

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CAROLINA BELLÃO

PRODUÇÃO DE CEFAMICINA C POR *STREPTOMYCES*
***CLAVULIGERUS* EM BATELADA E BATELADA**
ALIMENTADA

SÃO CARLOS – SP

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CAROLINA BELLÃO

PRODUÇÃO DE CEFAMICINA C POR *STREPTOMYCES*
***CLAVULIGERUS* EM BATELADA E BATELADA**
ALIMENTADA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr.

SÃO CARLOS – SP
2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B446pc

Bellão, Carolina.

Produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em batelada e batelada alimentada / Carolina Bellão. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

78 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Biotecnologia. 2. Antibióticos. 3. Fermentação. I. Título.

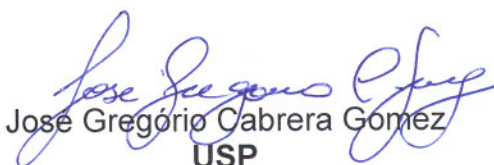
CDD: 660.6 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE
CAROLINA BELLÃO, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM
31 DE MARÇO DE 2010.

BANCA EXAMINADORA:



Alberto Colli Badino Júnior
orientador, UFSCar



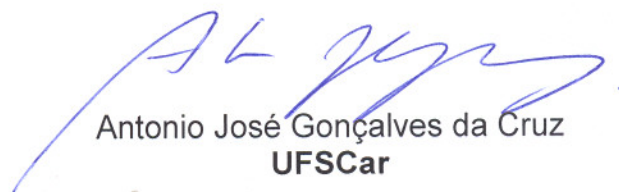
José Gregório Cabrera Gomez
USP



Álvaro de Baptista Neto
USP



Maria Lúcia Gonzales da Costa Araújo
UNESP



Antonio José Gonçalves da Cruz
UFSCar

À minha mãe Angélica

À minha irmã Marta

E ao meu irmão Bruno

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Alberto Colli Badino Junior pela orientação neste trabalho.

À minha mãe pela paciência nos momentos difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar: Luciana, Liliane, Cecília, Sérgio, Douglas, Maritza, Marcel e Juliana pelo companheirismo e por terem cuidado dos meus cultivos com carinho, sendo possível a realização desse trabalho.

Ao técnico Amadeus que esteve sempre disposto a ajudar.

Aos amigos André, Edson e Rafa pela amizade e convivência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa concedida.

Enfim, a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Sumário

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas	iv
Nomenclatura.....	v
Resumo.....	vi
Abstract	vii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	4
3. Revisão Bibliográfica.....	5
3.1. Streptomyces clavuligerus	5
3.2. Antibióticos β -lactâmicos	5
3.3. Ácido clavulânico.....	6
3.4. Cefamicina C	8
3.5. Biossíntese da cefamicina C	9
3.6. Condições de cultivo para a produção de cefamicina C (CefC)	13
3.6.1. Fontes de carbono	14
3.6.2. Fontes de nitrogênio.....	16
3.6.3. Fontes de fosfato.....	17
3.6.4. Influência do enxofre na produção de CefC	18
3.6.5. Influência do oxigênio na produção de CefC	18
3.6.6. Influência do pH	19
3.6.7. Influência do inóculo	20
3.7. Repressão catabólica e batelada alimentada	20
4. Materiais e Métodos.....	24
4.1. Microrganismo	24
4.2. Meios de Cultura.....	24
4.2.1. Meio de cultura de reativação	24
4.2.2. Meios de cultura de inóculo e de produção (principal)	25
4.3. Métodos Analíticos.....	26
4.3.1. Determinação da concentração celular	26
4.3.2. Determinação da concentração de amido.....	26

4.3.3. Determinação da concentração de lipídios.....	27
4.3.4. Determinação da concentração de glicerol	27
4.3.5. Determinação da concentração de lisina.....	27
4.3.6. Determinação da concentração de cefamicina C.....	28
4.3.6.1. Bioensaio	28
4.3.6.2. Cromatografia Líquida de alta eficiência	29
4.3.7. Determinação da concentração de ácido clavulânico	29
4.4. Metodologia Experimental	30
4.4.1. Cultivos em mesa incubadora rotativa	30
4.4.2. Cultivos em biorreator de bancada	31
4.4.2.1. Cultivos em batelada	31
4.4.2.2. Cultivos em batelada alimentada	32
4.4.3. Etapa 1: Quantificação de cefamicina C.....	33
4.4.3.1. Teste de sensibilidade de <i>Escherichia coli</i> ESS	33
4.4.3.2. Influência das presenças de ácido clavulânico e de penicilina N	33
4.4.4. Etapa 2: Avaliação de meios de cultura para a produção de cefamicina C	34
4.4.5. Etapa 3: Avaliação de fontes de carbono e de nitrogênio na produção de cefamicina C	34
4.4.6. Etapa 4: Avaliação de diferentes fontes de carbono à base de soja.....	35
4.4.7. Etapa 5: Produção de cefamicina C em batelada alimentada utilizando diferentes fontes de carbono e condições de alimentação	36
4.4.7.1. Influência da alimentação de glicerol na produção de cefamicina C.....	37
4.4.7.2. Influência da alimentação de amido na produção de cefamicina C.....	37
5. Resultados e Discussão	38
5.1. Etapa 1: Quantificação de cefamicina C.....	38
5.1.1. Teste de sensibilidade de <i>Escherichia coli</i> ESS.....	38
5.1.2. Influência das presenças de ácido clavulânico e de penicilina N	39
5.2. Etapa 2: Avaliação de meios de cultura para a produção de cefamicina C.....	41
5.3. Etapa 3: Avaliação de fontes de carbono e de nitrogênio na produção de cefamicina C	45
5.4. Etapa 4: Avaliação de diferentes fontes de carbono à base de soja	50
5.5. Etapa 5: Cultivos em batelada alimentada.....	53
5.5.1. Influência da alimentação de glicerol na produção de cefamicina C	55
5.5.2. Influência da alimentação de amido na produção de cefamicina C	58

5.5.3. Comparação entre as produções de AC e CefC em relação às fontes de carbono	61
6. Conclusões	70
Referências Bibliográficas	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Estrutura química do ácido clavulânico	7
Figura 3.2	Estrutura química da cefamicina C	9
Figura 3.3	Rota biossintética da cefamicina C em <i>Streptomyces clavuligerus</i> (Khetan <i>et al.</i> , 1999)	11
Figura 4.1	Esquema experimental do cultivo em mesa incubadora rotativa	31
Figura 4.2	Esquema experimental do cultivo no biorreator de bancada	32
Figura 4.3	Esquema experimental do cultivo em batelada alimentada	33
Figura 5.1	Diâmetro do halo de inibição (ϕ_{halo}) em função da concentração para diferentes concentrações de antibióticos	38
Figura 5.2	Degradação do ácido clavulânico – C _{AC} em função do tempo de hidrólise	40
Figura 5.3	Concentrações de Cef C obtidas após os diferentes tratamentos das amostras	40
Figura 5.4	Consumo de fonte de carbono em função do tempo para os cultivos com diferentes meios de cultura de literatura	42
Figura 5.5	Índice de consistência do caldo em função do tempo para os cultivos com diferentes meios de cultura de literatura	43
Figura 5.6	Curva de produção de CefC em função do tempo para os cultivos com diferentes meios de cultura de literatura	43
Figura 5.7	Produção máxima de CefC obtidas nos cultivos com diferentes fontes de C e N, (-) média para a linhagem ATCC 27064 (..) desvio padrão para a linhagem ATCC 27064 (-) média para a linhagem DSM 41826 (..) desvio padrão para a linhagem DSM 41826	47

Figura 5.8	Resultados de produtividade máxima em CefC obtidas nos cultivos com diferentes fontes de C e N para as duas linhagens empregadas	47
Figura 5.9	Concentração de cefamicina C em função do tempo para os cultivos com diferentes linhagens e meios de cultura	48
Figura 5.10	Produção de cefamicina C nos cultivos com meio de cultura B10 (ATCC 27064), B11 (DSM 41826), B12 (DSM 41826) e B13 (41826) em biorreator	50
Figura 5.11	Perfis de K, C_X , C_S , C_{lis} , C_{AC} e de CefC ao longo do cultivo com Soytone® como fonte de nitrogênio (cultivo B14)	51
Figura 5.12	Perfis de K, C_X , C_S , C_{lis} , C_{AC} e de CefC ao longo do cultivo com proteína isolada de soja como fonte de nitrogênio (cultivo B15)	51
Figura 5.13	Perfis de K, C_X , C_S , C_{lis} , C_{AC} e de CefC ao longo do cultivo com farinha de soja como fonte de nitrogênio (cultivo B16)	52
Figura 5.14	Perfis de K, C_X , C_S , C_{lis} , C_{AC} e de C_{CefC} ao longo do cultivo contendo glicerol como fonte de carbono	53
Figura 5.15	Perfis de K, C_X , C_S , C_{lis} , C_{AC} e de C_{CefC} ao longo do cultivo contendo amido como fonte de carbono	54
Figura 5.16	Consumo de glicerol em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada	55
Figura 5.17	Índice de consistência dos caldos em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada contendo glicerol	56
Figura 5.18	Curva de produção de CefC em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada contendo glicerol	56
Figura 5.19	Curva de produção de AC em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada contendo glicerol	57
Figura 5.20	Concentração de amido em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada	58

Figura 5.21	Índice de consistência dos caldos em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada contendo amido	59
Figura 5.22	Curva de produção de CefC em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada contendo amido	59
Figura 5.23	Curva de produção de AC em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada contendo amido	60
Figura 5.24	Concentrações máximas de CefC e AC obtidas nos diferentes cultivos	61
Figura 5.25	Produtividade em CefC e AC obtidas nos diferentes cultivos	62
Figura 5.26a	Concentrações máximas de CefC e AC em função do produto $F.C_{se}$ para os cultivos em batelada alimentada com glicerol a vazão de $0,005 \text{ L.h}^{-1}$	63
Figura 5.26b	Concentrações máximas de CefC e AC em função do produto $F.C_{se}$ para os cultivos em batelada alimentada com glicerol a vazão de $0,01 \text{ L.h}^{-1}$	63
Figura 5.27a	Concentrações máximas de CefC e AC em função do produto $F.C_{se}$ para os cultivos em batelada alimentada com amido a vazão de $0,005 \text{ L.h}^{-1}$	64
Figura 5.27b	Concentrações máximas de CefC e AC em função do produto $F.C_{se}$ para os cultivos em batelada alimentada com amido a vazão de $0,01 \text{ L.h}^{-1}$	64
Figura 5.28a	Fosforilação da glicose e sua conversão à gliceraldeído-3-fosfato	67
Figura 5.28b	Conversão oxidativa do gliceraldeído 3-fosfato à piruvato	68
Figura 5.29	Conversão do glicerol à gliceraldeído 3-fosfato	68
Figura 5.30	Balanco energético da glicose e do glicerol	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Meios de cultura de literatura utilizados nos diferentes cultivos	42
Tabela 4.2	Fontes de carbono e de nitrogênio empregadas nos diferentes cultivos	35
Tabela 4.3	Condições de alimentação de glicerol nos cultivos em batelada alimentada	37
Tabela 4.4	Condições de alimentação de amido nos cultivos em batelada alimentada	37
Tabela 5.1	Comparação dos resultados de produção máxima de CefC ($C_{\text{CefC-max}}$)	45
Tabela 5.2	Concentração máxima de cefamicina obtida nos cultivos com <i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064	46
Tabela 5.3	Concentração máxima de cefamicina obtida nos cultivos com <i>Streptomyces clavuligerus</i> DSM 41826	46
Tabela 5.4	Principais resultados obtidos nos cultivos em batelada alimentada	65

NOMENCLATURA

AC = ácido (clavulânico)

CefC = cefamicina C

C_X = concentração celular (g.L^{-1})

