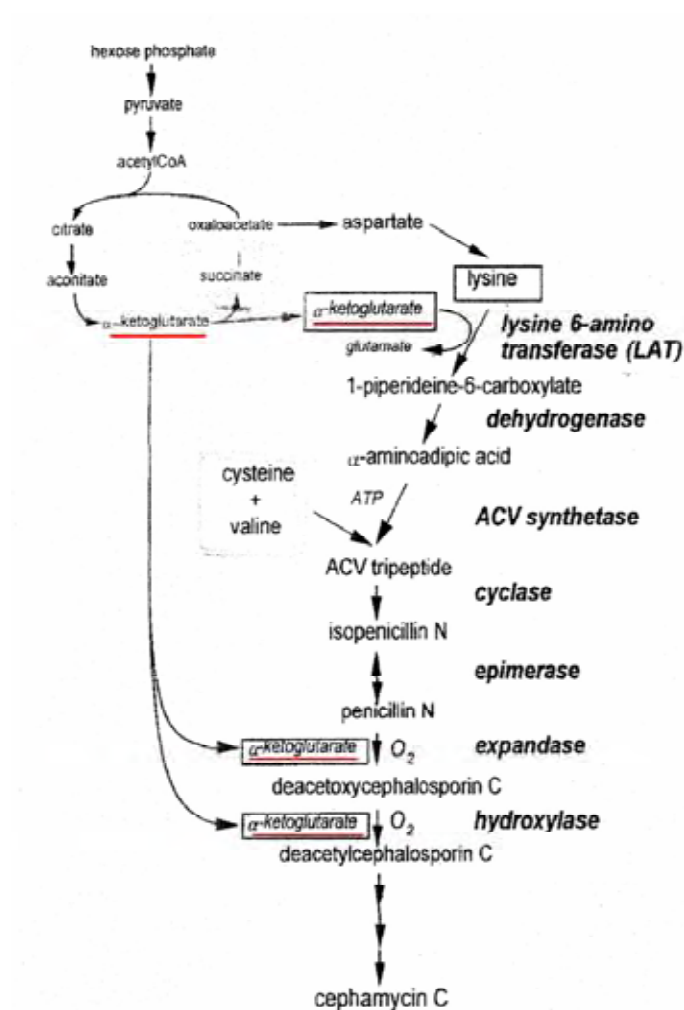


Figura 3.1 - Rota biossintética de Cef.C em *S.clavuligerus*. L-lisina, cisteína e valina são os três precursores primários para a biossíntese da Cef.C. O α -cetoglutarato é usado como co-fator para quatro enzimas da rota, aqui este papel é demonstrado para três destas enzimas. (Khetan et.al., 1999).

Por outro lado, a biossíntese da CefC e de outros antibióticos β -lactâmicos por *S. clavuligerus* mostrou-se pouco sensível à regulação pelo fosfato, como verificado por vários pesquisadores (Aharonowitz e Demain, 1977; Martín e Aharonowitz, 1983). Em contrapartida, Lebrihi et al. (1987) mostraram que a produção de CefC é controlada pela concentração de fosfato, uma vez que este reprimiu a biossíntese de enzimas envolvidas em sua rota biossintética, como a cefamicina sintetase e a expandase. A atividade específica de cefamicina sintetase foi máxima com a concentração de fosfato em torno de

10 mM, enquanto que a atividade específica da expandase foi máxima com apenas 1 mM de fosfato. A correlação existente entre a atividade específica das enzimas foi 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.

3.4) Disponibilidade de oxigênio dissolvido

O volume reacional é uma condição importante para o processo como um todo. Uma boa oxigenação é fundamental para a produção de CefC. Condições limitantes de oxigênio dissolvido afetam principalmente a expandase, enzima responsável pela expansão do anel tiazolidina da penicilina N para o anel dihidrotiazina das cefalosporinas (Lebrihi et al., 1988).

Segundo Okabe et al. (1992), volumes menores de meio de cultura e boas condições de agitação de processo em frascos agitados, resultam em menores concentrações de penicilina N, um intermediário indesejável na produção de CefC e, por isso, favorecem sobremaneira a produção deste último. Estes autores testaram vários volumes de meio em frascos Erlenmeyer de 500 mL e indicaram um volume de 15 mL de meio a uma velocidade de agitação de 220 rpm para frascos agitados com excentricidade de raio de 2,5 cm, como sendo uma condição favorável a boa produção.

4) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) MATERIAIS

4.1.1) Microrganismos

No processo de produção de compostos β -lactâmicos foi utilizadas as linhagens ATCC 27064 de *S. clavuligerus* (Butterworth, 1984), adquirida da própria ATCC na forma de células vegetativas (micélios) liofilizadas, e também a linhagem DSMZ 41826, um mutante espontâneo da linhagem selvagem, com maior capacidade produtiva, adquirida também na forma liofilizada. Este mutante mostrou ser melhor produtor de CefC (Vining et al, 1987).

Para o bioensaio utilizou-se a *Escherichia coli* ESS 2235, como bactéria teste, a qual foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Paloma Liras, da Faculdade de Biologia da Universidade de Leon, Espanha (Liras e Martin, 2005).

4.1.2) Meios de Cultura

Deve-se estabelecer uma composição adequada dos meios de cultura, em especial do meio de fermentação principal, que favoreça o processo como um todo (boa biomassa, boa produção), uma vez que os cultivos microbianos para a obtenção de metabólitos secundários são normalmente caracterizados pela dissociação relativa das fases de crescimento celular (trofofase) e de síntese de produto (idiofase).

(a) Meio sólido de cultivo de bactérias-teste

Para o cultivo da *E. coli* ESS 2235, foi utilizado meio ágar nutriente (Difco 0001), indicado pela ATCC. Após período e temperaturas adequados de crescimento em estufa, os cultivos podem ser mantidos sob refrigeração (4°C) por até 2 meses.

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

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona	5,0
Extrato de Carne	3,0
Agar bacteriológico	15,0
pH	6,8 $\pm$ 0,1
Água destilada em q.s.p.	1000 mL

(b) Meio de Reativação ou Germinação (MR)

O meio utilizado para germinação de esporos ou reativação de micélios congelados de *S. clavuligerus* (conservados a -70°C em solução crioprotetora 20% glicerol v/v) foi o indicado pela ATCC (meio ISP1), adicionado de extrato de malte (Kieser et al, 2000).

Tabela 4.2.– Composição do meio de germinação ou reativação de micélios

Componentes	Concentração (g/L)
Triptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	10,0
MOPS	21,0
pH	6,8 $\pm$ 0,1

(c) Meios de cultivo submerso - preparo de inóculo (MI)

Tabela 4.3.– Composição geral dos Meios de Preparo do Inóculo (MI)

Componentes	Concentração (g/L)
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

*solução de sais, g/L: MnCl₂·4H₂O, 1,0; FeSO₄·7H₂O, 1,0; ZnSO₄·7H₂O, 1,0.

As fontes de C e N dos meios de preparo do inóculo principal (Tabelas 4.4 a 4.7) e de produção foram as mesmas dos meios de produção (fermentação principal), de forma a ambientar previamente o microrganismo e, assim, diminuir a fase lag.

Tabela 4.4.– Composição do MI utilizado nos Experimentos 1 e 2.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicerol	15,0
Soytone	15,0

Tabela 4.5- Composição do MI utilizado nos **Experimentos 3 ,4 e 6.**

Componentes	Concentração (g/L)
Amido solúvel	10,0
Soytone	15,0

Tabela 4.6- Composição do MI utilizado no **Experimento 5.**

Componentes	Concentração (g/L)
Amido solúvel	10,0
Proflo	10,0

Tabela 4.7. -Composição do MI dos **Experimentos 7, 8, 9 e 10.**

Componentes	Concentração (g/L)
Amido solúvel	10,0
Proflo	8,5

(d) Meios de Fermentação Principal (MFP), Meios Suplementares (MS) e meios utilizados nos Planejamentos Fatoriais.

Tabela 4.8.- Composição geral dos Meios de Fermentação Principal MFP

Componentes	Concentração (g/L)
Amido [#]	10
Proflo*	8,5
Extrato de levedura	0,5
Tiosulfato de sódio ^{(a) **}	1,0
K ₂ HPO ₄ **	1,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75
CaCl ₂	0,2
NaCl [#]	2,0
MOPS	21,0
Solução de sais ^{(b)**}	5,0 mL

(a) adicionado após 30 horas de processo

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

[#] a partir do **Experimento 2.**

* a partir **do Experimento 4.**

** variações dessas quantidades estão demonstradas nas Tabelas, quando necessário.

O Experimento 1 teve como objetivo avaliar a influência da proporção de glicerol e amido na produção de CPC totais. Para tanto foram utilizadas cinco combinações diferentes de concentração dos carboidratos, respeitando-se sempre uma concentração final de 14 g/L.

Tabela 4.9.- Composição dos MFP do Experimento 1

Meio	A1	A2	A3	A4	A5
Componentes	Concentração (g/L)				
Amido solúvel	8,4	9,8	11,2	12,6	14,0
Glicerol	5,6	4,2	2,8	1,4	–
Soytone			12		
L-lisina			3		
Extrato de malte			0,5		

O Experimento 2 teve por objetivo avaliar a influência de diferentes fontes de N na produção de CPC totais e também a possibilidade de estender a fase de produção através de suplementação de nutrientes.

Tabela 4.10.- Composição dos MFP e do MS do Experimento 2

	Meios	M1	M2	M3	M4
	Concentração (g/L)				
Fonte de N investigada					
Caseína (hidrolisada ácida)		10,5	–	–	–
Tryptona Tipo I (Caseína HiMedia)		–	6,2	–	–
Extrato protéico de algodão Proflo		–	–	8,5	–
L-asparagina		–	–	–	1,0
L-tirosina		–	–	–	0,8
L-lisina		1,83	1,83	1,83	3,5
Outros componentes					
		(M1, M2 e M3)			(M4)
Tiossulfato de sódio		0,2			–
K ₂ HPO ₄		1,75			1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0,75			1,0
CaCl ₂ · 2H ₂ O		0,2			0,2
NaCl		2,0			1,0
Solução de sais ^(b)		1 mL			1 mL
Componentes do meio suplementar ^(c)					
Amido solúvel		20,0			–
L - L-lisina		4,9			–
Tiossulfato de sódio		4,2			–
Razão C/N resultante		10,2			–

(a) adicionado em todos os meios

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

(c) 5% de água de torneira na composição final.

Os Experimentos 3 e 4 tiveram como objetivo avaliar o consumo de amido durante o processo fermentativo. No primeiro, utilizaram-se diferentes fontes de N. Para tanto se utilizaram meios que apresentaram bons resultados em trabalhos paralelos do laboratório e em experimentos anteriores (M2e M3), além de uma combinação de fontes de N não testadas anteriormente. No Experimento 4 utilizou-se o meio M2 do Experimento 3, de forma a se reavaliar a eficiência do método de análise de amido.

Tabela 4.11.– Composição dos diferentes MFP do **Experimento 3**

Meios	M1	M2 ^(a)	M3
Componentes	concentração (g/L)		
Solução de sais ^(b)		1,0 mL	
Proflo	–	8,5	–
Soytone	1	–	–
Caseína (hidrólise ácida)	9,3	–	–
TSB ^(c)	–	–	30,0
	(M1, M2)		(M3)
L-lisina	1,83		–
Tiosulfato de sódio ^(d)	0,5		0,5
K ₂ HPO ₄	0,875		–

(a) mesmo meio do **Experimento 4**

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

(c) *Tryptic Soy Broth* (Difco)

(d) adicionado após 30 horas de processo

O Experimento 5 teve como objetivo avaliar a capacidade produtiva da linhagem DSMZ em meio suplementado com amido em cinco diferentes concentrações e também a influência desta suplementação no processo de um modo geral.

Tabela 4.12. – Composição do MFP e do MS do **Experimento 5**

Componentes do meio-base	Concentração (g/L)					
L-lisina		1,83				
K ₂ HPO ₄		0,875				
Tiosulfato de sódio		0,5				
Componentes do meio suplementar ^(a)	condição controle	5a	5b	5c	5d	5e
Concentração (g/L)						
Amido solúvel	–	15	20	25	30	35
L-lisina	–			3,0		
MOPS	–			21,0		
Razão C/N	–	13,0	17,4	21,7	26,0	30,4

(a) 5% água de torneira na composição final

O Experimento 6 foi realizado em batelada utilizando-se os mesmos meios do Experimento 2, tendo como objetivo reavaliar a influência das fontes de N no processo sem suplementação de meio. A concentração de L-lisina também foi aumentada para 100 mM.

Tabela 4.13.- Composição dos MFP do Experimento 6

Meios	M1	M2	M3	M4
Componentes	Concentração (g/L)			
Caseína (hydr. ácida).	10,5	—	—	—
Tryptona Tipo I (Caseína HiMedia)	—	6,2	—	—
Soytone	—	—	8,5	—
Proflo	—	—	—	8,5
Em todos os meios:				
L-lisina	18,3 (100 mM)			

O Experimento 7 teve como objetivo investigar a influência de α -cetoglutarato na produção de CPC totais, adicionando-se o composto no início ou em um instante intermediário do processo fermentativo após a fase exponencial de crescimento.

Tabela 4.14. -Composição dos MFP do Experimento7

Componentes do meio base		Concentração (g/L)				
L-lisina			18,3			
	Meios	condição controle	1	2	3	4
Componentes do meio suplementar ^(a)		Concentração (g/L)				
α -cetoglutarato de Na	—	1mM	10mM	1mM	10mM	
(no frasco, a cada adição):						
Instante da adição	—	no início	no início	72 horas	72 horas	
Amido solúvel ^(b)		30,0				
MOPS ^(b)		21,0				

(a) 20 % de água de torneira na composição final

(b) adicionado em todos os meios

Os Experimentos 8 e 9 tiveram como objetivo investigar o comportamento do processo através da adição de várias concentrações combinadas de α -cetoglutarato e L-lisina, com ênfase para a produção de CPC totais. Para isto, utilizou-se a metodologia de Planejamento Fatorial 2^n (Box et al., 1978). Nestes planejamentos experimentais foram fixados 2 níveis de concentração (-1 e $+1$, em unidades codificadas) para as $n = 2$ variáveis independentes (concentrações de α -cetoglutarato e L-lisina). Além das combinações possíveis, também foram realizadas replicatas da condição central de concentrações (condição 0 0, em unidades codificadas).