C_{AC} = concentração de ácido clavulânico (mg.L^{-1})

C_{CefC} = concentração de cefamicina C (mg.L^{-1})

C_{FC} = concentração de fonte de carbono (g.L^{-1})

C_{FN} = concentração de fonte de nitrogênio (g.L^{-1})

Clis = concentração de lisina (mM)

$C_{AC-m\acute{a}x}$ = concentração máxima de ácido clavulânico (mg.L^{-1})

C_{AC-C} = concentração máxima de ácido clavulânico no cultivo controle (mg.L^{-1})

$C_{CefC-m\acute{a}x}$ = concentração máxima de cefamicina C (mg.L^{-1})

C_{CefC-C} = concentração máxima de cefamicina C no cultivo controle (mg.L^{-1})

$C_{Pm\acute{a}x}$ = concentração máxima de produto (mg.L^{-1})

C_s = concentração de substrato (g.L^{-1})

C_{se} = concentração de substrato na alimentação (g.L^{-1})

ϕ_{Halo} = diâmetro do halo de inibição (mm)

FC = fonte de carbono

FN = fonte de nitrogênio

K = índice de consistência do caldo ($\text{dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$)

F = vazão de alimentação de meio suplementar (L.h^{-1})

$P_{CefC-m\acute{a}x}$ = produtividade máxima de cefamicina C ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

$P_{Pm\acute{a}x}$ = produtividade máxima de produto ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

r_s = velocidade de consumo de substrato ($\text{g.h}^{-1}.\text{L}^{-1}$)

V = volume (L)

RESUMO

A cefamicina C (CefC) é um antibiótico natural produzido por *Streptomyces clavuligerus* que apresenta resistência à ação de β -lactamases, enzimas que degradam o anel β -lactâmico de antibióticos. O presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de CefC por *Streptomyces clavuligerus* em batelada e batelada alimentada, no sentido de se definir parâmetros importantes como composição do meio de cultura e condições de alimentação de meio suplementar de forma a maximizar a produção de CefC. Primeiramente, a metodologia de análise de CefC foi testada. Devido à indisponibilidade de um padrão para a análise da concentração de CefC obtida nos caldos fermentados, avaliou-se a sensibilidade do microrganismo teste, *Escherichia coli* ESS, frente a outros padrões. Verificou-se que a linhagem de *E. coli* ESS é supersensível à penicilina G e à cefalosporina C. Devido à presença de ácido clavulânico (AC) no caldo, um inibidor de β -lactamases, foi avaliada a influência do tratamento das amostras (hidrólises ácida ou alcalina) na hidrólise de penicilina N por penicilinase. Tanto AC quanto a CefC foram degradados em meios ácidos e alcalinos, sendo a degradação maior em pH básico. Os resultados demonstraram que a inativação do ácido clavulânico não é necessária para a inativação de penicilina N pela penicilinase. Para a avaliação da produção de CefC, primeiramente foram testados diferentes meios de cultura propostos na literatura com a linhagem de *S. clavuligerus* ATCC 27064. O melhor resultado foi alcançado no cultivo utilizando meio de cultura composto por amido como fonte de carbono e farinha de semente de algodão como fonte de nitrogênio que forneceu boa produção de cefamicina ($374,8 \text{ mg.L}^{-1}$ em 66 h) associada a bom crescimento celular. Foi também estudada a influência de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio na produção de CefC, utilizando duas linhagens de *Streptomyces clavuligerus*, ATCC 27064 e DSM 41826. O glicerol e farinha de soja mostram-se como mais favoráveis, mostrando que a produção de CefC é melhorada com a lenta e gradual disponibilidade de nitrogênio a partir da hidrólise de proteínas da farinha de soja (fonte insolúvel de nitrogênio). Nos cultivos em batelada alimentada, a maior produção de CefC ($566,5 \text{ mg.L}^{-1}$ em 108 h) foi alcançada no cultivo alimentado com glicerol à vazão volumétrica de $0,010 \text{ L.h}^{-1}$ e concentração de glicerol na alimentação de 177 g.L^{-1} . Nas condições experimentais testadas variando fonte de C e condições de alimentação não foi possível visualizar a dissociação entre as produções de ácido clavulânico e de cefamicina C. A maior produção de CefC com glicerol em relação ao amido está associada provavelmente ao balanço energético e velocidade de metabolização favoráveis ao glicerol.

Palavras-chave: antibióticos, cefamicina C, *Streptomyces clavuligerus*, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, batelada alimentada

ABSTRACT

Cephamicin C (CephC) is a natural antibiotic produced by *Streptomyces clavuligerus* that presents β -lactamases resistance, enzymes that clives β -lactam of antibiotics. The aim of present work was study cephamycin production by *Streptomyces clavuligerus* in batch and fed-batch cultivations, in order to define important parameters as culture medium and carbon source feeding conditions for the purpose of maximize the CefC production. First the methodology of analysis of CefC was tested. Due to standard unavailability for analysis of CefC in the fermentative broths, it was evaluated the sensibility of microorganism test (*Escherichia coli* ESS) face other standards. It was verified that *E. coli* ESS strain presents super sensibility to penicillin G and cephalosporin C. Due to the presence of clavulanic acid (CA) in the both, a β -lactamase inhibitor, it was evaluated the influence of the sample treatment (acid and basic hydrolysis) on penicillin N hydrolysis by penicillinase. For an adequate CephC analysis, the results showed that both clavulanic acid and cephamycin C were degraded in acid and alkaline medium, with higher degradation was in alkaline pH. The results show that the samples should be treated only with penicillinase for the correct CephC analysis by elimination of intermediates compounds the CephC biosynthetic pathway. For the evaluation of the CephC production, firstly different culture media proposed in the literature were tested with *S. clavuligerus* ATCC 27064 strain in bench scale bioreactor. The best result in terms of cellular growth and CephC production (374.8 mg.L^{-1} em 66 h) was obtained in batch cultivation that utilized starch and cottonseed meal as carbon and nitrogen sources. The influence of carbon and nitrogen sources on CephC production was then evaluated utilizing two *Streptomyces clavuligerus* strains, ATCC 27064 and DSM 41826, a natural mutant indicated as higher CephC producing by literature. Glycerol and soy bean meal have showed more suitable as carbon and nitrogen sources for CephC production due probably to slow and gradual availability of nitrogen from protein hydrolysis of soy bean meal (insoluble nitrogen source). In the fed-batch cultivation utilizing glycerol or starch as carbon source, the best result in terms of CephC production (566.5 mg.L^{-1} in 108 h) was obtained in the fed-batch cultivation with glycerol feeding at volumetric flow rate of $0,01 \text{ L.h}^{-1}$ and concentration of 177 g.L^{-1} . In the experimental conditions tested in the fed-batch cultivations, ranging carbon source and feeding conditions, it was not possible visualize the dissociation between clavulanic acid and cephamycin productions. The higher CephC in medium with glycerol is probably associated to its favorable energetic balance and metabolization rate in relation to starch.

Keywords: antibiotics, C cephamicyn, *Streptomyces clavuligerus*, carbon source, nitrogen source, fed-batch

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de microrganismos, geralmente não associados ao crescimento e sintetizados em baixas velocidades específicas de crescimento celular (DÉVI e SRIDHAR, 2000). Desta forma, em cultivos em batelada em meios de cultura ricos em nutrientes, altas quantidades de antibióticos são obtidas após a fase de crescimento (MARTÍN e DEMAIN, 1980).

Metabólitos secundários incluem substâncias com diferentes atividades biológicas, muitas delas de grande interesse comercial. Possuem estruturas químicas não usuais, tais como o anel β -lactâmico, peptídeo cíclico gerado pela fusão de aminoácidos modificados; ligações insaturadas de poliacetilenos e polienos ou um grande anel de macrolídeos (MARTÍN e DEMAIN, 1980).

Infecções bacterianas têm sido tratadas com antibióticos β -lactâmicos por mais de 50 anos. Até 1970, todos os β -lactâmicos com atividade microbiológica eram divididos em dois tipos químicos representados por penicilinas (anel β -lactâmico unido a anel tiazolidínico) e cefalosporinas (anel β -lactâmico ligado a anel dihidrotiazínico). Atualmente, os antibióticos β -lactâmicos podem se dividir em cinco classes, que possuem as estruturas básicas penam, cefans, clavanas, carbepenemas e monolactamas, sendo que as penicilinas e cefalosporinas são as mais eficazes de todos os agentes terapêuticos no controle das enfermidades infecciosas (SATO, 2002).

Embora os antibióticos β -lactâmicos apresentem grande eficácia no combate à maioria das bactérias patogênicas, eles estão gradualmente se tornando ineficazes em virtude da produção de β -lactamases pelos agentes infectantes, que inativam antibióticos desse gênero pela quebra do anel β -lactâmico (SRIDHAR *et al.*, 2002). Preocupados com esta realidade, na década de 70, pesquisadores elaboraram programas de seleção e isolamento de culturas microbianas produtoras de inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico, e de antibióticos resistentes à ação dessas enzimas, como as cefamicinas.

As cefamicinas representam uma classe de antibióticos β -lactâmicos sintetizados microbiologicamente e muito resistentes a β -lactamases. A estrutura molecular destes componentes se parece com as das cefalosporinas, diferenciando-se quanto à resistência à ação de β -lactamases, característica definida pela presença do grupo 7α -metoxila, que atua como estabilizador da estrutura do anel β -lactâmico, reduzindo sua sensibilidade às β -lactamases (OMSTEAD, 1985).

Os componentes da família das cefamicinas são produzidos unicamente por bactérias filamentosas (actinomicetos). O primeiro membro isolado desta família foi a cefamicina C, produzida por *Nocardia lactamdurans* (STAPLEY *et al.*, 1972).

A cefamicina C é produzida entre outros microrganismos por *Streptomyces clavuligerus*, uma bactéria filamentosa estritamente aeróbia. Logo seu cultivo apresenta problemas inerentemente clássicos quanto à demanda e transferência de oxigênio, o que pode levar a condições de limitação desse substrato, afetando o crescimento bacteriano e a própria biossíntese do produto de interesse, pois algumas enzimas que participam da rota biossintética são sintetizadas em condições de alta oxigenação (ROLLINS *et al.*, 1990).

Quanto às condições de cultivo, a cefamicina C tem sido produzida tradicionalmente em cultivos descontínuos (batelada) utilizando meios de cultura complexos com glicerol, amido e lipídeos como fontes de carbono e água de maceração de milho (milhocina), farinhas e hidrolisados (peptona e triptona) como fontes de nitrogênio (MITSURU *et al.*, 1997; ROLLINS *et al.*, 1988a; DEVI e SRIDHAR, 2000).

Em se tratando de metabólitos secundários, normalmente a pequena produção de antibióticos está associada aos efeitos de repressão e inibição exercidos sobre as enzimas responsáveis pela biossíntese desses compostos. Cultivos em batelada alimentada têm sido amplamente utilizados para otimizar a produção de metabólitos secundários, por minimizar esses efeitos (CRUZ, 2000).

Em virtude da alta capacidade de resistência a enzimas β -lactamases, da potente atividade antibacteriana e ausência de efeitos colaterais, muitos analistas de mercado vêem a cefamicina C como o mais importante e promissor antibiótico β -lactâmico e virtual substituto das penicilinas e cefalosporinas (SRIDHAR *et al.*, 2002).

Cabe salientar que há poucos trabalhos na literatura relacionados com aspectos de engenharia da produção de cefamicina C, sendo que no país não há outras equipes de pesquisa trabalhando no assunto, nem empresas que produzem esse importante fármaco. Ainda, ressalta-se que há apenas um registro na literatura que aborda sua produção a partir de cultivos em batelada alimentada. Rollins *et al.* (1988b) realizaram experimentos mantendo o oxigênio dissolvido em 50% com alimentação de maltose e observaram que altas concentrações dessa fonte de carbono diminuíram a produção específica de cefalosporinas em *Streptomyces clavuligerus*.

Face ao apresentado, justifica-se o estudo da produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em batelada e batelada alimentada, no sentido de se definir

parâmetros importantes como linhagem produtora, composição de meio de cultura e condições de alimentação de meio suplementar.

2 OBJETIVOS

Com base no apresentado anteriormente, o presente trabalho teve o seguinte objetivo geral:

Avaliação das condições de cultivo na produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em batelada e em batelada alimentada.

Visando alcançar o objetivo geral proposto, foram cumpridos os seguintes objetivos específicos, a saber:

- 1) estudo da metodologia de análise de cefamicina C;
- 2) estudo de meios de cultura de literatura para a produção de cefamicina C por linhagens de *Streptomyces clavuligerus* em batelada;
- 3) influência de fontes de carbono e de nitrogênio na produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* a partir de cultivos em batelada;
- 4) estudo da produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em batelada alimentada, avaliando-se diferentes estratégias de alimentação como a vazão de alimentação e a concentração de fonte de carbono no meio de cultura suplementar;
- 5) avaliação da dissociação das produções de cefamicina C e de ácido clavulânico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Streptomyces clavuligerus*

A grande maioria dos produtos terapêuticos utilizados no combate às doenças infecciosas causadas por bactérias é sintetizada pelo metabolismo secundário de microorganismos isolados do solo, como fungos e bactérias filamentosas, entre as quais se incluem os actinomicetos (THYKAER e NIELSEN, 2003).

Os actinomicetos são microrganismos Gram-positivos aeróbios, primariamente habitantes do solo e semelhantes aos fungos. Em cultivo submerso produzem hifas vegetativas (micélios) que não se fragmentam com facilidade. Dentre os actinomicetos encontra-se o grupo no qual pertence o gênero *Streptomyces sp*, que são responsáveis por 80% dos metabólitos secundários produzidos que se tem conhecimento (CHALLIS e HOPWOOD, 2003).

Atualmente, sabe-se que a bactéria *Streptomyces clavuligerus* é capaz de produzir cerca de 21 metabólitos secundários, incluindo antibióticos β -lactâmicos como a penicilina N, a deacetoxicefalosporina C e a cefamicina C, além do ácido clavulânico (ROMERO *et al.*, 1984).

A produção de diferentes metabólitos por uma única linhagem é controlada por efetores intracelulares que respondem a mudanças nas concentrações de nutrientes no meio de cultura (ROMERO *et al.*, 1984).

3.2 Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos são definidos como produtos naturais orgânicos produzidos pelo metabolismo secundário de alguns microrganismos, sendo ativos, mesmo em concentrações reduzidas, contra outros microrganismos. Dentre os antibióticos de maior destaque, podem ser citadas as penicilinas e as cefalosporinas naturais produzidas industrialmente por via fermentativa a partir de linhagens dos gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium*. Esses antibióticos apresentam na sua estrutura molecular um anel β -lactâmico e, por isso, são assim denominados.

Os antibióticos β -lactâmicos possuem um anel lactâmico de quatro membros que pode estar ligado para formar estruturas de anel bicíclico ou pode existir como anel

isolado. O tipo de substituição realizado no núcleo básico determina a atividade do componente β -lactâmico, por exemplo, substituições na posição 7α de cefalosporinas confere aumento de estabilidade contra β -lactamases, embora possa também diminuir a atividade antibiótica contra alguns organismos e substituição de enxofre com oxigênio no núcleo pode aumentar a atividade biológica. Os antibióticos β -lactâmicos interferem no estágio final da síntese da parede celular por inibição de enzimas bacterianas, transpeptidases e carboxipeptidases que catalisam as reações de síntese de peptidoglicanos, componente essencial da parede celular bacteriana que protege o organismo da ruptura osmótica, determina a forma celular e é essencial para o crescimento e divisão da célula (ESSACK, 2001).

A eficiência dos antibióticos β -lactâmicos é dependente da acessibilidade aos sítios, do grau de resistência à inativação por β -lactamases e da habilidade dos β -lactâmicos de inibir as proteínas ligadoras de penicilinas (ESSACK, 2001). Embora os antibióticos β -lactâmicos tradicionais apresentem grande eficácia no combate à maioria das bactérias patogênicas, ao longo dos anos algumas linhagens foram desenvolvendo resistência a estes antibióticos, como tem sido amplamente reportado na literatura (NAYLER, 1987; COLEMAN *et al.*, 1994). A resistência microbiana às penicilinas e cefalosporinas deve-se à capacidade de algumas bactérias sintetizar β -lactamases, enzimas responsáveis pela clivagem do anel β -lactâmico, resultando na perda da ação antibacteriana desses compostos (VANDAMME, 1984). As β -lactamases catalisam a hidrólise irreversível da ligação amida do anel β -lactâmico, resultando em produtos inativos biologicamente. Fatores que influenciam este mecanismo incluem a quantidade de β -lactamases produzida, a afinidade da enzima pelo antibiótico, a velocidade de hidrólise do antibiótico e a localização da β -lactamase (ESSACK, 2001).

Preocupados com esta realidade, na década de 1970, pesquisadores elaboraram programas de seleção e isolamento de culturas microbianas produtoras de inibidores de β -lactamases, que resultaram no isolamento de compostos, como o ácido clavulânico e de antibióticos resistentes à ação dessas enzimas, como a cefamicina.

3.3 Ácido clavulânico

O ácido clavulânico (AC) foi identificado e descrito pela primeira vez por Brown *et al.* (1976). O AC é constituído por um anel beta-lactâmico condensado a um anel

oxazolidina (Figura 3.1), é um poderoso e irreversível inibidor de beta-lactamases produzidas por bactérias patogênicas gram-negativas e gram-positivas (IVES e BUSHELL, 1997). Possui uma estrutura básica clavam e uma estereoquímica 3R, 5R, essencial para atuar como uma molécula inibidora de beta-lactamases (LIRAS e RODRIGUES GARCIA, 2000).

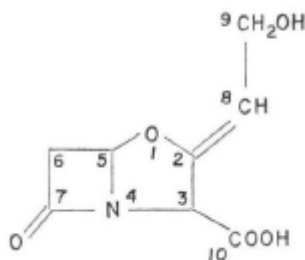


Figura 3.1: Estrutura química do ácido clavulânico

O ácido clavulânico sozinho tem baixa atividade antibiótica. É utilizado como um sal de potássio em conjunto com outros antibióticos beta-lactâmicos (BAGGALEY *et al.*, 1997). A combinação do AC com amoxicilina é o exemplo de maior sucesso do uso de um antibiótico beta-lactâmico sensível a beta-lactamase, juntamente com um inibidor desta enzima (MAYER e DECKWER, 1996).

A forma de atuação do AC é bastante conhecida. Sabe-se que a molécula se liga irreversivelmente ao grupo hidroxila de um resíduo de serina presente no sítio ativo de beta-lactamases produzindo um intermediário acilado estável e resultando na inativação da enzima (GRESSER *et al.*, 2001).

Quanto à biossíntese de AC, foi sugerido inicialmente que o ácido clavulânico e penicilinas e cefalosporinas tivessem um mesmo intermediário comum, devido a similaridade entre as estruturas químicas (BUTTERWORTH *et al.*, 1984). Porém esta hipótese foi descartada com o conhecimento de parte da rota biossintética das penicilinas e cefalosporinas, que requerem substratos específicos incompatíveis com os precursores do AC (JENSEN e PARADKAR, 1999).

Contudo, desde a descoberta do ácido clavulânico, vários estudos têm sido realizados com o intuito de se conhecer mais esses precursores. Romero *et al.* (1986) propuseram através de estudos com arginina, ácido glutâmico e ornitina, que os carbonos do anel beta-lactâmico do AC eram originários do glicerol e os demais carbonos eram provenientes da ornitina que pode ser sintetizada a partir do ácido glutâmico ou da arginina.

Khaleeli *et al.* (1999) sugerem que gliceraldeído-3-fosfato seja o precursor C3, ou seja, a molécula cujos carbonos são incorporados na molécula de AC nas posições C5, C6

e C7 e Liras et al. (2000) relatam que a arginina seja o precursor C5, cujos carbonos são incorporados nas posições C2, C3, C8, C9 e C10.

Quando não são adicionados ao meio de cultura, os precursores são fornecidos pelo metabolismo primário. A arginina é sintetizada a partir do glutamato, sendo formado primeiro a ornitina que é então convertida em arginina, numa seqüência análoga ao ciclo da uréia em mamíferos (IVES e BUSHELL, 1997). O gliceraldeído-3-fosfato pode ser fornecido por várias rotas: a molécula pode ser desviada diretamente da glicólise ou, se glicerol é fornecido como substrato, pode haver a fosforilação direta do glicerol, gerando gliceraldeído-3-fosfato.

3.4 Cefamicina C

Stapley *et al.* (1972) isolaram do solo culturas de actinomicetos produtoras de uma família de antibióticos do grupo cefam que definiram como cefamicinas.

As cefamicinas representam uma classe de antibióticos β -lactâmicos que se assemelham às cefalosporinas, distinguindo-se destas pela presença do grupo metoxila ligado ao carbono C7 que estabiliza a estrutura do anel β -lactâmico, conferindo resistência à ação de β -lactamases (DÉVI e SRIDHAR, 2000). Como todos compostos β -lactâmicos, a atividade antibacteriana das cefamicinas deriva de sua habilidade de se ligar a uma proteína receptora no organismo suscetível e então inibir a síntese da parede celular, levando à perda da viabilidade da célula afetada. A estrutura β -lactâmica inibe a atividade das transpeptidases envolvidas na biossíntese dos peptidoglicanos (OMSTEAD *et al.*, 1985).

As cefamicinas foram isoladas no começo dos anos 70 pelas empresas Merck e Eli Lilly. Diferentemente das cefalosporinas, são sintetizadas apenas por bactérias filamentosas. O primeiro membro desta família a ser isolado foi a cefamicina C, produzida por *Nocardia lactamdurans* e *Streptomyces clavuligerus* (OMSTEAD *et al.*, 1985).

Até 1995, 55% dos antibióticos conhecidos eram produzidos por bactérias filamentosas (actinomicetos) do gênero *Streptomyces*. Estreptomicetos são bactérias Gram+ que produzem uma grande variedade de antibióticos e outros componentes de utilidade farmacêutica. Pelo menos 70 dos aproximadamente 100 antibióticos utilizados no tratamento de infecções humanas são derivados de substâncias produzidas por *Streptomyces* (KOTA e SRIDHAR, 1999).

Stapley *et al.* (1972) descobriram oito espécies de estreptomicetos que produzem uma ou mais cefamicinas. Relataram que *Streptomyces griseus* produz a cefamicina A e B, e *Streptomyces lactamdurans* produz cefamicina C. A Figura 3.2 ilustra a estrutura química da cefamicina C.

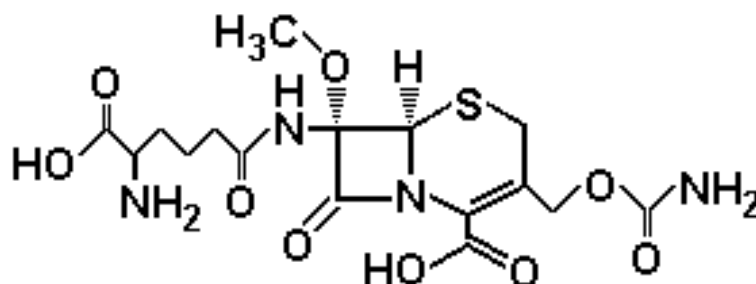


Figura 3.2: Estrutura química da cefamicina C

A cefamicina C é particularmente ativa contra organismos gram-negativos e não ativa contra gram-positivos. Como resultado disto, esta molécula foi quimicamente modificada para aumentar seu espectro antibacteriano (OMSTEAD *et al.*, 1985), gerando derivados como cefoxitina, cefotetan, cefametazol, temocilina, que são altamente potentes contra organismos anaeróbicos Gram- e Gram+ e infecções micobacterianas e que fazem parte das formulações de medicamentos disponíveis comercialmente (SRIDHAR *et al.*, 2002).