Tabela 4.15.- Composição do meio-base dos MFP dos Planejamentos Experimentais (Experimentos 8 e 9) - *idem* à Tabela 4.8.

Tabela 4.16.- Experimento 8- Condições das variáveis independentes do Planejamento Fatorial 2^2 , com duplicata do ponto central: concentrações iniciais de L-lisina (variável x_1) e de α -cetoglutarato (variável x_2) no meio de produção ou de fermentação principal.

Ensaio	Variável codificada		Variáveis reais (no meio de cultura, a cada adição)			
	x_1	x_2	C_{Lis}		C_{α} cetoglutarato	
			mM	g/L	mM	g/L
1	+1	-1	80	14,64	70	10,22
2	-1	-1	10	1,83	70	10,22
3	-1	+1	10	1,83	110	16,06
4	+1	+1	80	14,64	110	16,06
5 e 6	0	0	45	8,23	90	13,14
7 e 8	condição controle		100	18,3	-	-

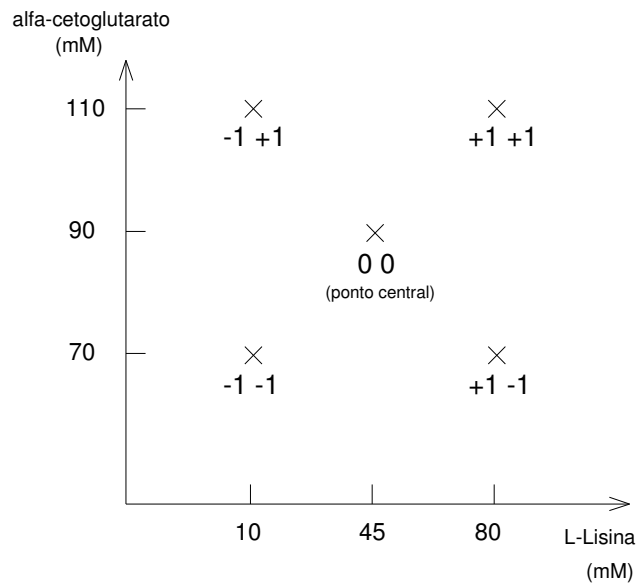


Figura 4.1 -Experimento 8 – 1º Planejamento Fatorial 2² com duplicata do ponto central - condições de concentração de L-lisina e α -cetoglutarato no meio de produção de CPC totais por *S. clavuligerus* ATCC 27064, em frascos agitados.

Tabela 4.17. –Experimento 9- Condições das variáveis independentes do Planejamento Fatorial 2^2 , com duplicata do ponto central e configuração estrela: concentrações iniciais de L-lisina (variável x_1) e de α -cetoglutarato (variável x_2) no meio de produção.

Ensaio	Variável codificada		Variáveis reais (no meio de cultura, a cada adição)			
	x_1	x_2	C_{Lis}	C_{α} cetoglutarato		
			mM	g/L	mM	g/L
1	-1	-1	60	11,0	12	1,8
2	+1	-1	100	18,3	12	1,8
3	-1	+1	60	11,0	55	8,0
4	+1	+1	100	18,3	55	8,0
5	$-\sqrt{2}$	0	51,7	9,5	33,5	4,9
6	$+\sqrt{2}$	0	108,3	19,8	33,5	4,9
7	0	$-\sqrt{2}$	80	14,65	3,1	0,5
8	0	$+\sqrt{2}$	80	14,65	63,9	9,3
9 e 10	0	0	80	14,65	33,5	4,9
11 e 12	Condição controle		100	18,3	-	-

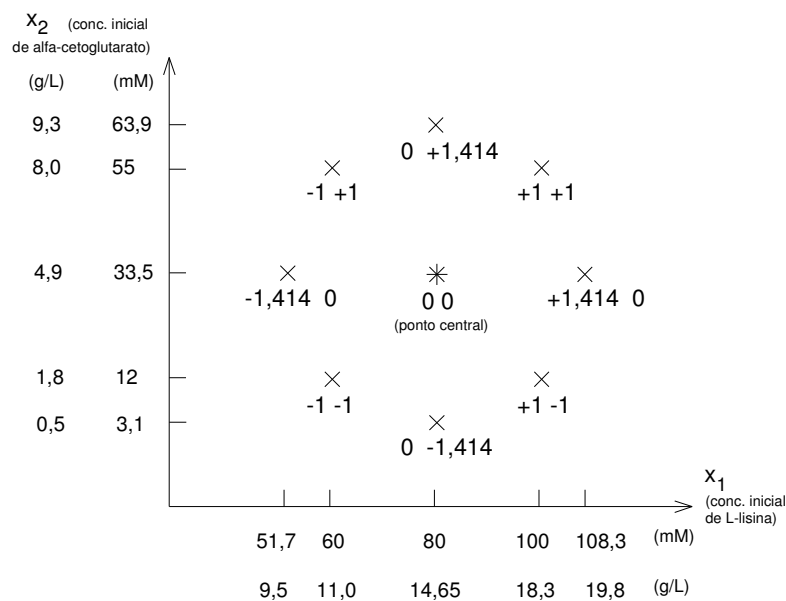


Figura 4.2- Experimento 9- Esquema do Planejamento Fatorial 2² (configuração estrela) para investigar a influência da concentração inicial de L-lisina e α-cetoglutarato na produção de CPC totais.

O Experimento realizado em biorreator, operado em batelada, teve como objetivo confirmar resultados de produção de CPC totais obtidos nos melhores meios de produção utilizados nas fermentações em frascos agitados.

Tabela 4.18. -Composição dos MFP do Experimento em biorreator.

Componentes	Meio 1	Meio 2
	Concentração (g/L)	
α-cetoglutarato	—	8,0
Nos dois meios:		
L-lisina	18,3	

4.1.3) Equipamentos

Equipamentos para as fermentações:

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

- Biorreator convencional

Para o experimento em fermentador convencional tipo tanque agitado e aerado, foi utilizado o fermentador modelo Bioflo III da New Brunswick Co., de 5 litros de volume útil, equipado com sistemas de monitoramento e/ou controle e de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, velocidade de agitação.

Equipamentos e aparelhos para procedimentos gerais e analíticos:

- Espectrofotômetro (UV e luz visível)
- Câmara de fluxo laminar, balanças, estufas, pHmetros, autoclaves, bombas peristálticas, centrífuga refrigerada, banhos termostatizados.
- Microcomputadores para o tratamento dos dados experimentais

4.2) MÉTODOS

4.2.1) Métodos analíticos

a. Determinação da concentração celular

A biomassa foi determinada através de dois procedimentos:

- 1) filtração das amostras a vácuo através de membranas Millipore de 4,5 cm de diâmetro, porosidade 0,45 µm, previamente pesadas;
- 2) centrifugação (10.000 rpm) da amostra (a 10°C) seguida de lavagem das células decantadas com água destilada

Em ambos os procedimentos, o sobrenadante resultante foi armazenado em "freezer" (-20°C) para as demais análises e o material celular era seco a 105°C por 18–24 horas em recipientes previamente pesados sendo, após resfriado em recipiente dessecador, pesados em temperatura ambiente. A biomassa foi expressa como massa seca de células por volume de meio reacional (g de células/L de amostra).

b. Determinação da concentração de AC

O método utilizado proposto por Bird et al. (1982), baseia-se na derivatização prévia de solução contendo AC (2 a 50 mg/L) com imidazol (60 g/L) a 30°C por 30 minutos. Após resfriada a solução em banho termostatizado a 20°C, determina-se o produto da reação (*1-(4-aza-8-hydroxy-6-oxo) oct-2-en-1-oylimidazol*) através de leitura em espectrofotômetro UV, a 312 nm. Este método é específico para AC na presença de produtos de degradação.

Derivados do AC e outros compostos contendo o núcleo clavam respondem bem às condições de análise, mas penicilinas praticamente não são detectadas pelo método.

c. Determinação da concentração de CPC totais Bioensaio de difusão em ágar

A indisponibilidade do padrão de CefC criou a necessidade de se utilizar um método indireto de quantificação deste composto. A CefC foi indiretamente quantificada através de bioensaio de difusão em ágar utilizando-se a cefalosporina C como padrão e a linhagem de *E. coli* ESS 2235 (Liras e Martin, 2005) como bactéria-teste. A CefC é cerca de 3 vezes mais potente que a cefalosporina C (Aharonowitz e Demain, 1978).

A concentração de cefalosporinas totais da amostra (em mg/L) foi determinada por interpolação logarítmica entre as medidas dos diâmetros dos halos de inibição obtidos com as amostras e as soluções do antibiótico padrão.

d. Análise de ART (Açúcares Redutores Totais)

O método utilizado consiste da hidrólise ácida, de 1 mL de sobrenadante previamente diluído. Para tanto, usa-se mesmo volume de HCl 10N, sendo a mistura colocada em banho maria por 30 minutos. Após período de resfriamento, acrescenta-se 1 mL de NaOH 10N. Dessa mistura, agora neutralizada, retira-se 1 mL e coloca-se mesmo volume de DNS. Novamente utiliza-se banho-maria por 5 minutos e após completo resfriamento, acrescenta-se H₂O destilada em quantidade suficiente para um volume final de 10 mL. Após homogeneização, faz-se leitura em espectrofotômetro UV a 540nm.

A concentração final de amido (em g/L) é determinada pela curva de calibração:

$$C_{\text{amido}} = (A * \text{Abs} - B) * \text{fator de diluição}$$

onde A e B são os parâmetros da equação da reta ajustada.

4.2.2) PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Condições gerais dos cultivos submersos

Os cultivos submersos dos experimentos 1 a 9 foram realizados em frascos agitados em mesa rotatória - incubadora a 260 rpm, 28°C, e pH inicial $6,8 \pm 0,1$. Apenas o Experimento 10 foi realizado em biorreator de bancada, nas mesmas condições de temperatura e pH dos frascos agitados.

Pré-culturas

- Germinação de esporos ou reativação de micélios

Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de meio de germinação ou de reativação foram inoculados com suspensão de células provenientes de criotubos (3 a 4 mL cada um) de forma a se obter 10% em volume de suspensão celular por volume final de meio. O germinado reativado foi obtido após 24 horas em mesa rotatória-incubadora.

- Preparo do inóculo principal

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

Fermentação principal

A fermentação principal para a produção de compostos β -lactâmicos foi realizada em batelada, por um período de 72 a 144 horas. Em cada frasco foram adicionados, 10% de inóculo. A seqüência de pré-culturas dos processos fermentativos e os procedimentos da fermentação principal estão esquematizados na Figura 4.3.

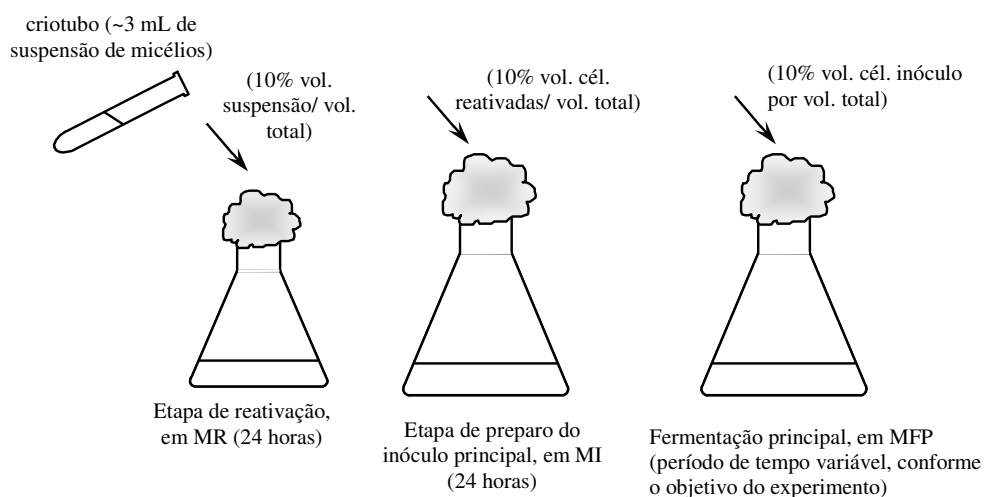


Figura 4.3 – Etapas de cultivo em frascos agitados

Os experimentos 1, 3 e 4 consistiram de bateladas em 40 mL de MFP, sendo que o mesmo processo, agora em 20 mL de MFP ocorreu nos experimentos 6, 8 e 9. Já, os experimentos 2, 5 e 7 consistiram de bateladas alimentadas, mantendo-se o volume

reacional constante em 45 e 20 mL de MFP, respectivamente. Todos estes experimentos supracitados foram realizados em frascos agitados.

Um último experimento foi realizado em biorreator de bancada (4 L de meio) com o objetivo de se confirmar os dados obtidos em experimentos de frascos agitados. O processo em biorreator propicia um maior número de amostras e, desta forma, uma avaliação mais da influência positiva ou da ausência de influência do α -cetoglutarato na produção de CPC totais, uma vez que este equipamento proporciona controle de pH e uma concentração de O_2 diluído mais controlada.

As amostras de todos os experimentos foram submetidas a análises de pH, concentração de células (biomassa) e de CP totais; a análise de ART restringiu-se aos experimentos. 3, 4, 6 e 10 (biorreator); e a análise da concentração de AC, aos experimentos 1 e 2.

A suplementação de meio foi feita de forma diferenciada, conforme o objetivo de cada experimento (Figura 4.4). A suplementação do experimento 2 foi iniciada a partir de 72 horas, a cada 24 horas, e finalizada em 120 horas, com taxa de diluição $D \cong 0,005 \text{ h}^{-1}$. Nos experimentos 5 e 7, o meio foi suplementado a partir de 48 horas, a cada 24 horas até o período de 96 horas, com taxa de diluição de $D \cong 0,01 \text{ h}^{-1}$.