3.5 Biossíntese da Cefamicina C

A biossíntese de metabólitos secundários pode ser regulada por pelo menos quatro níveis diferentes. No nível mais alto estão os reguladores globais e específicos da expressão dos genes do metabolismo secundário. Estes elementos genéticos são capazes de influenciar significativamente a velocidade biossintética em microrganismos que produzem metabólitos secundários. No segundo nível se encontram os genes estruturais e suas proteínas que especificam o caminho biossintético de um metabólito secundário particular. Neste nível, as atividades das enzimas que constituem a rota a velocidade de produção de metabólitos secundários. O terceiro nível é representado pelos suprimentos de cofatores e precursores que são a interface entre o metabolismo primário e secundário. E o quarto nível é o transporte dos metabólitos secundários para fora da célula (KHETAN *et al.*, 1999).

A biossíntese de penicilina N, cefalosporina e cefamicina C em *S. clavuligerus* ocorre por uma rota biossintética comum que parece ser fortemente regulada por fontes de

carbono e nitrogênio presentes no meio de cultura, mas fracamente regulada por fosfato (ROMERO *et al.*, 1984).

Romero *et al.* (1984) observaram que as biossínteses de ácido clavulânico e cefamicina C ocorrem paralelamente ao crescimento celular.

Lisina, cisteína e valina são os precursores da biossíntese de cefamicina C em *Streptomyces clavuligerus*. A Figura 3.3 ilustra a rota biossintética da cefamicina C em *S. clavuligerus*. No primeiro passo da biossíntese lisina é convertida em ácido α -aminoadípico através de 2 passos de conversão. O ácido α -aminoadípico sofre uma reação de condensação com 2 aminoácidos, cisteína e valina numa reação catalisada por uma ACV sintetase multifuncional, para formar o tripeptídeo δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV). A ciclase converte o tripeptídeo ACV em um componente com anel β -lactâmico, a isopenicilina N (KHETAN *et al.*, 1999). A ACV ciclase requer oxigênio molecular e ferro para a atividade (LIRAS *et al.*, 1999). O que explica a necessidade de alta oxigenação do caldo durante o processo fermentativo. Na etapa seguinte isopenicilina N é convertida em penicilina N por transformação da cadeia lateral de ácido L- α -aminoadípico (L- α -AAA) pela ação de uma racemase. Depois da expansão do anel que forma a desacetoxicefalosporina pela ação da expandase, ocorre a hidroxilação à desacetilcefalosporina C, controlada por uma dioxigenase. A acetilação da cefalosporina C por uma transferase depende de acetyl-CoA e é o ponto final da via biossintética em fungos. Além disso, ocorrem em estreptomicetos, outras transformações: a cefalosporina C ou o derivado carbamoil da desacetilcefalosporina C é convertido em uma reação de duas etapas com oxigênio molecular, em S-adenosilmetionina e em 7-metoxicefalosporina (cefamicina C). Deve-se observar que, na biossíntese de cefamicinas por estreptomicetos, o α -AAA não é um precursor da L-lisina, porque os estreptomicetos sintetizam a lisina pela via do ácido diaminopimélico (SATO, 2002). Dois caminhos de conversão da lisina a ácido α -aminoadípico têm sido demonstrados, a primeira rota envolve α -desaminação da lisina para 1-piperideno-2-carboxilato e fornece pipercolato e 1-piperideno-6-carboxilato (a forma cíclica do aminoadípico semi-aldeído), a segunda rota produz 1-piperideno-6-carboxilato diretamente via ϵ -desaminação da L-lisina. Em ambos os caminhos o último passo para α -aminoadípico é uma nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada à uma oxidação enzimática de 1-piperideno-6-carboxilato (KERN *et al.*, 1980).

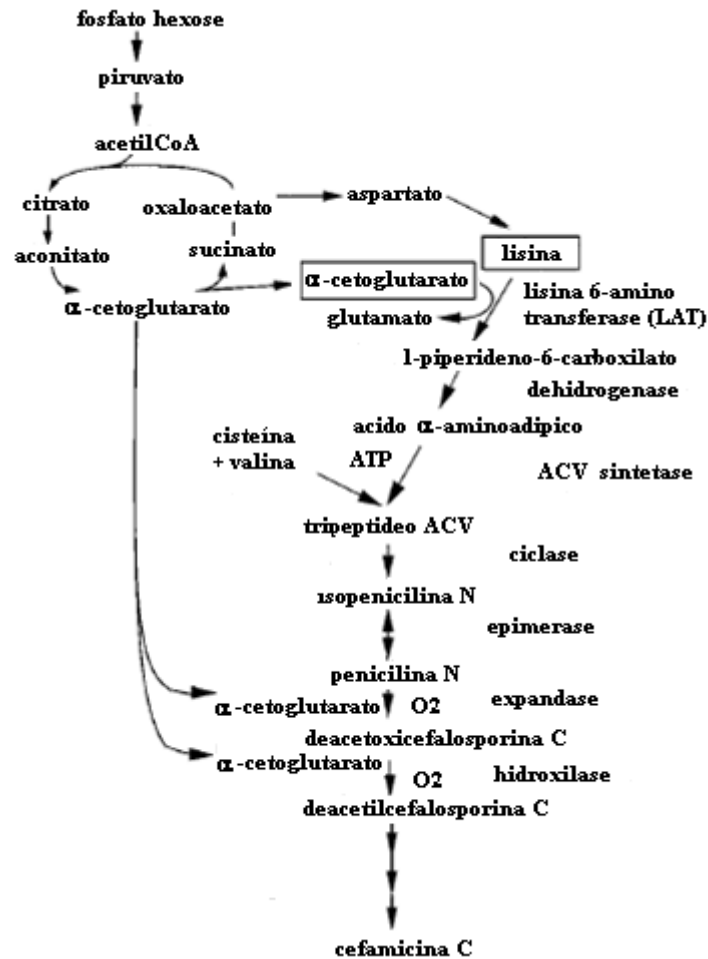


Figura 3.3. Rota biossintética da cefamicina C em *Streptomyces clavuligerus* (KHETAN *et al.*, 1999)

O ácido α -aminoadípico não é um intermediário da rota biossintética da cefamicina, ele é formado pelo metabolismo da lisina (MADDURI *et al.*, 1991). *Streptomyces clavuligerus* pode metabolizar L-lisina por dois diferentes caminhos: via cadaverina para o crescimento e via L- α -aminoadípico para a produção de antibióticos β -lactâmicos. A rota da cadaverina é obrigatoriamente para completar o catabolismo da lisina, enquanto a rota do L- α -aminoadípico não é necessária para o crescimento e fornece um precursor para a biossíntese de β -lactâmicos (RIUS *et al.*, 1996). Rius *et al.* (1996) observaram que altas concentrações de lisina estão associadas a altas produções de antibióticos. A conversão da lisina em 1-piperideno-6-carboxilato pela enzima ϵ -aminotransferase (LAT) marca o primeiro passo da biossíntese da cefamicina C (RIUS *et al.*, 1997). A LAT utiliza α -cetoglutarato como cosubstrato e fosfato piridoxil como cofator. O aumento da atividade da LAT causa um aumento na velocidade de produção de cefalosporinas. A produção do ácido α -aminoadípico e de cefamicina C no caldo de fermentação surge ao mesmo tempo, e suas concentrações

aumentam durante a fase estacionária, embora a atividade específica da LAT diminua (MADDURI *et al.*, 1991).

Khetan *et al.* (1999) observaram uma redução de mais de 90% na atividade da LAT quando substituíram o α -cetogluturato por piruvato no meio de cultura em concentrações iguais. Isto também foi observado por Kern *et al.* (1980). Ainda, lisina exógena adicionada ao caldo de cultivo foi estimulante pra a produção de cefamicina C (KHETAN *et al.*, 1999).

O aumento do nível de α -cetogluturato intracelular deve levar a uma maior produtividade em cefalosporina (KHETAN *et al.*, 1999).

Kern *et al.* (1980) cultivaram *S. lactamdurans* para a produção de cefamicina C e obtiveram um pico de atividade da LAT no início da fermentação, diminuindo rapidamente com o surgimento do antibiótico.

Rius *et al.* (1997) observaram alta atividade específica da LAT em cultivos com 1% m/v de glicerol em 24 h. Depois deste tempo sua atividade diminuiu rapidamente. Com 2 e 3% m/v de glicerol, a atividade específica da LAT alcançou um máximo em 48 h, diminuindo depois disso. Com 3% m/v de glicerol observou-se uma redução de 20-30% na atividade da LAT.

Madduri *et al.* (1991) observaram que diferentemente de outras enzimas da biossíntese de antibióticos β -lactâmicos, a LAT não é regulada por nitrogênio. Além disso mostra uma resposta incomum à altas concentrações de fosfato, visto que metabólitos secundários são reprimidos com o aumento da concentração de fosfato, mas a atividade da LAT foi aumentada.

Malmberg *et al.* (1995) realizaram cultivos com uma linhagem selvagem de *S. clavuligerus* e uma linhagem recombinante com uma cópia adicional do gene *lat* que codifica a LAT. A linhagem recombinante exibiu uma atividade mais alta da LAT e produziu 2 vezes mais antibióticos β -lactâmicos do que a linhagem selvagem, sugerindo que a LAT é uma enzima limitante na biossíntese de cefamicina C, mas observaram que embora o nível da LAT tenha sido maior que na linhagem recombinante, a velocidade específica de produção foi maior só no início da fase de crescimento celular, permanecendo com níveis iguais à selvagem na fase estacionária, implicando que a LAT é limitante só nos estágios iniciais de crescimento e que outros fatores se tornam limitantes em fases de crescimento mais tardias. Os autores observaram também que os níveis de ácido α -aminoadípico e ACV na linhagem recombinante teve um aumento enquanto que o acúmulo de outros precursores, como, cisteína, valina e lisina permaneceram com a mesma quantidade obtida na linhagem

selvagem. Os autores concluíram que alteração na atividade da LAT deve no final perturbar o acúmulo intracelular de ácido α -aminoadípico (um dos 3 aminoácidos precursores e produto catabólito da lisina) e de outros aminoácidos envolvidos na biossíntese da lisina.

Malmberg *et al.* (1995) observaram que LAT e ACVsintetase controlam a produção de cefamicinas nos estágios iniciais de cultivo e que os acúmulos de ácido α -aminoadípico e de ACV sugere que enzimas mais tardias, tais como: ciclase, epimerase ou expandase exerçam controle na biossíntese da cefamicina.

Lebrihi *et al.* (1988b) observaram que a expandase é reprimida na presença de fonte de carbono de fácil assimilação, assim como na presença de altas concentrações de fonte de carbono. Concluíram que o controle da produção de cefamicina C é exercido por repressão da biossíntese da expandase, mostrando que esta enzima tem um importante papel na biossíntese da cefamicina C. As fontes de carbono inibem a atividade da expandase indiretamente devido aos compostos fosfatados formados a partir de glicerol e amido na rota glicolítica.

Braña *et al.* (1985) observaram que a ciclase é reprimida em meio contendo alta concentração de amônio e que, mantendo os níveis de amônio no meio de cultura baixos, resulta na desrepressão da ciclase e num aumento na produção de cefalosporinas, indicando a importância desta enzima no controle da rota de β -lactâmicos.

Mahro e Demain (1987) adicionaram penicilina N em meios de cultura de uma linhagem de *Streptomyces clavuligerus* produtora de cefalosporinas (NRRL 3585) e de um mutante não produtor de cefalosporinas e observaram que para a linhagem selvagem, a adição de penicilina N não levou a altas concentrações de cefamicina C. No entanto, na linhagem mutante, que não produzia compostos com atividade biológica sem adição de penicilina N, com a adição houve produção. Concluíram que o mutante é capaz de converter externamente a penicilina N alimentada em cefalosporinas. Os autores assumiram que a capacidade de conversão de penicilina N do mutante é representada por um fenótipo particular, já que a adição de penicilina N não levou o estímulo da produção de cefamicina C na linhagem selvagem.

3.6 Condições de cultivo para a produção de cefamicina C (CefC)

Com base na literatura pesquisada, tem-se conhecimento de duas patentes relacionadas à produção de CefC, depositadas por empresas. A primeira foi depositada em

1977 pela Merck & Co Inc. (INAMINE e BIRNBAUM, 1977), empresa pioneira na produção deste importante fármaco. Nessa patente são apresentados resultados de cultivos de *Nocardia lactamdurans* realizados sob diferentes condições. Uma concentração máxima de 848 mg.L⁻¹ de CefC foi obtida em mesa incubadora rotativa, utiliza meio de cultura contendo amido de milho, solúveis de destilaria (“distillers solubles”), farinha de soja, glicerol, caseína hidrolisada, FeSO₄·7H₂O, tiosulfato de sódio, DL-lisina. Uma patente posterior (KAMOGASHIRA *et al.*, 1982) depositada em 1982 pela empresa Otsuka Pharmaceuticals utilizou uma nova linhagem isolada do solo do Quênia, *Streptomyces sp.* OFR 1022, na produção de CefC.

Trabalhos encontrados na literatura abordam os efeitos de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e fosfato na regulação da biossíntese de CefC, bem como a influência das condições de oxigenação do caldo fermentativo (LEBRIHI *et al.*, 1987; LEBRIHI *et al.*, 1988; YEGNESWARAN *et al.*, 1988).

O desenvolvimento do meio de cultura para a produção de CefC requer uma apropriada seleção de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio e traços de nutrientes, que forneçam máximo rendimento no produto desejado (SARADA e SRIDHAR, 1998). A CefC é obtida a partir de cultivos descontínuos (batelada) utilizando meios de cultura complexos com glicerol, amido e lipídeos como fontes de carbono e extrato de levedura, água de maceração de milho (milhocina), farinhas e hidrolisados (peptona e triptona) e aminoácidos como fontes de nitrogênio.

Pesquisas com produção de β-lactâmicos durante as décadas de 80 e 90 revelaram existência de regulação negativa da rota biossintética destes antibióticos por nutrientes, tais como: fontes de carbono (glicose, maltose e glicerol), nitrogênio (amônia, alanina e histidina) e fósforo (fosfato) (DEMAIN e ELANDER, 1999). É conhecido que amônia, glicerol e fosfato reprimem a biossíntese de enzimas requeridas para a produção de CefC (LEBRIHI *et al.*, 1988a).

3.6.1 Fontes de carbono

Regulação catabólita da biossíntese de antibióticos por carbono é um fenômeno regulatório que afeta a produção de muitos antibióticos. A regulação catabólita foi observada na produção de cefamicina C por *Streptomyces lactamdurans*. Glicose reprime a biossíntese

da expandase e os derivados da glicose formados durante a glicólise também podem inibir esta enzima (LEBRIHI *et al.*, 1988b).

Streptomyces clavuligerus não metaboliza glicose, devido a sua incapacidade de transportar a glicose (ZHANG e DEMAIN, 1992), não podendo ser utilizada para se estudar a interferência dessa fonte de carbono na produção de antibióticos por este organismo. A maltose pode ser apropriada para estudar a interferência da fonte de carbono já que é conhecida por reprimir a produção de cefalosporina em *Streptomyces clavuligerus* (ROLLINS *et al.*, 1988b). Os autores observaram que a maltose regula negativamente os primeiros passos da rota biossintética da CefC em *Streptomyces clavuligerus*, reduzindo a velocidade de produção de penicilina N e o subsequente acúmulo deste intermediário.

Zhang e Demain (1992) observaram que a utilização de 2% m/v de glicerol como fonte de carbono resultou na diminuição em 50% na produção de CefC por *Streptomyces clavuligerus*, em relação à utilização de 0,5% de glicerol. A adição de 1 mM de cisteína no meio de cultura resultou em aumento na produção específica de cefamicina C no cultivo contendo 2% m/v de glicerol. Observaram também que a adição de 10 mM de cisteína inibiu o crescimento celular e reprimiu a produção de CefC.

Lebrihi *et al.* (1988b) realizaram cultivos de *Streptomyces clavuligerus* em meios de cultura contendo amido e glicerol como fonte de carbono e observaram que o crescimento celular foi maior em meio contendo glicerol do que com amido, mas a produção de cefamicina foi menor. Observaram, também que as sínteses de CefC sintetase e expandase foram inferiores em meio contendo glicerol do que naquele contendo amido e as atividades destas enzimas foram reprimidas em 55% (CefC sintetase) e 40% (expandase) em meio contendo glicerol do que naquele contendo amido. Observaram que altas concentrações de amido e glicerol no meio de cultura causam baixa produtividade específica e volumétrica de cefamicina C, mas o efeito exercido pelo amido é menor.

Rius *et al.* (1997) observaram que altas concentrações de glicerol e amido no meio de cultura reprimiram a produção de antibiótico. Cultivos com 3% de glicerol e 3% de amido diminuí a produção de cefalosporinas em 40% e 50% respectivamente, comparados com cultivos com 1% destas fontes de carbono. Observaram também um aumento de aproximadamente 250% na atividade da LAT quando utilizaram 3% de amido e uma redução de 20% utilizando 3% de glicerol.

Romero *et al.* (1984) observaram que na ausência de glicerol como fonte de carbono não ocorreu a produção de ácido clavulânico, mostrando que nestas condições a biossíntese da cefamicina C foi dissociada da biossíntese do ácido clavulânico. Os autores

mostraram que ácido glutâmico e α -cetogluturato foram excelentes fontes de carbono para a biossíntese de cefamicina C.

Óleos vegetais tais como óleo de milho, de algodão e de soja vêm sendo utilizados como fontes de carbono porque contêm ácidos oléico, linolênico e linoléico como componentes de carbono puro; e também por evitar a repressão catabólica pela sua lenta assimilação (PARK *et al.*, 1994). Park *et al.* (1994) observaram que a linhagem de *Streptomyces sp* 6621 consome óleos vegetais como fonte de carbono para produzir CefC. Os autores obtiveram 524,4 mg.L⁻¹ de CefC em shaker com meio sintético de cultura contendo 30 g.L⁻¹ de óleo de soja e 2 g.L⁻¹ de CefC em fermentador utilizando 7 g.L⁻¹ de óleo de soja. Observaram que óleo de soja como fonte de carbono foi mais eficiente para a produção de CefC do que amido.

Mitsuru *et al.* (1997) utilizaram óleo de soja como fonte de carbono na produção de cefamicina C e obtiveram uma produção máxima de 1,8 g.L⁻¹ de cefamicina C utilizando 30 g.L⁻¹ de óleo de soja. Observaram que a concentração de cefamicina C diminuiu com o aumento da concentração de óleo de soja. Observaram também que o acúmulo de ácidos graxos pode causar inibição na produção de cefamicina C. Os autores estudaram também a adição de um suporte mineral no meio de cultura, sendo que o uso do suporte aumentou a interface óleo-água e o consumo de óleo no cultivo e, conseqüentemente, a produção de cefamicina C. Os autores obtiveram uma produção de cefamicina C de 2,8 g.L⁻¹ quando utilizaram 15 g.L⁻¹ de suporte.

3.6.2 Fontes de nitrogênio

Na produção de antibióticos β -lactâmicos, o suprimento de nitrogênio é requerido tanto para o crescimento celular quanto para a biossíntese do produto. Os componentes utilizados em meio de cultura para a síntese de CefC incluem fontes de carbono e de nitrogênio de lenta assimilação (OMSTEAD *et al.*, 1985).

Braña *et al.* (1985) aumentaram a concentração de NH₄Cl no meio de cultura contendo 15 mM de asparagina e observaram uma progressiva e forte diminuição na produção de cefalosporinas. Em cultivos contendo NH₄Cl como única fonte de nitrogênio a produção de antibiótico foi menor do que nos cultivos contendo apenas asparagina. Observaram também que a atividade da ciclase teve um aumento em cultivos contendo asparagina e permaneceu

em níveis baixos em meios contendo amônio. A produção de antibióticos é reduzida na presença de alta concentração de amônio no meio.

Romero *et al.* (1984) realizaram experimentos com altas concentrações de ácido glutâmico e amônia e observaram redução nas biossínteses de cefamicina C e ácido clavulânico. Tanto o ácido glutâmico quanto a amônia exerceram um forte efeito inibitório na biossíntese da cefamicina C e do ácido clavulânico. A dissociação da produção de ácido clavulânico e cefamicina C não foi alcançada com regulação por nitrogênio.

La Fuente *et al.* (1997) observaram uma diminuição de 77% na produção de CefC em 48 h de cultivo com a adição de 40 mM de amônio. Observaram também repressão na atividade de enzimas da rota biossintética da CefC quando suplementaram o meio de cultura com amônio.

3.6.3 Fontes de fosfato

Quando íons amônio e fosfato são fornecidos para *Streptomyces clavuligerus* em quantidades que satisfazem às necessidades de N e P para obtenção de máximo crescimento, o metabolismo secundário é reprimido (FANG e DEMAIN, 1995).

O efeito inibitório por fosfato é manifestado na produção de muitos antibióticos produzidos por *Streptomyces sp.* (LEBRIHI *et al.*, 1987). Concentrações de fosfato entre 1 e 10 mM são ótimas para combinar crescimento celular e síntese de antibiótico (OMSTEAD *et al.*, 1985). Martín e Demain (1980) relataram que concentrações de fosfato acima de 10 mM reprimem a biossíntese de muitos antibióticos.

A produção de CefC por *Streptomyces clavuligerus* é inibida com concentrações de fosfato superiores a 25 mM (MARTÍN, 1977). Jin *et al.* (2004) observaram que a concentração de fosfato no meio de cultura foi crítica para a produção de CefC por linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus*. Lebrihi *et al.* (1987) relatam que a produção de CefC foi reduzida em 50% quando a concentração de fosfato no meio foi de 50 mM e reduzida em 80% quando utilizado 100 mM desse íon. Realizaram cultivos com 2 mM a 75 mM de fosfato e observaram uma forte repressão na enzima expandase na presença de 75 mM de fosfato. Observaram também que o fosfato pode controlar a δ -(α -aminoadipil)-cisteinil--valina sintetase, a primeira enzima da rota biossintética.

Rius *et al.* (1997) estudaram o efeito do aumento da concentração K_2HPO_4 (de 20 mM para 100 mM) na produção de antibiótico e na atividade da LAT e observaram uma

redução de 85-90% de antibiótico na presença de 100 mM de K_2HPO_4 e que a atividade da LAT não foi afetada.

Romero *et al.* (1984) observaram que a biossíntese do ácido clavulânico foi mais sensível ao fosfato do que a cefamicina C. Mostraram que condições experimentais podem ser estabelecidas em que a formação de ambos os antibióticos foi parcialmente dissociada por regulação por fosfato.

3.6.4 Influência do enxofre na produção de CefC

Romero *et al.* (1984) observaram que células em repouso com limitação por enxofre foram incapazes de sintetizar cefamicina C, mas houve produção de ácido clavulânico. Os autores observaram que a biossíntese de cefamicina C em células em repouso fosfato-limitante foi dependente da adição de fonte de enxofre. Testaram diferentes fontes de enxofre e observaram que 4 mM de sulfato foi melhor precursor para a biossíntese de cefamicina em comparação a metionina e cisteína. Utilizaram também sulfito e tiosulfato como fonte de enxofre, e observaram uma boa produção de cefamicina C.