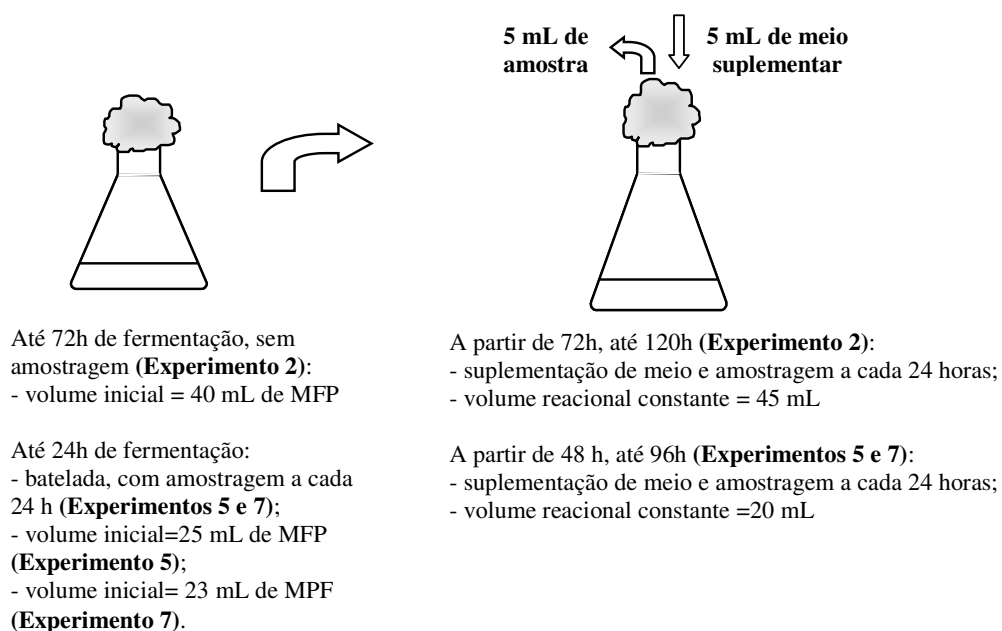


Figura 4.4 - Procedimento de suplementação de meio da fermentação principal dos Experimentos 2, 5 e 7.

5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1) Experimento 1 – Seleção da fonte de C no meio de produção

Neste experimento foram avaliados o crescimento celular e a produção de CPC totais em meios contendo diferentes proporções de amido e glicerol. Os resultados das bateladas estão apresentados na Figura 5.1. Embora a produção de CPC totais não tenha sido satisfatória em nenhum caso, os valores mais significativos foram obtidos nos meios contendo maior proporção de amido. Os dados estão de acordo com a observação de vários pesquisadores de que a lenta e contínua hidrólise do amido pelo microrganismo simula condições de limitação pelo C evitando, assim, mecanismos de repressão e/ou inibição da síntese de metabólitos secundários causados pelo excesso de fontes de C facilmente assimiláveis, como o glicerol (Aharonowitz e Demain, 1978; Lebrihi et al, 1988). A análise de biomassa apresentou problemas e os resultados não se mostraram coerentes (dados não apresentados). A partir do experimento seguinte, adotou-se o amido solúvel como principal fonte de C e energia do meio de produção.

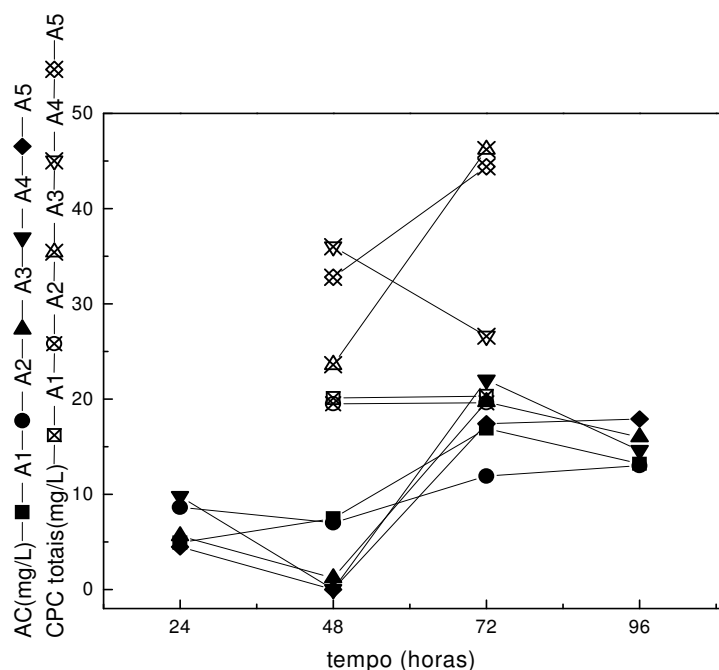


Figura 5.1.- Experimento 1 (batelada) – CPC totais e AC obtidos em meios contendo várias proporções de glicerol e amido, totalizando 14 g/L de substratos : A₁-8,4g/L amido e 5,6g glicerol; A₂- 9,8 g/L amido e 4,2 g/L glicerol; A₃-11,2 g/L amido e 2,8 g/L glicerol; A₄- 12,6 g/L amido e 1,4 g/L glicerol; A₅- 14 g/L amido.

5.2) Experimento 2 – Seleção da fonte de N do meio de produção

Neste conjunto de ensaios, investigou-se a influência de várias fontes solúveis de N na produção de CPC totais após 72 horas de processo, ou seja, durante a fase estacionária. Procurou-se limitar o crescimento celular para contornar a limitação pelo oxigênio gás-líquido nos frascos durante a fermentação. Para isto, utilizou-se uma concentração inicial do substrato limitante (amido) suficiente para se obter uma biomassa entre 5 e 7 g/L, considerando-se o mesmo rendimento celular médio de $Y_{X/S} = 0,5$ g de células/g de glicerol obtido em meio contendo glicerol (Gouveia et al, 2001). A concentração da fonte de N foi estimada considerando-se uma razão mássica C : N = 5 baseada em fórmula molecular empírica proposta por Bushell e Fryday (1983) para espécies de *Streptomyces*. Para estender a fase estacionária, propôs-se um processo contínuo intermitente através do qual se coletava um determinado volume de amostra a cada 24 horas e, em seguida, repunha-se mesmo volume de meio suplementar mantendo-se, assim, o volume reacional constante em 45 mL, a $D \cong 0,005 \text{ h}^{-1}$ (item 4.2.2). O meio suplementar continha, além de amido, adicionado como fonte de energia para a manutenção celular, tiosulfato de sódio e L-lisina em concentrações estimadas com base na literatura (Merck and Co., 1975; Mendelowitz e Aharonowitz, 1982).

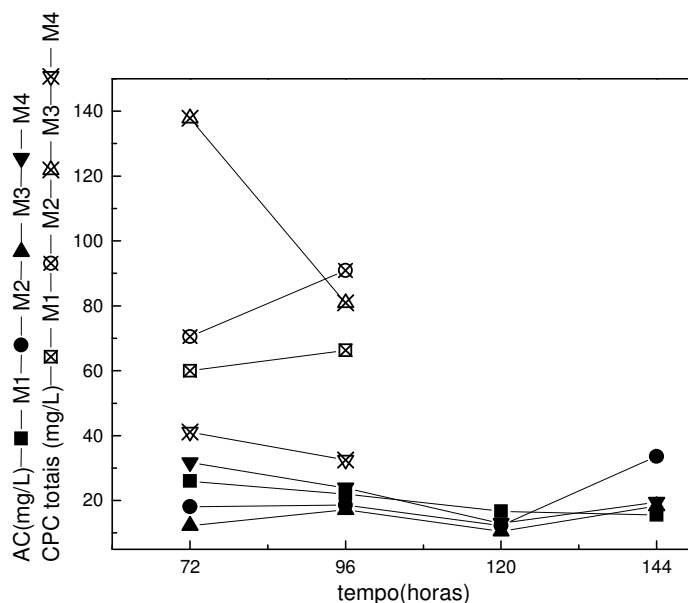


Figura 5.2- Experimento 2 (com reposição de meio) – CPC totais e AC obtidos em meios contendo L-lisina e várias fontes de N solúveis: M1 - caseína de hidrólise ácida; M2 - triptona tipo I (caseína de hidrólise enzimática); M3 - extrato protéico de caroço de algodão (Proflo); M4 - asparagina e tirosina

Através da Figura 5.2, observa-se que o extrato protéico de semente de algodão Proflo (M3) propiciou a menor concentração de ácido clavulânico (AC), em torno de 10 mg/L, e a maior concentração de CPC totais, cerca de 140 mg/L em 72 horas, decrescendo drasticamente após este período, provavelmente devido à degradação. Os meios contendo caseína de hidrólise ácida (M1) ou triptona (M2) também apresentaram alguma produção, crescente até cerca de 60 e 90 mg/L de CPC totais, respectivamente, em 96 horas. O meio M4 (Trovatti et al, 2006), contendo asparagina, tirosina e o dobro de L-lisina relativamente aos demais, não apresentou bons resultados de produção. Porém, de uma maneira geral, a produção de CPC totais foi maior que a obtida no Experimento 1.

A biomassa (Figura 5.3) apresentou valores previstos (entre 5 e 7 g/L) durante a fase estacionária e, em virtude da baixa viscosidade do meio, é possível afirmar que o processo não foi limitado pela transferência de oxigênio gás-líquido. A concentração celular manteve-se estável somente no meio contendo triptona (M2). Nos demais meios, a biomassa caiu pela metade nas últimas 24 horas de processo.

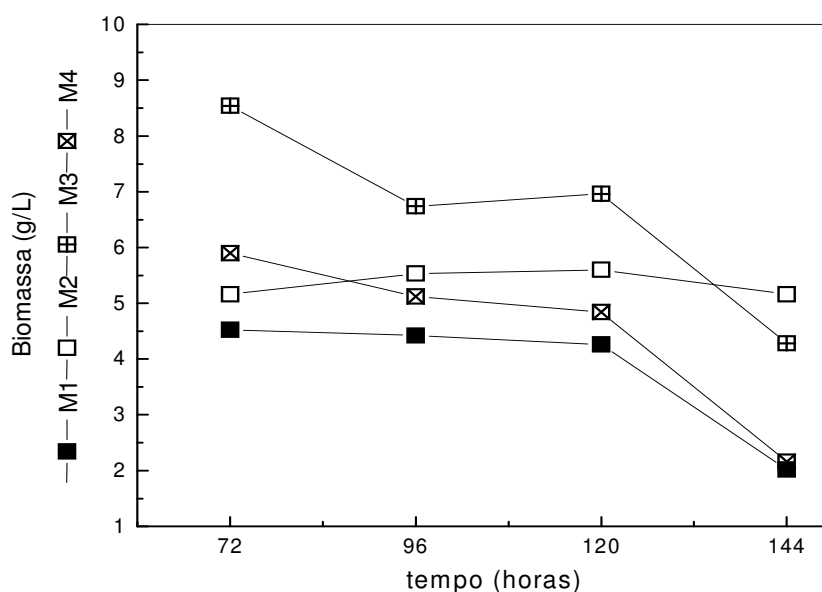


Figura 5.3.- Experimento 2 (com reposição de meio) – Biomassa obtida em meios contendo L-lisina e várias fontes de N solúveis: M1 - caseína de hidrólise ácida; M2 - triptona tipo I (caseína de hidrólise enzimática); M3 - extrato protéico de caroço de algodão (Proflo); M4 - asparagina e tirosina.

5.3) Consumo de amido na presença de diferentes fontes de N

5.3.1) Parte 1 - Experimento 3

Este experimento teve por objetivo investigar o consumo de amido em várias fontes de N. Para tanto, foram utilizadas as três fontes de N do experimento anterior (Proflo, caseína de hidrólise ácida) e o meio TSB ("Tryptic Soy Broth" da Difco) avaliado em trabalho paralelo, desenvolvido na mesma linha de pesquisa.

Através das Figuras 5.4 e 5.5, observam-se os mesmos comportamentos nos três meios com relação à biomassa e ao consumo de amido. A biomassa resultante em 24 horas apresentou um valor em torno de 9 g/L, diminuindo gradativamente a partir deste período até o final da fermentação. Esta diminuição pode ter ocorrido devido à falta de algum nutriente no meio, liberação de toxinas ou até pela formação de proteases sob condições adversas. Uma vez que nada foi adicionado ao meio, esperava-se que o amido fosse completamente consumido. Porém, observou-se uma concentração residual de cerca de 2 g/L após 72 horas, que permaneceu constante até o final da fermentação. Pode-se sugerir que a hidrólise ácida das amostras tenha acarretado a liberação de açúcares redutores, diferentes da glicose, provenientes de outros componentes do meio, como por exemplo, o Proflo, mascarando os resultados.