3.6.5 Influência do oxigênio na produção de CefC

No que concerne à influência da concentração de oxigênio dissolvido, Braña *et al.* (1983) observaram que a interferência do glicerol e de outras fontes de carbono na produção de antibióticos por células em repouso (“resting cells”) de *Streptomyces clavuligerus* não foi sistemática, mas dependeu das condições de aeração empregadas. Muitas reações da rota biossintética das cefalosporinas têm um requerimento por oxigênio (BRAÑA *et al.*, 1983). Desta maneira, estudos têm revelado a importância de controlar a aeração e o pH para melhorar a produtividade desse antibiótico (ROLLINS *et al.*, 1988a). Rollins *et al.* (1988a) relatam que alta transferência de oxigênio durante a fase exponencial de crescimento pode melhorar a produção de antibiótico. A velocidade de formação de produto está relacionada com a quantidade de cada enzima biossintética presente e suas atividades catalíticas individuais. As enzimas deacetoxicefalosporina C sintetase e isopenicilina N sintetase participam da rota biossintética da CefC e a elevação da atividade destas enzimas em *Streptomyces clavuligerus* pode ter efeitos benéficos na produção de CefC por este organismo. Estas sintetases requerem oxigênio em suas reações catalíticas e suas atividades

são sensíveis ao grau de oxigenação da cultura e à velocidade de transferência de oxigênio no biorreator (ROLLINS *et al.*, 1990).

Yegneswaran *et al.* (1991) observaram um aumento de 2 a 3 vezes na atividade específica da desacetoxicefalosporina C sintetase e de 1 a 3 vezes na da isopenicilina N sintetase quando o oxigênio dissolvido foi mantido em limites de saturação durante toda a fermentação. Esses autores relatam que, em estudos anteriores utilizando meio de cultura definido, a redução na quantidade de oxigênio dissolvido à aeração constante resultou em hidrólise do antibiótico. Observaram durante crescimento celular em meio complexo que o controle do oxigênio dissolvido em 50 e 100% da saturação determinou um aumento na velocidade específica de produção de CefC de 2 a 3 vezes em comparação com experimentos realizados sem o controle do oxigênio dissolvido.

Okabe *et al.* (1992) estudaram a influência da quantidade de oxigênio no meio de cultura na produção de cefamicina C testando diferentes volumes de meios de cultura em Erlenmeyers de 500 mL em mesa incubadora rotativa. Os autores observaram que a produção de cefamicina C diminuiu com o aumento do volume de meio de cultura, indicando que o fornecimento de oxigênio influenciou significativamente na produção de cefamicina C. Com estes resultados em mesa incubadora rotativa, os autores estudaram a produção de CefC em biorreator de 20 L com diferentes velocidades de rotação (300, 400 e 500 rpm), com particular atenção pra produção de penicilina N, considerado ser um precursor da produção de CefC. Observaram que a produção de cefamicina C via penicilina N é reprimida quando há limitação de oxigênio, porque uma quantidade considerável de oxigênio é requerida para a expansão do anel 5 da penicilina N para anel 6 da deacetoxicefalosporina C, que é um dos mais importantes intermediários da cefamicina C a partir da penicilina N.

3.6.6 Influência do pH

Quanto à influência do pH, Stapley *et al.* (1972) relatam que a atividade da CefC é mais alta em pH neutro, o que também está de acordo com Inamine e Birnbaum (1977) que relatam que o pH ótimo para a produção de CefC está entre 6 e 8 e a temperatura ótima entre 24 e 32°C. Kota e Sridhar (1999) analisaram o efeito do pH e da temperatura na produção de CefC por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos em estado sólido e observaram que o pH ótimo de produção foi 6,5 e a temperatura ótima de 30°C. Observaram também que em pHs acima de 8 não houve produção.

Rius *et al.* (1997) observaram uma diminuição no pH do meio quando aumentaram a concentração de glicerol de 1% para 2 e 3% e para minimizar possíveis efeitos na atividade da LAT e na produção de antibiótico, aumentaram a concentração de MOPS de 100 mM para 200 mM, o pH nestas condições se manteve estável, mas não observaram efeito na formação da LAT, concluindo que esta enzima não é afetada pelo pH.

3.6.7 Influência do inóculo

No que diz respeito às condições do inóculo, Neves *et al.* (2001) relatam a importância da qualidade do inóculo nos processos fermentativos. Os critérios necessários para se obter um inóculo satisfatório são: o inóculo deve estar em um estado ativo e saudável para minimizar a duração da fase “lag” na fermentação subsequente, estar disponível em volume suficientemente grande para fornecer um tamanho ótimo de inóculo (3 a 10% do volume de meio), apresentar uma forma morfológica apropriada, estar livre de contaminação e a biomassa inoculada deve conservar a sua capacidade de formar produto. Baixas reprodutibilidades em cultivos são geralmente obtidas como resultado da variação da concentração de biomassa e da atividade metabólica da pré-cultura no instante do inóculo.

Sánchez e Braña (1996) realizaram cultivos de *Streptomyces clavuligerus* para a produção de CefC e ácido clavulânico com inóculo com diferentes densidades celulares e observaram que inóculo com alta densidade celular favorece a ativação tanto da rota biossintética da CefC quanto à de ácido clavulânico. Cabe ressaltar que a CefC e o ácido clavulânico são sintetizados por rotas biossintéticas independentes e suas produções podem ser ativadas sob condições apropriadas. Concluíram que o metabolismo secundário foi influenciado pela concentração do esporo utilizado no inóculo.

3.7 Repressão catabólica e batelada alimentada

Inibição ou repressão catabólica de enzimas por rápida utilização de fonte de carbono, afeta o metabolismo secundário, principalmente quando a fonte de carbono for glicose. Se glicose for utilizada como fonte de carbono, é usualmente alimentada lentamente, com velocidade contínua, com o intuito de catabólitos não sejam acumulados (VANDAMME, 1984).

Mecanismos regulatórios do metabolismo secundário incluem repressão e inibição de sintetases β -lactâmicas por glicose e outras fontes de carbono e energia,

facilmente metabolizadas pelo microrganismo. Estes componentes são essenciais para o crescimento celular, mas reprimem drasticamente a produção de muitos antibióticos (SILVA *et al.*, 1998).

Para superar os problemas relacionados principalmente com a inibição pelo substrato ou por repressão catabólica são usualmente utilizados cultivos em batelada alimentada. Batelada alimentada é a técnica utilizada em processos microbianos na qual um ou mais nutrientes são supridos ao reator durante o cultivo enquanto os produtos permanecem no seu interior até o final do processo (SILVA *et al.*, 1998).

Principal propósito da batelada alimentada é controlar a concentração do substrato dentro da cultura. Para estabelecer a técnica da batelada alimentada duas decisões devem ser feitas: o tipo de nutriente e o modo de alimentação. A batelada alimentada pode ser dividida em relação à velocidade de alimentação em: constante, exponencial e otimizada (YAMANÈ e SHIMIZU, 1984).

Cultivos em batelada alimentada são comumente empregados para se obter alta densidade celular e/ou máxima formação de produto. A estratégia ótima para a fermentação em batelada alimentada de muitos organismos é por alimentação de substrato limitante na mesma velocidade que este é utilizado pelo organismo (KLEMAN *et al.*, 1991).

A característica básica dos processos microbianos em batelada alimentada é que as concentrações de nutrientes alimentadas no biorreator podem ser controladas voluntariamente por mudanças na velocidade de alimentação (YAMANÈ e SHIMIZU, 1984).

Batelada alimentada é superior à batelada convencional especialmente quando mudanças na concentração de nutrientes afetam o rendimento ou produtividade do metabólito desejado (YAMANÈ e SHIMIZU, 1984).

A batelada alimentada é efetiva nos seguintes processos:

- inibição por substrato: nutrientes como metanol, etanol, ácido acético e componentes aromáticos inibem o crescimento de microrganismos mesmo em baixas concentrações. Adicionando tais substratos corretamente a fase lag pode ser encurtada e a inibição do crescimento reduzida;

- alta concentração celular: em batelada para obter alta concentração celular é necessário alta concentração de nutrientes o que pode inibir o crescimento; efeito glicose, por exemplo na produção de pão, o etanol é produzido em cultivos aeróbios quando há excesso de açúcar, e o etanol é a principal causa do baixo rendimento celular, para reduzir este efeito, o processo em batelada alimentada é geralmente empregado;

- repressão catabólita: quando um microrganismo está sendo cultivado em condições com uma fonte de carbono de rápida metabolização tal como glicose, resulta num aumento da concentração intracelular de ATP que leva a repressão da enzimas, causando uma baixa metabolização da fonte de energia, efeito observado por muitas enzimas envolvidas na rota catabólica e um método para superar esta repressão é a batelada alimentada, em que a concentração de glicose é mantida baixa, onde o crescimento é restrito e a biossíntese de enzimas desreprimida;

- mutantes auxotróficos: em processos microbianos que empregam mutantes auxotróficos o excesso de nutrientes resulta em alto crescimento celular com pequeno acúmulo do metabólito de interesse, nestes processos o acúmulo de metabólito de interesse pode ser maximizado por crescimento do mutante em quantidade limitada de nutriente requerido;

- extensão do tempo de operação: em processos microbianos não associados ao crescimento como a produção de antibiótico, o microorganismo utiliza primeiro a fonte de carbono para crescimento e depois sintetizam o antibiótico, em processos em batelada a fase de produção é curta devido a falta de fonte de carbono, para prolongar e manter alta atividade de síntese, a fonte de carbono ou precursores são alimentados no reator à velocidade controlada; substituição de água perdida por evaporação, em processos de períodos extensos pode haver em 2 semanas perda de 25% do meio de cultura inicial, isto pode ser contornado por alimentação controlada de nutrientes à uma velocidade equivalente à velocidade média de perda de água por evaporação;

- diminuição da viscosidade do meio de cultura: na produção de biopolímeros um aumento na viscosidade irá aumentar o consumo de potência na agitação e diminuir a eficiência de transferência de oxigênio, a viscosidade pode ser mantida baixa por alimentação contínua de nutrientes (YAMANÈ e SHIMIZU, 1984).

Dessa forma, em muitos processos de produção de antibióticos, a condução do processo em batelada alimentada conduz a uma melhoria na produção do metabólito de interesse, mostrando que esse tipo de processo pode ser vantajoso para a produção de antibióticos. Nas produções de outros antibióticos β -lactâmicos, como penicilina G e cefalosporina C, emprega-se a batelada alimentada.

Shih e Shen (2006) realizaram estratégias de controle de pH e de alimentação de glicose na produção de poli- ϵ -lisina por *Streptomyces albulus* e observaram um aumento de 258% da produção.

Colombié et al. (2005) relataram um aumento na produção de espiramicina por *Streptomyces ambofaciens* de 88 para 150 mg/L quando a estratégia de batelada alimentada foi realizada.

Saudagar e Singhal (2007) testaram o efeito da alimentação intermitente de glicerol, arginina e treonina na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* e observaram aumento na produção de aproximadamente 20%.

Cabe salientar que há poucos trabalhos na literatura sobre a produção de cefamicina C. Não são encontrados estudos relacionados com a definição das melhores fontes de C e N e, portanto, não há unanimidade na composição de um meio apropriado, visto que é um metabólito secundário e que não consome glicose. Também, não há relatos de estudos sobre o uso de batelada alimentada testando diferentes substratos e condições de alimentação no sentido de melhorar a produção de CefC, bem como não há estudos de estratégias de alimentação que possam dissociar as produções de CefC e AC, o que justifica a proposta do presente trabalho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em cinco etapas, totalizando 42 cultivos em mesa incubadora rotativa e 33 cultivos em biorreator, onde foram avaliados os seguintes tópicos:

1. Nova metodologia de determinação de cefamicina C.
2. Avaliação de meios de cultura para a produção de cefamicina C.
3. Avaliação de fontes de carbono e nitrogênio na produção de cefamicina C
4. Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio à base de soja na produção de cefamicina C
5. Avaliação da produção de cefamicina C em batelada alimentada utilizando diferentes fontes de carbono e condições de alimentação.

4.1. Microrganismo

Foram utilizadas duas linhagens de *Streptomyces clavuligerus*, ATCC 27064 e DSM 41826, mantidas em glicerol 10% m/v a -75 °C.

4.2 Meios de cultura

4.2.1 Meio de cultura de reativação

Na etapa de reativação foi utilizado o meio de cultura descrito por Kieser *et al.* (2000), com a seguinte composição (em g.L⁻¹): triptona (5,0); extrato de malte (10,0); extrato de levedura (3,0); tampão MOPS (21,0); pH 6,8.

4.3 Métodos Analíticos

4.3.1 Determinação da concentração celular

Devido à presença de sólidos no caldo fermentativo, provenientes dos meios de cultura utilizados, o uso do método tradicional da “massa seca” para a determinação da concentração celular (C_x) fica prejudicado. Portanto, a concentração celular foi avaliada durante os cultivos em mesa incubadora rotativa indiretamente por medidas reológicas do caldo fermentativo através de um reômetro digital de cilindros concêntricos Brookfield Model DV-III+, sendo o índice de consistência (K) do caldo o principal parâmetro considerado para acompanhar o crescimento celular.

Em algumas etapas do trabalho, a concentração celular foi determinada pelo método da massa seca por filtração de um volume conhecido de amostra, lavagem e determinação da massa de células após secagem em estufa a 60°C até massa constante.

4.3.2 Determinação da concentração de amido

A concentração de amido foi determinada através de análise de açúcares redutores totais (ART) pela metodologia do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

Este método baseia-se na reação de monossacarídeos com o reagente DNS (3-5 ácido dinitrosalicílico). O reagente utilizado é composto de 300 g.L⁻¹ de sal de Rochelle P.A. (tartarato duplo de sódio e potássio), 10 g.L⁻¹ de DNS e 16 g.L⁻¹ de NaOH.

No presente caso, houve a necessidade de uma hidrólise ácida da amostra. A metodologia empregada baseou-se em duas etapas: uma hidrólise ácida e a análise de ART propriamente dita.

- Hidrólise ácida da amostra:
 1. Adiciona-se uma quantidade conhecida de amostra em tubos de ensaio,
 2. Adiciona-se 1 mL de solução de ácido clorídrico 10 M para cada 1 mL de amostra adicionada,
 3. Hidrolisa-se a 100°C por 30 min,
 4. Neutraliza-se a solução obtida com solução de NaOH,
 5. Transfere-se a solução pra balões volumétricos e completa-se os volumes dos balões com água destilada,

- Reação com o DNS

1. Preparar o reagente de DNS,
2. Adiciona-se 1 mL de amostra a ser analisada, ou água para o branco, em tubos de Follin-Wu.

3. Adiciona-se à solução, 2 mL de reagente DNS,
4. Reage-se por 5 minutos à temperatura de 100°C,
5. Resfria-se e completa-se o volume dos frascos,
6. Lê-se os valores de ABS para um $\lambda = 540$ nm.

O método descrito é válido para concentrações de ART até 1 g.L⁻¹, sendo que para a determinação da curva de calibração são utilizadas soluções padrão de glicose.

Para determinar a concentração de amido na amostra multiplicou-se a concentração de ART obtida por 0,9.

4.3.3 Determinação da concentração de lipídios

A concentração de lipídios foi determinada pelo método enzimático colorimétrico tal como descrito no kit da Gold Analisa Diagnóstica LTDA para a determinação de triglicerídeos.

4.3.4 Determinação da concentração de glicerol

A concentração de glicerol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se coluna Shodex KS-802 (Lonpak, divisão da Millipore) e água Milli-Q como eluente, tal como descrito no manual do fabricante. O equipamento foi operado à 80°C com uma vazão de 1 mL.min⁻¹. Os picos foram detectados utilizando-se um medidor de índice de refração das substâncias modelo W410 da Waters. A concentração de glicerol foi determinada a partir de curvas de calibração obtida com soluções padrões com concentrações inferiores a 1 g.L⁻¹ de glicerol.

4.3.5 Determinação da concentração de lisina

A concentração de lisina foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) baseado no método proposto por Henrikson e Meredith (1984), utilizando-

se uma coluna Pico-tag (Waters) e sendo o eluente uma mistura de duas fases A e B. A fase A é composta de acetato de sódio tri-hidratado, trietilamina, água mili-Q e acetonitrila. A fase B é composta apenas de água e acetonitrila. Foram utilizadas as seguintes condições de operação: temperatura de 38°C, comprimento de onda de 254 nm, tempo de retenção 20 minutos e gradiente de vazão pré-determinado, tal como descrito no manual fornecido pela Waters para essa análise.

As amostras passaram por etapas de secagem, rehidratação, derivatização até sua diluição em tampão antes de sua injeção no cromatógrafo, de acordo como o método proposto pela Waters. A concentração de lisina foi determinada a partir de uma curva de calibração obtida com a injeção de amostras com concentrações de 0,1, 0,3 e 0,5 g.L⁻¹.

4.3.6 Determinação da concentração de cefamicina C

4.3.6.1 Bioensaio

A concentração de cefamicina C foi determinada como antibióticos β -lactâmicos totais por bioensaio (LIRAS e MARTÍN, 2005) utilizando linhagem de *Escherichia coli* ESS cedida gentilmente pela pesquisadora Paloma Liras (Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León, León, Spain), como microrganismo sensível a antibióticos β -lactâmicos e utilizando a cefalosporina C como padrão, devido ao fato de não estar disponível comercialmente o padrão de cefamicina C. Este método foi realizado como descrito na seqüência:

Para suspender os microrganismos utilizados no bioensaio, adiciona-se uma proporção aproximada de 10 mL de solução salina (0,9% m/v) para cada tubo contendo bactérias cultivadas em 20 mL de agar nutriente inclinado. A DO da suspensão resultante é lida a 600 nm, em espectrofotômetro.

A suspensão obtida é misturada ao meio agar nutriente de tal forma que 1 mL da solução com OD₆₀₀ igual a 1 seja adicionado a 100 mL de agar.

Após a mistura, alíquotas de 40 mL de agar são despejadas em placas de Petri estéreis com 150 mm de diâmetro.

Após solidificação do meio, perfura-se o número necessário de poços de 5 mm de diâmetro, nos quais são adicionados 20 μ L das soluções preparadas de amostra e de padrão de antibiótico, adequadamente diluídas.

As placas são incubadas a 36-37°C por 8 horas a 24 horas medindo-se, então, os diâmetros dos halos de inibição.

A concentração da amostra (em mg.L⁻¹) é determinada por interpolação logarítmica das medidas dos diâmetros dos halos de inibição, através da equação 4.1.

$$\theta = \frac{\left(\frac{A_H + \sum A_L}{A_H + \sum P_H} \right)}{\left(\frac{P_H + \sum P_L}{A_L + \sum P_L} \right)} \cdot \log \left(\text{fator de diluição} \right) \quad (4.1)$$

onde:

A e P: valores dos diâmetros dos halos de inibição das amostras e dos padrões de cefalosporina, respectivamente.

H e L: subscritos indicando alta e baixa concentração, respectivamente.

fator de diluição: razão entre a concentração mais alta e a mais baixa das soluções, tanto dos padrões como das amostras.

Finalmente, a concentração da amostra é determinada pela equação (4.2) ou (4.3):

$$C_{\text{amostra}} = 10^{\theta} * \text{conc. mais alta do padrão} * 1 \quad (4.2)$$

ou

$$C_{\text{amostra}} = 10^{\theta} * \text{conc. mais baixa do padrão} * \text{fator de diluição} \quad (4.3)$$

4.3.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A concentração de cefamicina C também foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) através da metodologia desenvolvida no DEQ-UFSCar, no qual é utilizada a coluna Sinergy MAX PP 12 da Phenomenex como fase estacionária e solução de ácido acético 0,01 M como fase móvel a uma vazão de 2 ml.min⁻¹. A temperatura de separação foi de 28°C e os picos detectados no comprimento de onda de 254 nm. A curva de calibração foi obtida através de injeção de vários valores de amostra cuja concentração de antibiótico foi determinada por bioensaio (BAPTISTA NETO *et al.*, 2008).

4.3.7 Determinação da concentração de ácido clavulânico

A concentração de ácido clavulânico foi determinada pelo método espectrofotométrico proposto por Bird *et al.* (1982), que se baseia na derivatização do ácido

clavulânico com uma solução de imidazol e leitura de absorvância utilizando o ultravioleta no comprimento de onda de 311nm. O método é descrito como segue:

Leitura da Absorvância A (ABS_A):

1. Em tubos de ensaios são adicionados 5 mL de solução de imidazol (60 g/L e pH =6,8) em 1 mL de amostra ou padrão contendo ácido clavulânico em concentração inferior a 50 mg/L e a mistura é incubada por 15 minutos a 30°C,
2. Em um tubo de ensaio são misturados 1 mL de água com 5 mL da mesma solução de imidazol, sendo a mistura incubada sob as mesmas condições,
3. A leitura "zero" do espectrofotômetro é ajustada utilizando a solução obtida no passo 2 e em seguida é realizada a leitura do meio reacional obtido no passo 1 e anotado o valor da absorvância (ABS_A).

Leitura da Absorvância B (ABS_B):

1. Em tubos de ensaios, uma mistura contendo 5 mL de água destilada e 1 mL de amostra ou padrão contendo ácido clavulânico é incubada por 15 minutos a 30°C,
2. A leitura "zero" do espectrofotômetro é agora ajustada utilizando água e em seguida a leitura da absorvância da solução obtida no passo 1 é realizada (ABS_B),

Calcula-se o valor da absorvância do composto derivatizado utilizando a equação:

$$ABS = ABS_A - ABS_B$$

A curva de calibração da concentração do composto derivatizado é linear com a absorvância (ABS) para concentrações de ácido clavulânico menores que 50 mg.L⁻¹.

4.4 Metodologia experimental

4.4.1 Cultivos em mesa incubadora rotativa

Foram realizados cultivos descontínuos em mesa incubadora rotativa da NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Co., modelo G-25. A partir de criotubos contendo 3,5 mL de suspensão de *Streptomyces clavuligerus*, mantidos a - 75 °C em ultrafreezer foram inoculados Erlenmeyers de 500 mL contendo 50 mL de meio de reativação previamente esterilizados. A etapa de reativação teve duração de 24 h e foi realizada em mesa incubadora rotativa a 28°C e 250 rpm. Um volume de 5 mL do caldo gerado nesta etapa foi inoculado em Erlenmeyers de 500 mL contendo 45 mL de meio de cultura de inóculo. Esta etapa teve duração e condições idênticas à etapa anterior e, em seguida foram inoculados 5 mL da suspensão Erlenmeyers de

500 mL contendo 45 mL de meio de cultura principal (10% v/v de inóculo). Os Erlenmeyers foram incubados em mesa incubadora rotativa a 28°C e 300 rpm, sendo retiradas amostras de aproximadamente 2 mL a cada 24 horas de cada Erlenmeyer para posterior análises de cefamicina C e de concentração de biomassa.

A Figura 4.1 que segue ilustra o esquema experimental utilizado.