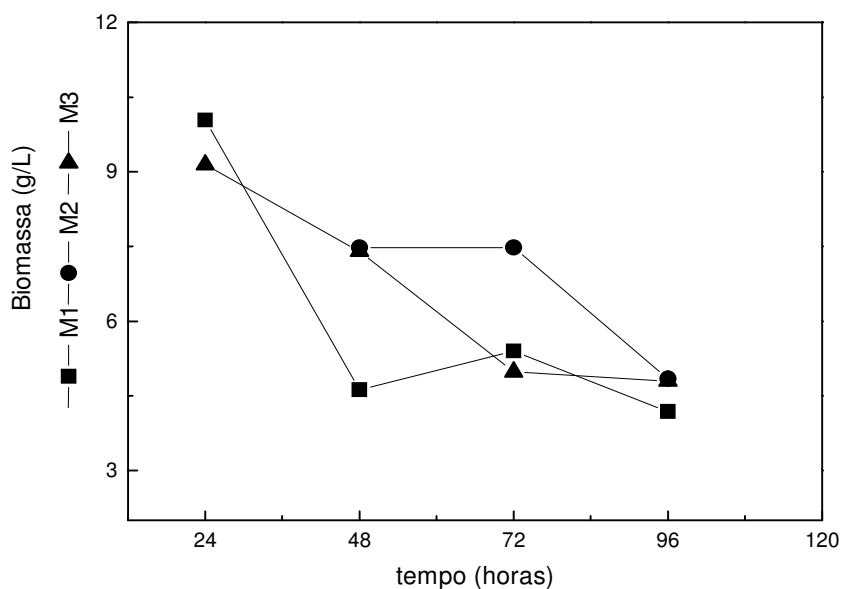


Figura 5.4.- Experimento 3 (batelada) – Biomassa obtida em meios contendo como fontes de N solúveis: **M1** - caseína de hidrólise ácida, Soytone e L-lisina; **M2** - Proflo e L-lisina; **M3** - "Tryptic Soy Broth" da Difco (TSB)

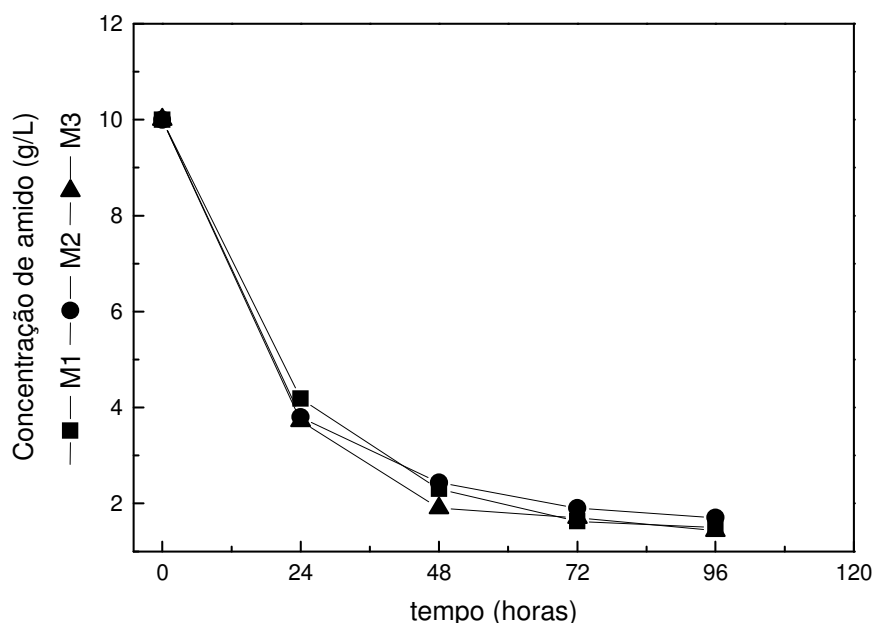


Figura 5.5.- Experimento 3 (batelada) – Consumo de amido em meios contendo como fontes de N solúveis: **M1**- caseína de hidrólise ácida, Soytone e L-lisina; **M2** - Proflo e L-lisina; **M3** - "Tryptic Soy Broth" da Difco (TSB)

5.3.2) Parte 2- Experimento 4

Realizou-se uma nova fermentação utilizando-se o meio M2 do Experimento 3, contendo amido e Proflo, que já havia apresentado, no Experimento 2, os melhores resultados em termos de produção. No presente experimento, coletou-se um maior número de amostras para acompanhar o consumo de amido que, juntamente com dados de biomassa, é apresentado na Figura 5.6. Observa-se que, novamente, a concentração final de amido manteve-se próxima de 2 g/L.

A concentração máxima de células (cerca de 8 g/L) foi 10% menor que a obtida no Experimento 3, sendo observada em 32 horas e não em 24 horas como anteriormente. Possivelmente a concentração do inóculo nesse experimento foi menor. A máxima produção de CPC totais (Figura 5.7) foi da mesma ordem de grandeza, cerca de 140 mg/L, mas foi obtida em 48 horas, e não em 72 horas, como no Experimento 2. A mesma queda acentuada na produção foi observada após a obtenção do valor máximo, provavelmente ocorrida por degradação como anteriormente.

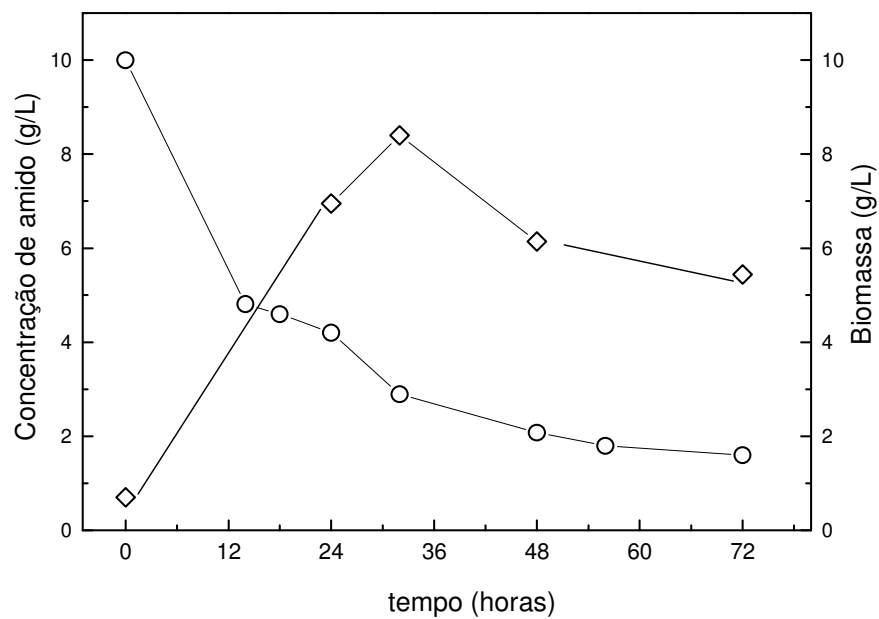


Figura 5.6.- Experimento 4 - Resultados de biomassa (◇) e do consumo de amido (○) em meio contendo Proflo e L-lisina como fontes de N (meio M2 do Experimento 3).

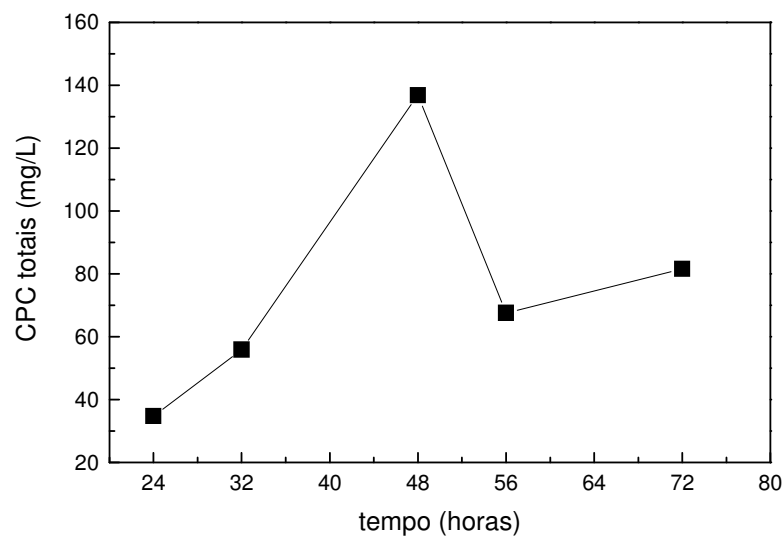


Figura 5.7.- Experimento 4 - Resultados de CPC totais (■) em meio contendo Proflo e L-lisina como fontes de N (meio M2 do Experimento 3).

5.4) Experimento 5 – Ensaio com o mutante DSMZ 41826 (Vining et al, 1987).

Este experimento teve como objetivo investigar a capacidade de produção de CPC do mutante espontâneo DSMZ 41826 de *S. clavuligerus* (Vining et al, 1987) e, também, verificar o comportamento do processo suplementando-se o meio com concentrações crescentes de amido durante a fase estacionária. Para isto, realizou-se uma fermentação contínua conforme procedimento apresentado na Figura 4.4. Os meios suplementares continham 15, 20, 25, 30 e 35 g/L de amido e 3,0 g/L de L-lisina, conforme Tabela 4.12. Os dados foram comparados com processo em batelada contendo a concentração inicial de 10 g/L de amido (condição controle).

Para garantir uma boa oxigenação nos frascos, manteve-se um volume reacional constante entre 20 e 25 mL durante a etapa de suplementação, cerca de metade do volume anteriormente adotado (~45 mL), em frascos Erlenmeyer de 500 mL. A velocidade de agitação foi a mesma dos experimentos anteriores (260 rpm, excentricidade de raio 2,5 cm). Condições limitantes de oxigênio dissolvido afetam principalmente a expandase, enzima responsável pela expansão do anel tiazolidina da penicilina N para o anel dihidrotiazina das cefalosporinas (Lebrihi et al., 1988). Okabe et al. (1992) testaram vários volumes de meio em frascos Erlenmeyer de 500 mL e obtiveram a maior produção de CefC e produção insignificante de penicilina N com um volume de 15 mL, agitado a 220 rpm (excentricidade de raio de 2,5 cm).

O volume de amostragem e subsequente reposição a partir de 48 horas de processo foi o mesmo dos experimentos anteriores, 5 mL, suficiente para realizar todas as análises. As condições adotadas resultaram na taxa de diluição $D = 0,01\text{h}^{-1}$.

Como se pode observar através da Figura 5.8, nenhuma das condições de suplementação foi eficiente para manter a biomassa constante a partir de 24 horas. Nos meios suplementados com menos amido, 0,16 e 0,2 g/h (meios suplementares contendo 15 e 20 g/L de amido, respectivamente), a principal causa da queda de biomassa pode ter sido a falta de substrato para o microrganismo. Já nos meios que receberam mais amido, 0,31 e 0,36 g/h (meios suplementares contendo 30 e 35 g/L de amido, respectivamente), a diminuição da concentração celular pode ter sido causada por inibição pelo substrato.

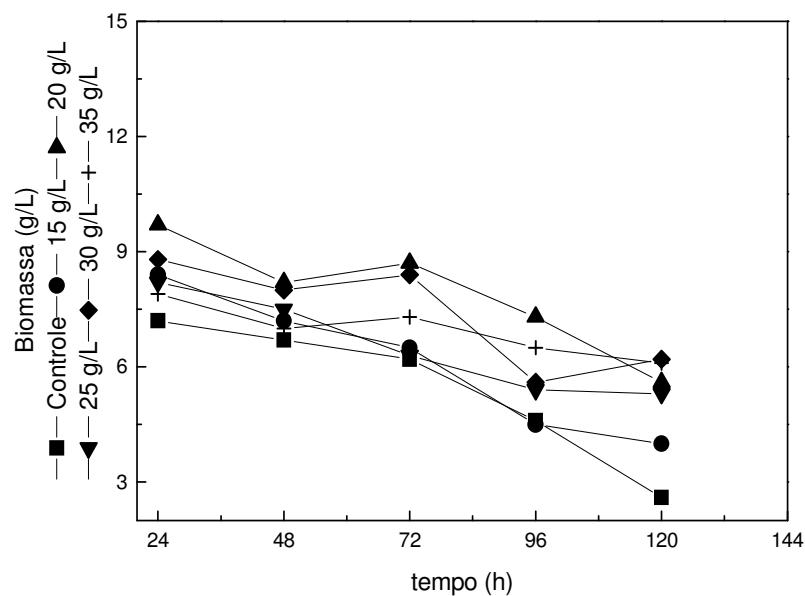


Figura 5.8- Experimento 5 (com reposição de meio) - Resultados de biomassa em meios suplementados com L-lisina (3 g/L) e várias concentrações de amido, obtidos com o mutante *S. clavuligerus* DSMZ 41826 (Vining et al, 1987).

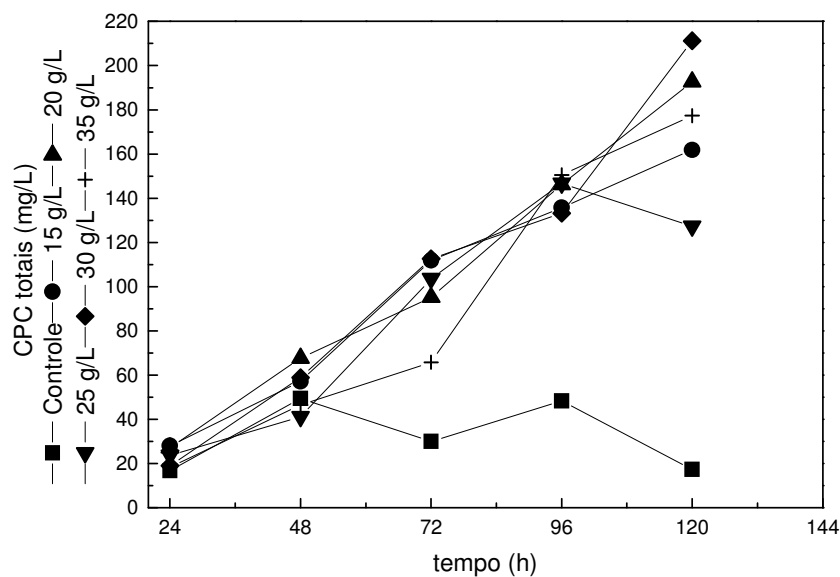


Figura 5.9. Experimento 5 (com reposição de meio) - Resultados de CPC totais em meios suplementados com L-lisina (3 g/L) e várias concentrações de amido, obtidos com o mutante *S. clavuligerus* DSMZ 41826 (Vining et al, 1987).

Até 48 horas, foram obtidos valores de CPC totais entre 40 e 70 mg/L (Figura 5.9), enquanto a linhagem selvagem produziu bem mais no mesmo período, cerca de 140 mg/L (Figura 5.7). Durante a suplementação, porém, a produção com o mutante (Figura 5.9) foi crescente em todos os meios, com exceção para a condição controle (sem reposição) e para o meio suplementado com 0,26 g/h (meio suplementar contendo 25 g/L de amido). A produção máxima obtida foi cerca de 220 mg/L de CPC totais em meio suplementado com 0,3 g/h (meio suplementar contendo 30 g/L de amido). Não há dados de produção obtidos durante a fase estacionária com a linhagem selvagem passíveis de comparação.

Pode-se atribuir os bons resultados de produção a alguns fatores, como a natureza do mutante, conhecido como mais produtivo e à diminuição do volume reacional, que certamente propiciou uma maior disponibilidade de oxigênio ao microrganismo.

Para dar continuidade à formulação de meios de produção, nos experimentos seguintes tornou-se a utilizar a linhagem selvagem ATCC 27064 de *S. clavuligerus*, adotando-se volumes iniciais de meio reacional (meio + inóculo) entre 25 e 30 mL em frascos Erlenmeyers de volume nominal 500 mL.

5.5) Experimento 6- Seleção da fonte de N no meio de produção

As condições de meio destes ensaios foram traçadas de acordo com os resultados preliminares do Experimento 2. Foram reavaliados os extratos protéicos Proflo e as caseínas de hidrólise ácida ou enzimática (triptona), sendo a mistura de aminoácidos do M4 (Experimento 2) substituída pelo Soytone, uma vez que seus resultados não se mostraram satisfatórios. As fermentações foram realizadas com menor volume de meio, conforme já mencionado, e sem suplementação, para avaliar a real influência das fontes de N supracitadas na produção. Além das fontes complexas de N, alterou-se a concentração de L-lisina de 10 para 100 mM. Este maior valor para a concentração de L-lisina foi adotado a partir de resultados obtidos em trabalho paralelo desenvolvido em nossos laboratórios, inserido na mesma linha de pesquisa, que trata da investigação da influência da concentração de L-lisina na produção de CefC por *S. clavuligerus*.

Assim como no Experimento 2, o extrato de semente de algodão Proflo mostrou-se a melhor fonte de N para a produção. Porém, no presente experimento, a produção de CPC totais em todos os meios (Figura 5.10) foi bem superior à obtida anteriormente, com valores de 200 mg/L em 96 horas de processo, em meio contendo caseína de hidrólise enzimática (triptona) e cerca de 410 mg/L em meio contendo Proflo. Estes bons resultados

podem ser atribuídos a uma conjugação de fatores favoráveis, como a utilização de maior concentração inicial de L-lisina (precursor da molécula de ácido α - aminoadípico) e menor volume de meio nos frascos.

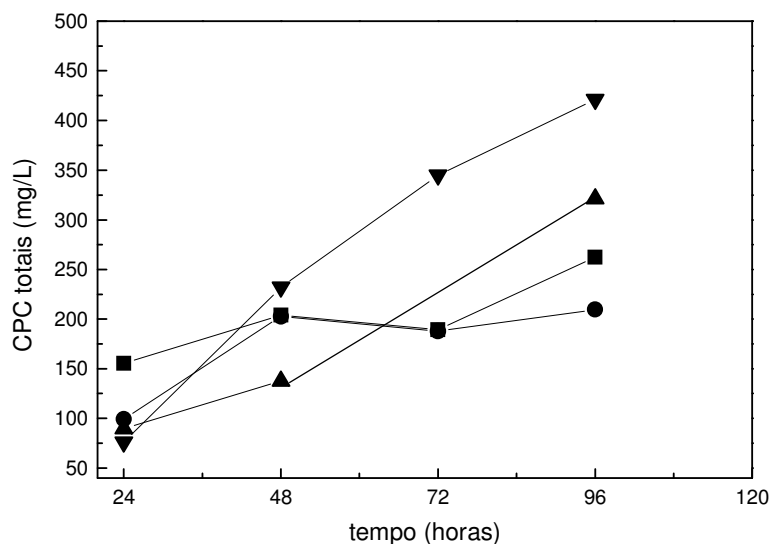


Figura 5.10- Experimento 6 - Resultados de CPC totais em meios contendo diferentes fontes de N: caseína de hidrólise ácida (■); caseína hidrólise enzimática ou Triptona tipo I (●); Soytone (▲); Proflo (▼).

Com relação à concentração celular (Figura 5.11), o Soytone propiciou a biomassa mais constante até 72 horas, com valores em torno de 7 g/L. Nos meios contendo as caseínas, observou-se uma queda a partir de 24 horas, principalmente com a caseína de hidrólise ácida. Após a centrifugação das amostras de meio contendo Proflo, observava-se a presença de pequenas quantidades de material insolúvel que ou decantavam e permaneciam junto à massa celular ou, na maior parte das vezes, se apresentavam como uma nata sobrenadante, passível de ser removida. Desta forma, a massa seca de células determinada neste meio nem sempre foi considerada confiável.

Em todos os meios, o consumo de amido (Figura 5.12) apresentou o mesmo comportamento observado nos experimentos anteriores.

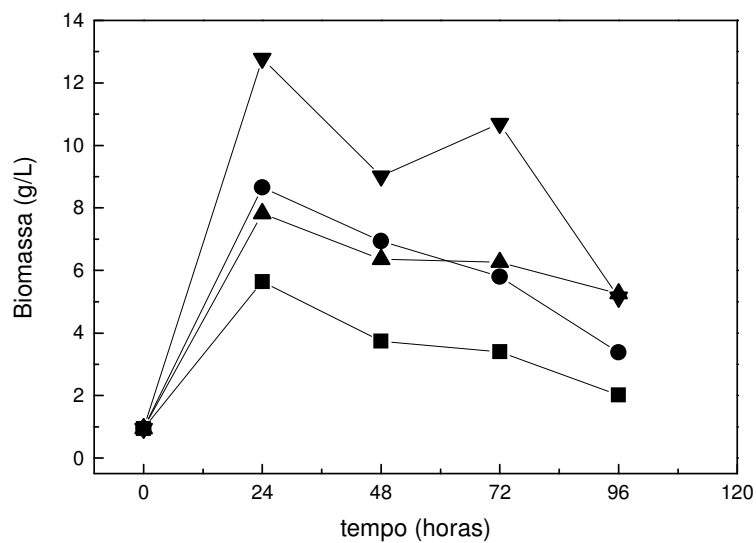


Figura 5.11- Experimento 6 - Resultados de biomassa em meios contendo diferentes fontes de N: caseína de hidrólise ácida (■); caseína hidrólise enzimática ou Triptona tipo I (●); Soytone (▲); Proflo (▼).

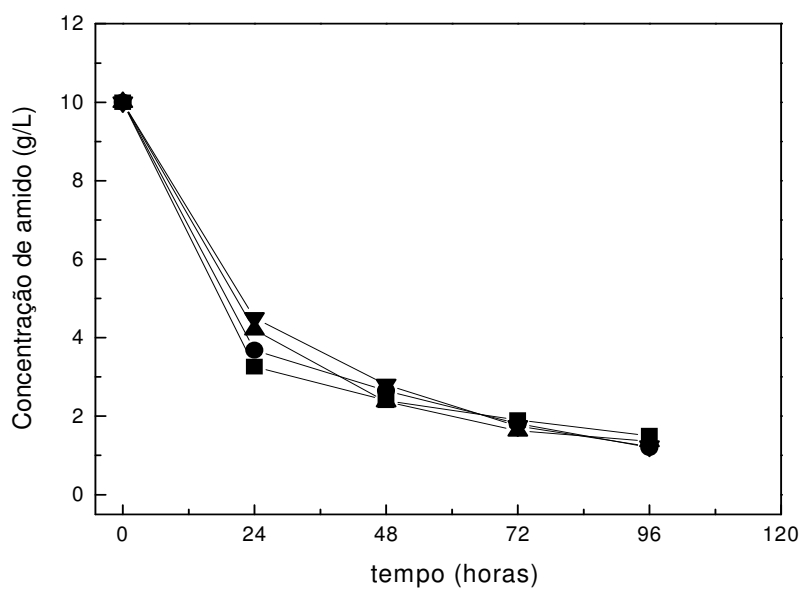


Figura 5.12- Experimento 6 - Resultados do consumo de amido em meios contendo diferentes fontes de N: caseína de hidrólise ácida (■); caseína hidrólise enzimática ou Triptona tipo I (●); Soytone (▲); Proflo (▼).

5.6) Experimento 7 – Adição de α -cetoglutarato no meio de produção

Este experimento teve como objetivo avaliar o processo adicionando-se α -cetoglutarato, um cofator da rota biossintética da CefC, ao meio de produção. Segundo Khetan et al. (1999), a biossíntese de metabólitos secundários está intimamente ligada ao metabolismo primário via suplementação de precursores, cofatores e de fontes de energia para as células de microrganismo. A enzima L-lisina- ϵ -aminotransferase (LAT) converte a L-lisina em ácido α -aminoadípico, um dos aminoácidos do tripeptídeo precursor dos antibióticos β -lactâmicos, sendo o α -cetoglutarato um co-substrato daquela enzima (Figura 3.1).

Adicionou-se α -cetoglutarato ao meio com o qual se obteve os melhores resultados de CPC totais obtido no experimento anterior, contendo Proflo e 100 mM de L-lisina. A adição foi feita no início da fermentação ou após 72 horas de processo, em concentrações de 1 mM e 10 mM (no frasco, a cada adição). Na condição-controle, nada foi adicionado.

Através da Figura 5.13, observa-se que a maior produção de CPC totais foi obtida nos meios que receberam α -cetoglutarato no início da fermentação, cerca de 218 mg/L e 233 mg/L, respectivamente em 72 e 96 horas nos meios que receberam 1 e 10 mM do composto. Nota-se também que a produção foi ligeiramente maior que o máximo obtido na condição-controle, que foi de cerca de 210 mg/L em 48 horas, decaindo bruscamente após este período.

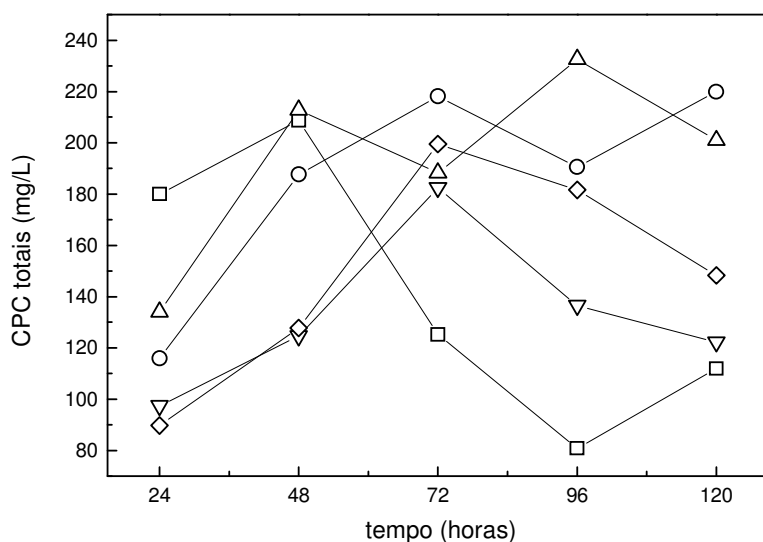


Figura 5.13- Experimento 7- Resultados de produção de CPC totais em meios adicionados de α -cetoglutarato: 1mM (○) e 10mM (△) no início do processo e 1mM (▽) e 10mM (◇) em 72 horas de processo; condição controle, sem α -cetoglutarato (□).

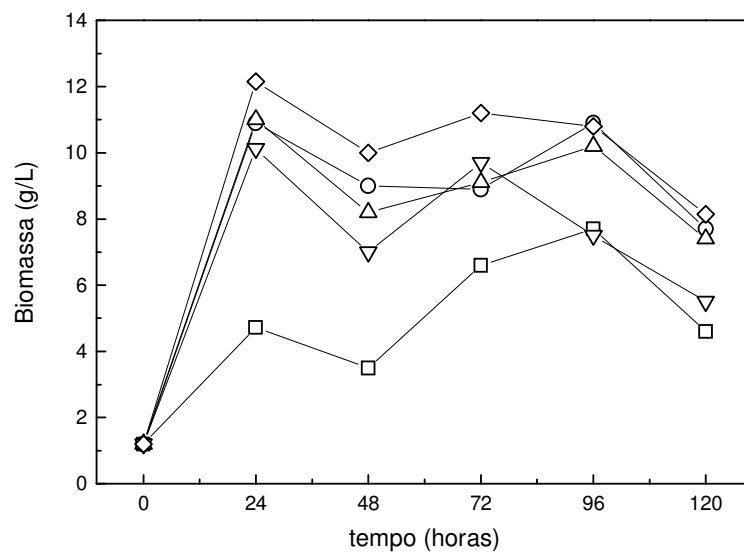


Figura 5.14- Experimento 7 - Resultados de biomassa em meios adicionados de α -cetoglutarato: 1mM (○) e 10mM (△) no início do processo e 1mM (▽) e 10mM (◇) em 72 horas de processo; condição controle, sem α -cetoglutarato (□).

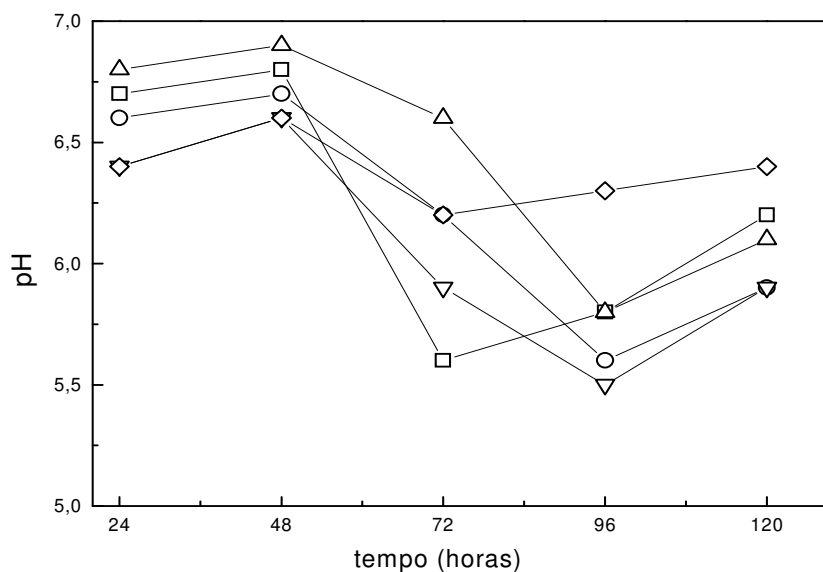


Figura 5.15- Experimento 7 - Resultados de pH em meios adicionados de α -cetoglutarato: 1mM (○) e 10mM (△) no início do processo e 1mM (▽) e 10mM (◇) em 72 horas de processo; condição controle, sem α -cetoglutarato (□).

Segundo Aharonowitz e Demain (1978), o α -cetoglutarato também pode ser usado como fonte de C e energia pelo microrganismo. Isto pode ter ocorrido no presente

experimento, pois se observou uma biomassa cerca de 3 vezes maior que a resultante em meio contendo somente amido como fonte de C (condição-controle) (Figura 5.14). Porém, esta biomassa não pode ser atribuída somente à presença de α -cetoglutarato, uma vez que, como mencionado, o Proflo acarreta incoerência na massa seca de células.

Os valores de pH (Figura 5.15) oscilaram entre 5,5 e 7,0. O meio adicionado de 10 mM de α -cetoglutarato após 72 horas de fermentação apresentou maior aumento de pH após este período. Aharonowitz e Demain (1978) observaram valores de pH em torno de 8,4 ao final de 72 horas de fermentação em meios contendo 5 g/L de α -cetoglutarato (ca. 34 mM) como única fonte de C e energia.

5.7) Combinação de L-lisina e α -cetoglutarato no meio de produção

5.7.1) Considerações gerais

Na seguinte série de experimentos, foram testadas várias combinações de concentração de α -cetoglutarato e L-lisina no meio de produção, já presentes no início da fermentação, para determinar a composição de meio mais favorável à produção de CPC totais.

As faixas de concentração estabelecidas no presente estudo foram selecionadas com base no trabalho de Khetan et al. (1999), que atribuíram à dupla de compostos L-lisina e α -cetoglutarato um papel-chave conjunto na síntese de CefC. Como já mencionado, a L-lisina é substrato da primeira enzima (LAT) da rota biossintética de β -lactâmicos em procariotos e o α -cetoglutarato atua como seu cofator. Assumindo a cinética de Michaelis-Menten para a LAT em meios contendo estes compostos, os pesquisadores estimaram as constantes de saturação $K_m \text{ Lis} = 1,2 \text{ mM}$ e $K_m \alpha\text{-cetoglutarato} = 8,6 \text{ mM}$ e observaram, ainda, que a atividade máxima da enzima ocorreu em concentrações intracelulares de α -cetoglutarato e L-lisina em torno de 90 mM e 45 mM, respectivamente.

Através de trabalho paralelo desenvolvido em nossos laboratórios, análises de amostras de caldo fermentativo contendo várias concentrações de L-lisina (dados não apresentados) mostraram que este aminoácido não é totalmente consumido quando adicionado em concentrações acima de 100 mM.

5.7.2) Experimento 8 – 1º Planejamento Experimental

O esquema das condições adotadas no 1º Planejamento Fatorial está apresentado na Figura 4.1. Estabeleceu-se como condição central (0 0 em unidades codificadas),

concentrações de L-lisina e α -cetoglutarato no meio iguais a 45 e 90 mM, respectivamente, em analogia às concentrações intracelulares que resultaram na maior atividade da LAT, segundo Khetan et al. (1999). Além das condições de concentração do planejamento (Tabela 4.16), realizou-se uma duplicata da condição-controle para fins comparativos, cujo meio continha 100mM de L-lisina, sem α -cetoglutarato (meio da fermentação principal, descrito na Tabela 4.8).

Os resultados de biomassa estão apresentados na Figura 5.16. A condição-controle foi a única que apresentou concentração celular relativamente constante ao longo do processo. A partir de 48 horas, com exceção para a condição-controle, pode-se observar uma queda significativa na concentração celular ocasionada, provavelmente, pelos altos valores de pH nos meios contendo α -cetoglutarato. A variação de biomassa foi muito heterogênea nestes meios, o que impossibilitou a obtenção de correlações entre a concentração celular e as concentrações de L-lisina e α -cetoglutarato. Esta heterogeneidade pode ter sido acarretada tanto pelo consumo do α -cetoglutarato como fonte de C durante a fase exponencial como pela imprecisão nas medidas de massa seca nos meios contendo Proflo. Desta forma, uma comparação estatística entre os dados de biomassa tornou-se inviável.

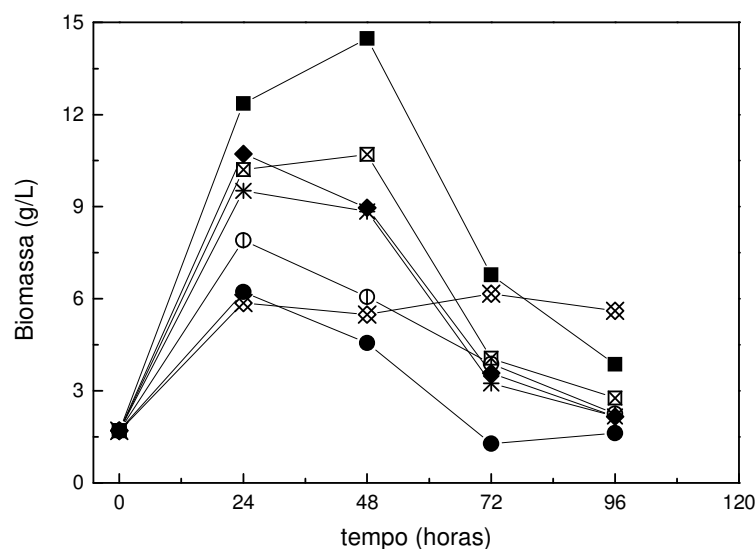


Figura 5.16- Experimento 8 – 1º Planejamento Fatorial 2², com duplicata do ponto central - Resultados de biomassa em meios com diferentes combinações entre L-lisina e α -cetoglutarato: + - (■); - - (●); - + (⊕); + + (⊠); 0 0 (♦) 00 (*) ; controle (x) .

Observa-se que a condição-controle apresentou a maior produção de CPC totais (Figura 5.17), cerca de 410 mg/L em 48h, valor que se manteve praticamente constante até o fim do processo. Em todas as condições do planejamento houve uma diminuição drástica na produção a partir de 72 horas, acarretada pelo aumento de pH, que atingiu valores próximos de 9,5, gerando uma possível degradação das CPC totais (Figura 5.18).

Dentre as condições do planejamento fatorial, observou-se que a produção mais próxima da condição controle, ~ 400 mg/L de CPC totais em 72 horas, foi obtida em meio contendo a menor concentração de L-lisina (10mM) e a maior concentração de α -cetoglutarato (110mM). Em virtude da diferença entre as condições de cultivo utilizados no presente trabalho e aqueles definidos por Khetan et al. (1999), não foi possível traçar uma comparação entre os resultados. A avaliação estatística dos dados aqui obtidos, apresentada a seguir, permitiu avaliar mais criteriosamente os efeitos destas variáveis na produção.

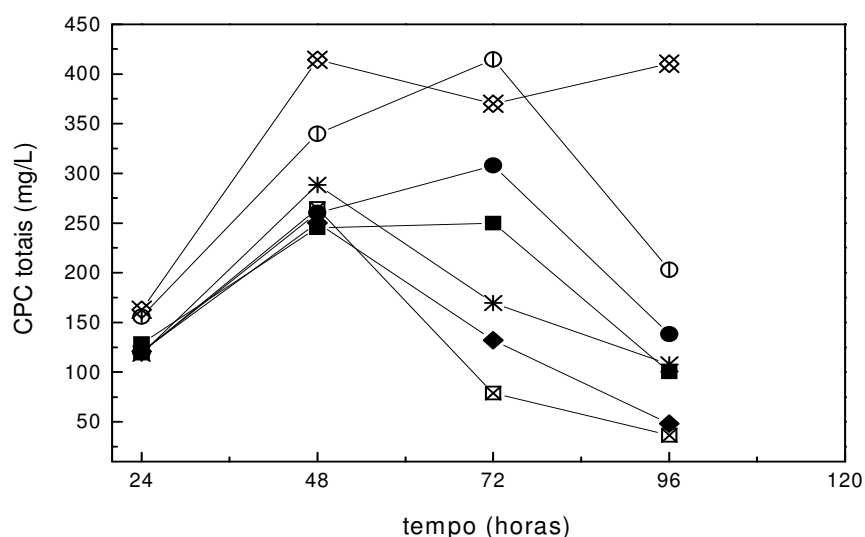


Figura 5.17- Experimento 8 –1º Planejamento Fatorial 2² com duplicata do ponto central-
Resultados CPC totais em meios com diferentes combinações entre L-lisina e α -cetoglutarato: + - (■); - - (●); - + (⊕); + + (⊠); 0 0 (♦) 0 0 (*); controle (x)

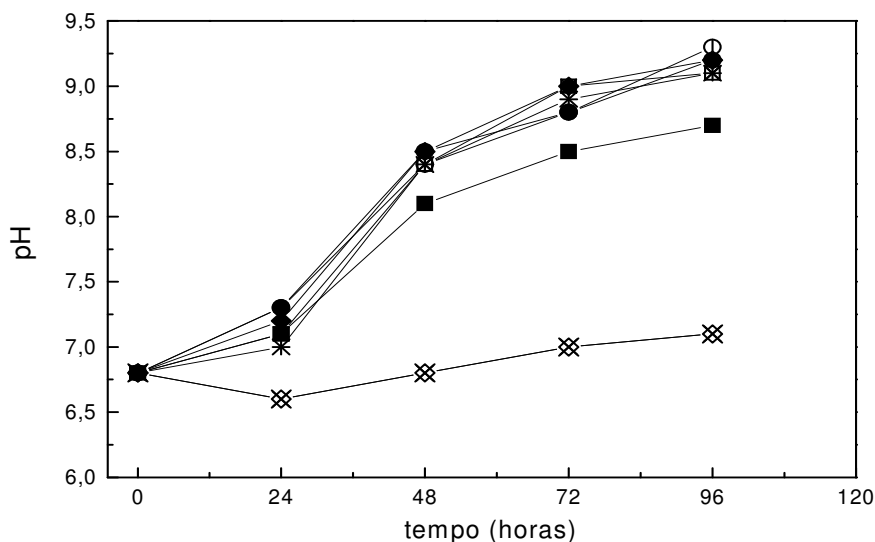


Figura 5.18- Experimento 8- 1º Planejamento Fatorial 2² com duplicata do ponto central
 – Resultados de pH em meios com diferentes combinações entre L-lisina e α-cetoglutarato:

+- (■); -- (●); -+ (⊕); ++ (⊗); 00 (◆) 00 (*) ; controle (⊗)

A análise estatística dos dados de produção (C_{CPC} , em mg/L) obtidos em 72 horas de fermentação gerou a superfície de resposta da Figura 5.19 que, a 95% de grau de confiança, resultou em um coeficiente de determinação igual a 0,98. O gráfico de valores previstos *versus* observados de produção em 72 horas de processo, apresentado na Figura 5.20, indica a qualidade do ajuste obtido. A superfície de resposta, representada matematicamente pela Equação 1 (concentrações em unidades originais), prevê a possibilidade de se obter maior produção de CPC totais em meios contendo menos L-lisina e mais α-cetoglutarato ou, também, contendo mais L-lisina e menos α-cetoglutarato. Esta última opção é mais viável na prática, uma vez que, como foi visto altas concentrações de α-cetoglutarato acarretam consideráveis aumentos de pH que prejudicam o processo como um todo. Por sua vez, aumentos na concentração de L-lisina são limitados, na prática, pelo metabolismo do microrganismo.

$$C_{CPC} = 105,35 + 2,40 \cdot C_{Lis} + 0,04 \cdot C_{Lis}^2 + 2,42 \cdot C_{Cetoglutarato} - 0,075 \cdot C_{Lis} C_{Cetoglutarato}$$

(Equação 1)

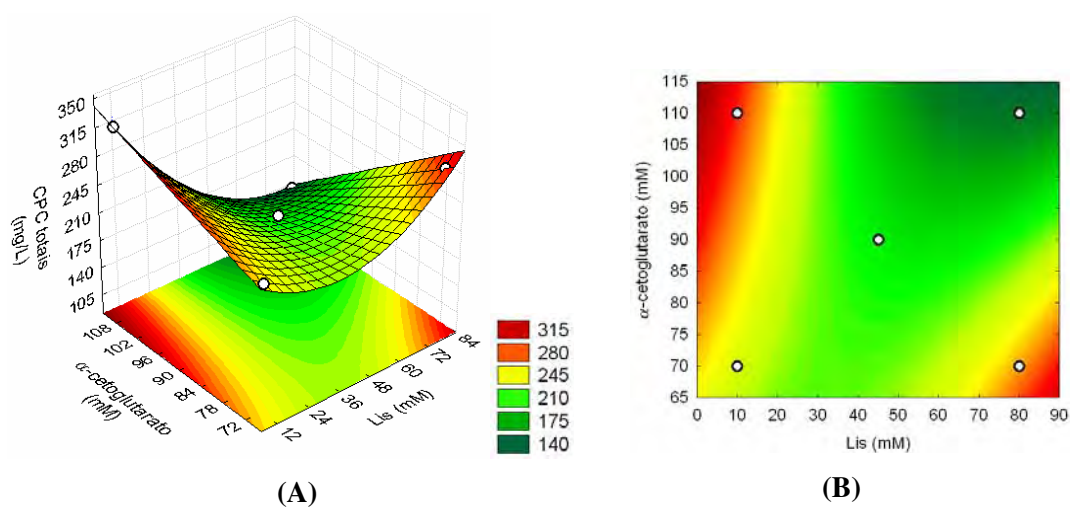


Figura 5.19 –Experimento 8- 1º Planejamento Fatorial 2²- Superfície de resposta ajustada
 - (A) tri e (B) bidimensional - e dados experimentais de concentração de CPC totais (mg/L)
 obtidos em 72 horas de processo *versus* concentrações de L-lisina e α-cetoglutarato;
 coeficiente de determinação igual a 0,98, a 95% de grau de confiança.

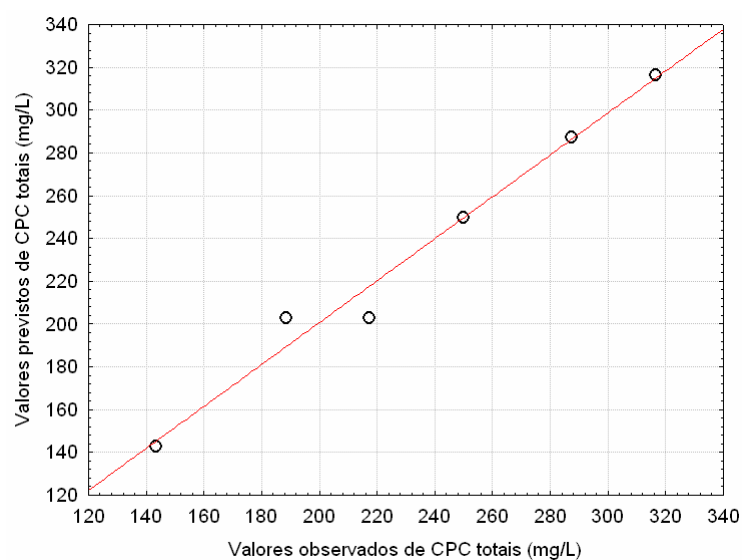


Figura 5.20 – Experimento 8- 1º Planejamento Experimental - Valores previstos
versus observados

5.7.3) Experimento 9- 2º Planejamento Experimental

Foi realizado um último planejamento fatorial 2², elaborado com base nos resultados até então obtidos. Neste 2º planejamento foram testadas concentrações um pouco maiores de L-lisina e bem menores de α -cetoglutarato, com relação aos valores investigados no 1º planejamento. O esquema do 2º Planejamento Fatorial está apresentado na Figura 4.2.

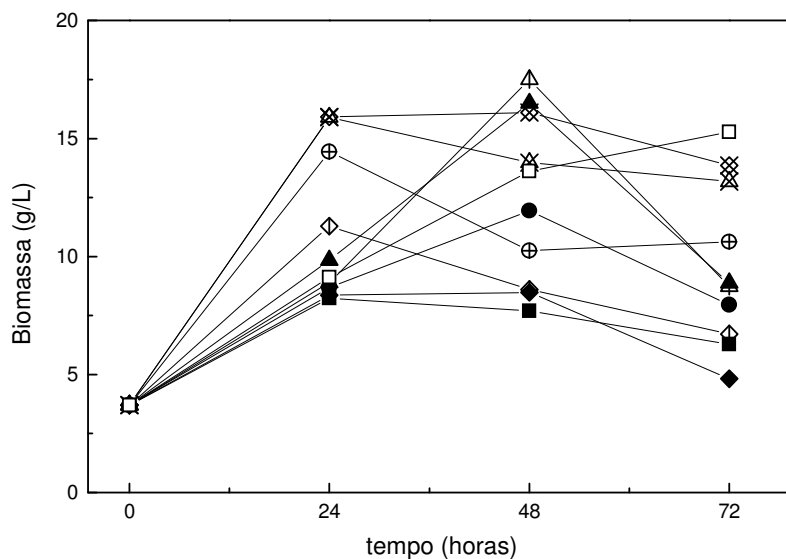
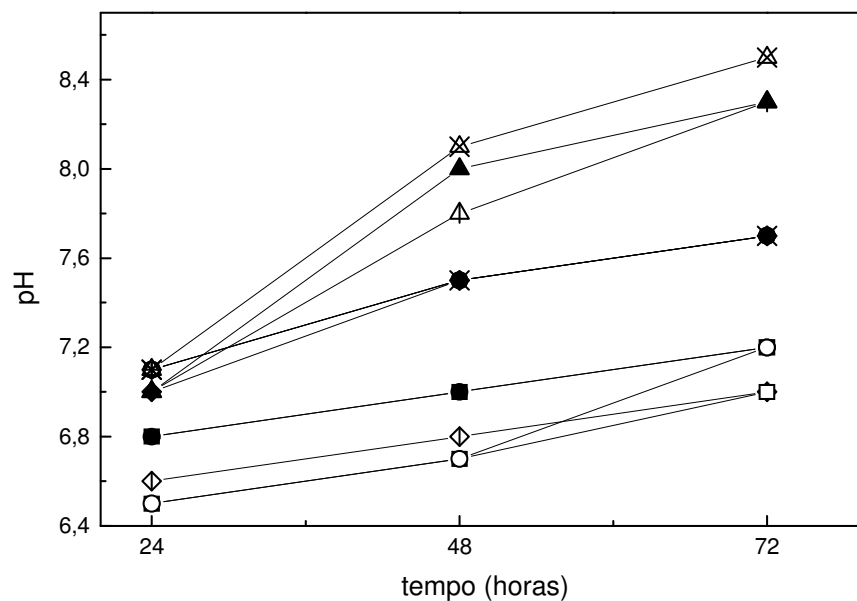


Figura 5.21-Experimento 9 – 2º Planejamento Fatorial -Resultados de biomassa em meios com diferentes combinações entre L-lisina e α -cetoglutarato: - - (■); + - (●); - + (▲); + + (⬠); $-\sqrt{2}$ 0 (◆); $+\sqrt{2}$ 0 (⊗); 0 $-\sqrt{2}$ (◇); 0 $+\sqrt{2}$ (⊗); 0 0 (⊕) e controle (□).

Até 48 horas, o crescimento celular (Figura 5.21) apresentou comportamento semelhante ao observado no 1º planejamento, porém, não houve a queda drástica de biomassa anteriormente observada, possivelmente devido aos menores valores resultantes de pH (Figura 5.22), que atingiram um máximo de cerca de 8,5. Desta vez, os valores de biomassa da condição-controle não foram coerentes com os obtidos nos experimentos anteriores. Como mencionado no item 5.5 (Experimento 6), a utilização do Proflo no meio não garante a obtenção de dados plenamente confiáveis. Novamente, a heterogeneidade de valores obtidos não permitiu associar o crescimento celular com quaisquer outras variáveis.



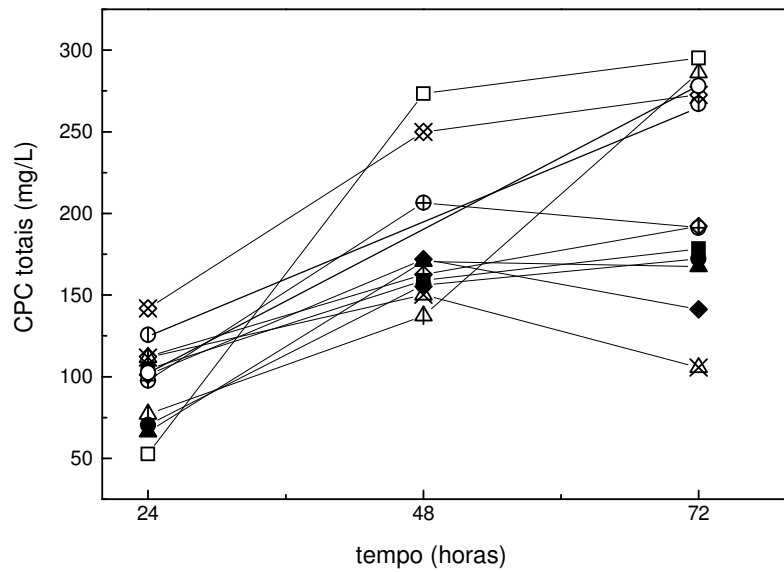


Figura 5.23- Experimento 9 – 2º Planejamento Fatorial - Resultados de CPC totais em meios com diferentes combinações entre L-lisina e α -cetoglutarato: - - (■); + - (●); - + (▲); + + (⊕); $-\sqrt{2}$ 0 (◆); $+\sqrt{2}$ 0 (⊗); 0 $-\sqrt{2}$ (⊖); 0 $+\sqrt{2}$ (⊗); 0 0 (⊕); 0 0 (⊙); controle (□) e controle (○) .

A superfície de resposta resultante da análise estatística dos dados de CPC totais obtidos em 72 horas de fermentação (C_{CPC} , em mg/L) está apresentada na Figura 5.24. O coeficiente de determinação igual a 0, 73, a 95% de grau de confiança, indica que a qualidade do ajuste foi apenas razoável (Figura 5.25). Fatores relevantes podem ter afetado a produção, como a variação de valores de pH entre os meios, bem maior que a observada no primeiro planejamento, e a imprecisão nas medidas de biomassa, que impossibilitou a obtenção de dados confiáveis de produção específica (em mg CPC/ g células).

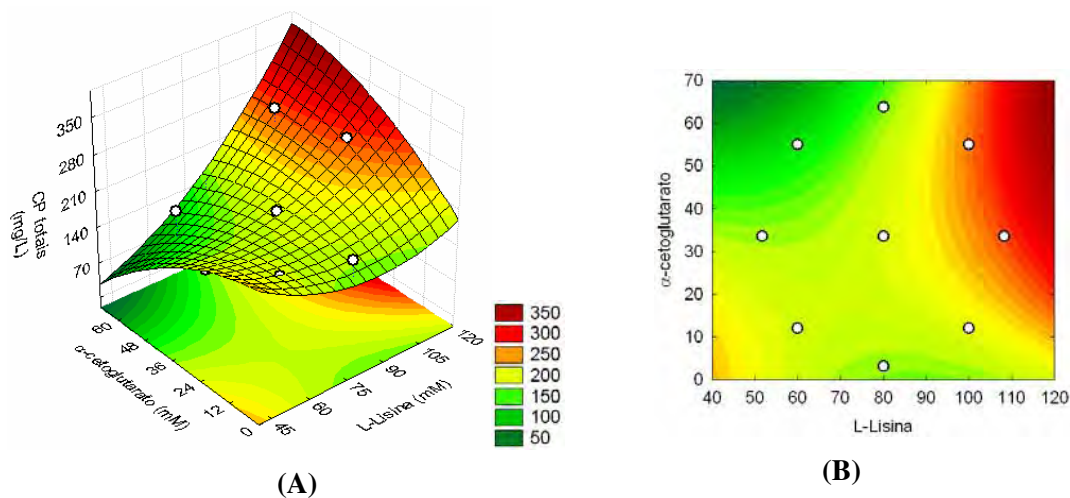


Figura 5.24 – Experimento 9 - 2º Planejamento Fatorial 2² - Superfície de resposta ajustada - (A) tri e (B) bidimensional - e dados experimentais de concentração de CPC totais (mg/L) obtidos em 72 horas de processo *versus* concentrações de L-lisina e α-cetoglutarato; coeficiente de determinação igual a 0,73, a 95% de grau de confiança.

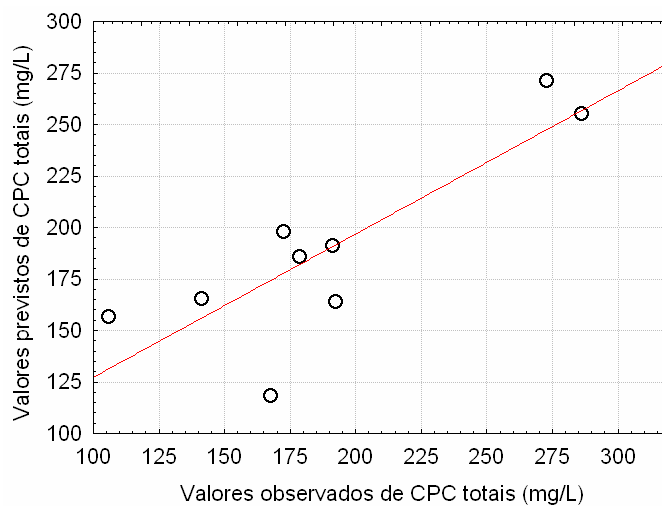


Figura 5.25 – Experimento 9 - 2º Planejamento Experimental - Valores previstos *versus* observados de produção de CPC totais (mg/L) em 72 horas de processo

Em virtude da qualidade do ajuste, o modelo teórico, representado matematicamente pela Equação 2 (concentrações em unidades originais), não prevê satisfatoriamente a produção de CPC totais sob as condições de concentração de L-lisina e α -cetoglutarato investigadas. Porém, algumas tendências podem ser consideradas.

$$C_{CPC} = 421,38 - 6,02 \cdot C_{Lis} + 0,03 \cdot C_{Lis}^2 - 3,69 \cdot C_{Cetoglutarato} - 0,03 \cdot C_{Lis} C_{Cetoglutarato}$$

(Equação 2)

Através da superfície de resposta (Figura 5.24) pode-se observar que, dentro das faixas de concentração investigadas, maior produção pode ser obtida em valores de concentração de L-lisina mais restritos àqueles em torno de 100 mM, enquanto que para α -cetoglutarato, a faixa de concentrações é mais flexível. De uma maneira geral, nenhuma das condições experimentais em frascos agitados permitiu verificar efetivamente a influência positiva da combinação L-lisina- α e cetoglutarato na produção de CefC.

5.8) Processo em biorreator tipo tanque agitado e aerado

Este experimento foi realizado com o objetivo de checar, sob condições de controle de aeração e pH, os bons resultados obtidos em experimentos realizados em mesa incubadora rotativa.

Para tanto, foram realizadas fermentações em biorreator tipo tanque agitado e aerado (5 L de volume útil) operado em batelada utilizando-se os dois melhores meios obtidos em frascos agitados. Um deles foi o da condição-controle, contendo 100 mM de L-lisina, sem α -cetoglutarato (Tabela 4.13), aqui denominado Meio 1, e o outro foi selecionado entre os investigados nos planejamentos fatoriais. Como as condições dos planejamentos experimentais não conduziram a resultados significativamente melhores entre si, optou-se por utilizar o meio correspondente à condição + + (em unidades codificadas) do 2º planejamento fatorial, contendo 100 mM de L-lisina, como no meio-controle, e 55 mM de α -cetoglutarato. Este meio, aqui denominado Meio 2, resultou em cerca de 290 mg/L de CPC totais.

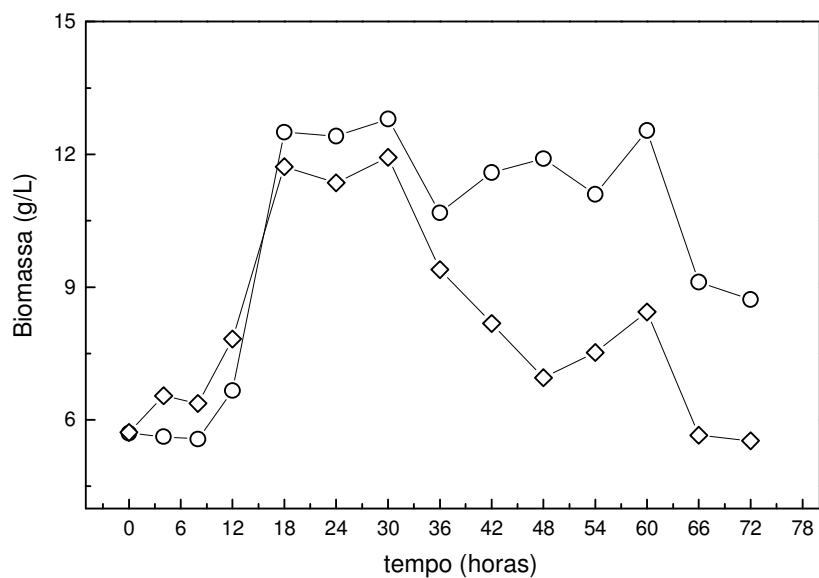


Figura 5.26- Experimento em biorreator- Resultados de biomassa obtidos no **Meio 1** (meio-controle) (○) e no **Meio 2** (◇).

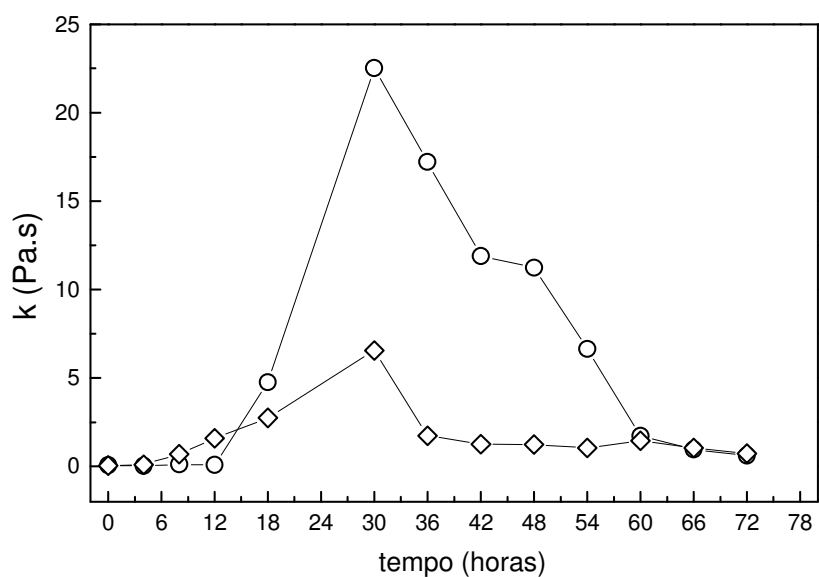


Figura 5.27- Experimento em biorreator- Resultados da análise reológica obtidos no **Meio 1** (meio-controle) (○) e no **Meio 2** (◇)

Através das Figuras 5.26 e 5.27, pode-se observar que a biomassa foi maior no Meio 1, com crescimento máximo em 30 horas em ambos os meios, porém menor que o observado

em frascos agitados. Após este período, a biomassa caiu drasticamente no Meio 2. Também se pode observar que o α -cetoglutarato presente no Meio 2 afetou o crescimento e a produção, ou seja, a saúde estrutural, fato que pode ser comprovado pelo comportamento do K (análise reológica), o qual está associado à viscosidade do meio (Figura 5.27).

O amido foi totalmente consumido em 30 horas (Figura 5.28). Neste período, observou-se também a maior velocidade de produção em ambos os meios (Figura 5.29). Este comportamento mostra que nos dois casos a produção foi associada ao crescimento, como constatado por Aharonowitz e Demain (1978) em meios contendo amido. Estes dados são importantes para uma futura formulação de meio suplementar de processo em batelada alimentada.

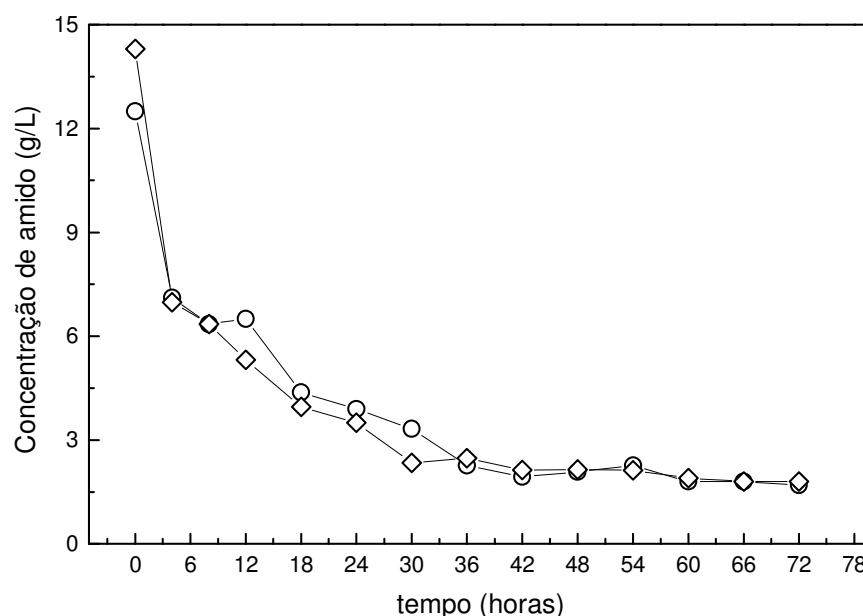


Figura 5.28- Experimento em biorreator- Resultados de consumo de amido obtidos no **Meio 1** (meio-controle) (○) e no **Meio 2** (◇).

A produção no Meio 1 chegou a cerca de 490 mg/L em 60 horas, caindo para aproximadamente 380 mg/L ao final do processo. Por outro lado, o Meio 2 resultou em produção máxima, em torno de 340 mg/L em 42 horas, decaindo após este período até cerca de 240 mg/L ao final do processo. Assim, a produção máxima no Meio 1 foi cerca de 30% maior.

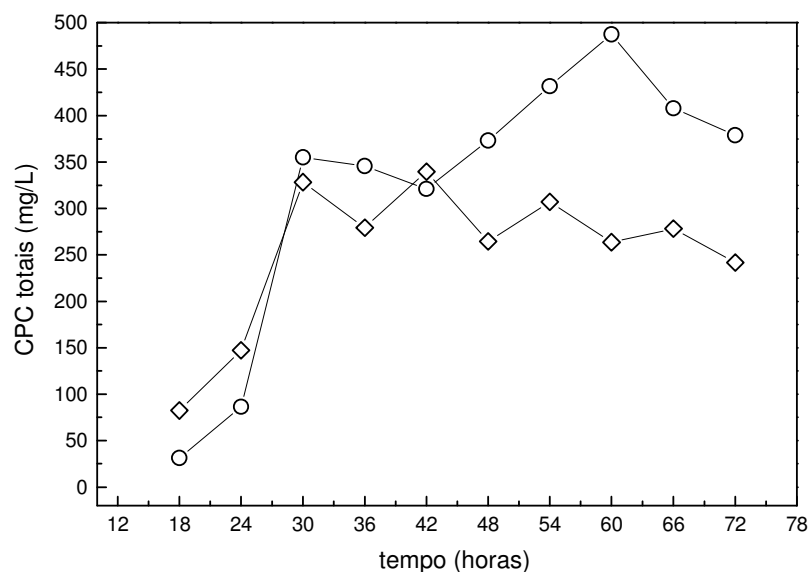


Figura 5.29- Experimento em biorreator- Resultados da produção de β -lactâmicos totais a partir do **Meio 1** (meio-controle) (○) e do **Meio 2** (◇).

Comparando-se os resultados de produção obtidos neste experimento em biorreator com o melhor resultado obtido nos experimentos realizados em frascos agitados, nota-se que houve um aumento de 22,5 %, passando de ~ 400 mg/L para 490 mg/L. Assim, este experimento em biorreator confirmou a eficiência e a satisfatória produção geradas pelo meio tido como melhor em experimentos no frascos agitados.

Para Aharonowitz e Demain(1978), as maiores produções obtidas utilizando-se 0,5 g/L de amido e 0,4 g/L de L-lisina, foram de 180 mg/L e 12 mg/L em 96h e 144 h, respectivamente. Os dados de Romero et al (1984), demonstram que suas melhores produções foram de 6,4 e 7 $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ células de massa seca em 20h de incubação. Segundo Lebrihi et al.(1988), seu melhor dado de produção foi de 75 mg/L em 120 horas, utilizando-se 4 g/L de glicerol e 2g/L de L-asparagina. Assim, quando se compara os dados de produção presentes na literatura e aqui supracitados aos dados obtidos neste trabalho, observa-se que o meio de cultivo aqui formulado, favorece o crescimento e principalmente gera excelentes resultados de produção.

Os experimentos em fermentador foram importantes para definir futuras condições de operação para otimizar o processo de produção de CefC.

6) CONCLUSÕES

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

- Glicerol ou amido mostraram-se igualmente adequados para o crescimento celular, porém, os meios contendo somente amido renderam maiores concentrações de CPC totais, conforme amplamente demonstrado na literatura.
- Comparando-se as fontes de N caseína de hidrólise ácida, caseína de hidrólise enzimática (triptona tipo I), extrato protéico de soja Soytone e extrato protéico de semente de algodão Proflo, observou-se que os meios contendo este último foram os mais adequados para a obtenção de maior produção de CPC totais.
- Altas concentrações de α -cetoglutarato prejudicaram o processo como um todo, acarretando em aumento de pH e crescimento de células muito irregular, de forma que nenhuma das condições experimentais de combinação de concentrações de α -cetoglutarato e L-lisina conduzidas em frascos agitados foi eficiente em demonstrar a influência positiva da presença daqueles compostos na produção de CPC totais, como ressalta a literatura.
- O melhor meio de cultivo de *S. clavuligerus* para a produção de CPC totais obtido no presente trabalho continha amido e extrato de semente de algodão Proflo como principais fontes de C e de N, respectivamente, e L-lisina.
- Os resultados em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 5 L de volume útil confirmaram a eficiência do melhor meio de produção obtido em frascos agitados e serão de grande utilidade para a elaboração de condições de operação para otimizar o processo.
- Em relação aos dados de produção presentes na literatura, às condições de cultivo aqui apresentadas resultaram em valores de produção muito superiores.

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. Agents 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.
- 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*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1986.
- BIGNELL, D. R. D.; TAHLAN, K.; COLVIN, K. R.; JENSEN, S. E.; LESKIW, B. K. Expression of *ccaR*, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in ***Streptomyces clavuligerus***, is dependent on *bldG*. *Antimicrob. Agents and Ch.*, v. 49, n. 4, p. 1529-1541, 2005.
- BIRD, A. E.; BELLIS, J. M.; GASSON, B. C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. *Analyst*, v. 107, p. 1241-1245, 1982.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. *Statistics for experimenters*. New York: John Wiley and Sons, 1978. 655 p.
- BRAKHAGE, A. A. Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, n. 3, p. 547-585, 1998.
- 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: 12 nov. 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: M. Dekker, 1984. p. 3-31.

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

DE LAAT, W.; KRABBEN P. *Fermentation process to produce clavulanic acid at low concentration of free amino acids*. WO00/01840, 03 July 1998, 13 Jan. 2000.

DEMAIN, A. L. Biology of antibiotic formation. In: VANDAMME, E. J. (Ed.). *Biotechnology of industrial antibiotics*. New York: M. Dekker, 1984. p. 33-42.

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

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

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.

HU, W-S.; BRANA, A. F.; DEMAIN, A. L. Carbon source regulation of cephem antibiotic production by resting cells of **Streptomyces clavuligerus** and its reversal by protein synthesis inhibitors. *Enzyme Microbiol. Biotechnol.*, v. 19, p. 232-236, 1994.

JENSEN, S. E.; PARADKAR, A. S.; MOSHER, R. H.; ANDERS, C.; BEATTY, P. H.; BRUMLIK, M. J.; GRIFFIN, A.; BARTON, B. Five additional genes are involved in clavulanic acid biosynthesis in **Streptomyces clavuligerus**. *Antimicrob. Agents Ch.*, v. 48, n. 1, p. 192-202, 2004.

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

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

MARTÍN, J. F.; AHARONOWITZ, Y. Regulation of biosynthesis of β -lactam antibiotics. In: DEMAİN, A. L.; SOLOMON, N. A. (Ed.). *Antibiotics containing the β -lactam structure*. Berlin: Springer, 1983. 229 p.

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

MENDELOWITZ, 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. Chem.*, v.21, p.74-84, 1982.

MERCK AND COMPANY. (United States). Edward Inamine; Jerome Birnbaum. *Production of cephamycin C by fermentation*. US1466055, 11 Dec. 1974, 02 Sept. 1975.

MERCK AND COMPANY. (United States). Edward Inamine; Jerome Birnbaum. *Cephamycin C by fermentation*. US3977942, 21 Nov. 1975, 31 Aug. 1976.

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

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

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

ROLLINS, M. J.; JENSEN, S. E.; WESTLAKE, D. W. S. Regulation of antibiotic production by iron and oxygen during defined medium fermentations of **Streptomyces clavuligerus**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 31, p. 390-396, 1989.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in **Streptomyces clavuligerus**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 20, p. 318-325, 1984.

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

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.