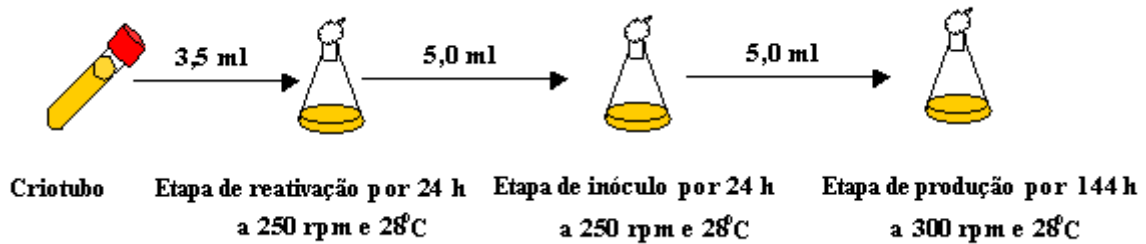


Figura 4.1: Esquema experimental do cultivo em mesa incubadora rotativa

4.4.2 Cultivos em biorreator de bancada

4.4.2.1 Cultivos em batelada

Foram realizados cultivos descontínuos em biorreator de bancada de 5 L, modelo Bioflo III da New Brunswick Co., provido de sistemas de controle de temperatura, pH e concentração de O₂ dissolvido, disponível no laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar, com o objetivo de observar o desempenho dos cultivos em condições de não limitação por oxigênio.

A partir de criotubos contendo 3,5 mL de suspensão de *Streptomyces clavuligerus*, mantidos a -75°C em ultrafreezer, foram inoculados Erlenmeyers de 500 mL contendo 50 mL de meio de reativação previamente esterilizados. A etapa de reativação teve duração de 24 horas e foi realizada em mesa incubadora rotativa a 28°C e 250 rpm. Após esta etapa, 5 mL do caldo gerado nesta etapa foram inoculados em Erlenmeyers de 500 mL contendo 45 mL de meio de cultura de inóculo. Esta etapa teve duração e condições idênticas à etapa anterior. Em seguida foram inoculados 400 mL da suspensão no biorreator contendo 3,6 L de meio de cultura principal (10% v/v de inóculo) previamente esterilizado.

Os cultivos foram realizados a 800 rpm, 0,5 vvm, pH 6,8 e temperatura de 28°C. O procedimento experimental utilizado no cultivo em batelada em biorreator de bancada está ilustrado na Figura 4.2.

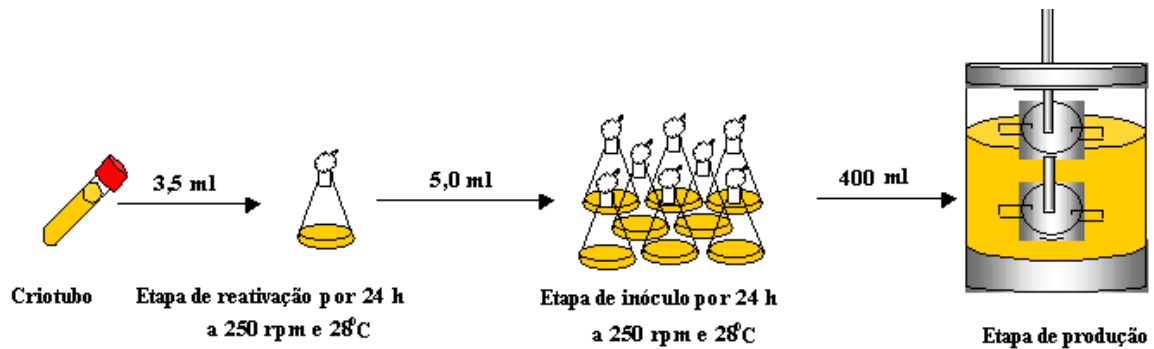


Figura 4.2: Esquema experimental do cultivo no biorreator de bancada

4.4.2.2 Cultivos em batelada alimentada

Os cultivos em batelada alimentada tiveram uma seqüência experimental similar à descrita anteriormente para os cultivos em batelada, a menos, da etapa de alimentação de meio suplementar. A alimentação teve início após 24 h de inoculação, com uma vazão fixa durante todo o cultivo. Os cultivos em batelada alimentada foram finalizados com 120 h de experimento.

As condições de alimentação, vazão volumétrica de alimentação (F) e concentração de substrato na alimentação (C_{s_e}) foram escolhidas considerando condição de estado quase estacionário ($r_s \approx F \cdot C_{s_e} / V$) e considerando pequena variação de volume ou fator $F \cdot C_{s_e} = 0$, baseando-se na velocidade de consumo de substrato ao final do cultivo em batelada. Baseando-se no número e no volume de amostras retiradas ao longo do cultivo e conhecendo-se a vazão volumétrica de alimentação de meio suplementar (F), foi calculado o volume inicial de caldo na etapa de batelada alimentada de modo que o volume final do caldo (em 120 h de cultivo) fosse igual a 4 L.

Para definir a melhor fonte de carbono para a produção de CefC, bem como avaliar o efeito desta na dissociação das produções de AC e CefC, foram realizados cultivos com diferentes vazões volumétricas de alimentação (F) e concentrações de fonte de carbono no meio suplementar (C_{s_e}) utilizando glicerol e amido com fontes de carbono.

O procedimento experimental utilizado nos cultivos em batelada alimentada em biorreator de bancada está ilustrado na Figura 4.3.

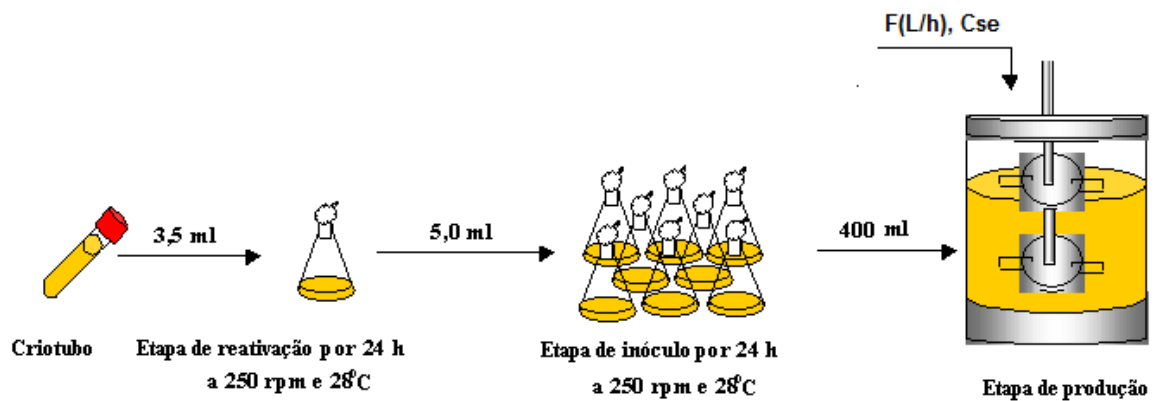


Figura 4.3: Esquema experimental do cultivo em batelada alimentada

4.4.3 Etapa 1: Quantificação de cefamicina C

4.4.3.1 Teste de sensibilidade de *Escherichia coli* ESS

Com a finalidade de avaliar a influência de outros compostos sobre a análise de cefamicina C, avaliou-se a sensibilidade do microrganismo teste, *Escherichia coli* ESS, frente a diferentes padrões.

Segundo informações obtidas do fornecedor do microrganismo, a influência de outros compostos sobre a análise de cefamicina C é quase nula na determinação de sua concentração através de bioensaio (LIRAS e MARTÍN, 2005). Foram realizados testes para verificar a sensibilidade da cefalosporina C, penicilina G (utilizada pelo fato de não ser possível obter a penicilina N comercialmente) e do ácido clavulânico na linhagem de *E. coli* ESS, devido ao fato do *S. clavuligerus* também produzir penicilina N (composto intermediário da rota metabólica de produção da cefamicina C) e o ácido clavulânico em concentrações elevadas, dependendo do meio de cultivo utilizado.

4.4.3.2 Influência das presenças de ácido clavulânico e de penicilina N

Nesta etapa, foram avaliadas as influências das condições de degradação do ácido clavulânico (hidrólise ácida a pH=3,0 e alcalina a pH=9,0) e da hidrólise de penicilina N por penicilinase na análise de cefamicina C presente em amostras de caldos de fermentação provenientes de cultivos em mesa incubadora rotativa.

Na etapa de reativação foi utilizado o meio de cultura (MR) descrito por Kieser *et al.* (2000) e nas etapas de inóculo e de produção foi utilizado como base o meio de cultura

de Antonio (2007) utilizando 10 g.L⁻¹ de glicerol como fonte de carbono e 11 g.L⁻¹ de farinha de soja como fonte de nitrogênio.

Foram retiradas amostras após 72 h e 120 h de cultivo. Estas amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi distribuído em frascos de 20 mL e congeladas para posterior análises.

Para avaliar a influência do ácido clavulânico na análise da cefamicina C, este foi degradado com HCl à pH 3,0 e com NaOH à pH 9,0. O ácido clavulânico foi analisado pelo método proposto por Bird *et al.* (1982) a cada 1 h e, quando esse foi praticamente degradado, a amostra foi neutralizada a pH 7,0. Volumes de 1 mL de amostras foram submetidos a tratamento com penicilinase para avaliar a influência da penicilina N.

Ao final dos tratamentos, todas as amostras foram analisadas quanto às concentrações de cefalosporinas totais por bioensaio pelo método proposto por Liras e Martín (2005).

4.4.4 Etapa 2: Avaliação de meios de cultura para a produção de cefamicina C

Nesta etapa, foram avaliados nove diferentes meios de culturas propostos na literatura para a produção de cefamicina C, conforme descrito no item 4.2.2.

Esta etapa foi realizada em biorreator de bancada de 5 L a 28°C e com vazão de ar mantida a 0,5 vvm. A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada e a frequência de agitação do impelidor foi fixa a 800 rpm.

Nas primeiras 24 h foram retiradas amostras a cada 4 h. Após este período as amostras passaram a ser retiradas a cada 6 h. O volume de cada amostra foi de aproximadamente 20 mL para análises da reologia e posterior determinação das concentrações de substrato e de cefamicina C. Os cultivos tiveram durações de 72 h.

4.4.5 Etapa 3: Avaliação de fontes de carbono e nitrogênio na produção de cefamicina C

Na etapa de reativação e de preparação do inóculo, foi utilizado o meio de cultura (MR) descrito por Kieser *et al.* (2000) e na etapa de produção foi utilizado como base o meio de cultura de Antonio (2007) (18,3 g/L de L-lisina, 0,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 1,75 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,75 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,2 g.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O, 2 g.L⁻¹ de NaCl, 5 mL.L⁻¹ de solução de sais, 21 g.L⁻¹ de tampão MOPS e 1 g.L⁻¹ de tiosulfato de sódio adicionado após 30 h de cultivo), variando as fontes de carbono e de nitrogênio. As fontes de

carbano estudadas foram amido, glicerol, maltose e óleo de soja e de nitrogênio farinha de semente de algodão, farinha de soja, proteína isolada de soja e Soytone®, mantendo-se constante a relação C:N no valor de 5:1 nos meios de cultura de acordo com a literatura (BUSHELL e FRYDAY, 1983). Lisina, embora seja uma fonte de nitrogênio, a mesma foi considerada como precursor da biossíntese de cefamicina C.

Os cultivos desta etapa foram realizados em mesa incubadora rotativa a 28°C, pH em 6,8 e a rotação em 300 rpm e tiveram duração de 144 h. Amostras de aproximadamente 2 mL foram retiradas a cada 24 h e filtradas para posteriores análises de concentração celular e de cefamicina C.

Foram realizados 32 cultivos, sendo 16 utilizando a linhagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 e 16 com a linhagem de *Streptomyces clavuligerus* DSM 41826, conhecida como uma mutante espontânea melhor produtora de cefamicina C. Estes cultivos estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Fontes de carbono e de nitrogênio empregadas nos diferentes cultivos

Ensaio	Fonte de C (FC)	C _{FC} (g/L)	Fonte de N (FN)	C _{FN} (g/L)
1	amido	10	Farinha de semente de algodão	8,50
2	glicerol	10	Farinha de semente de algodão	8,50
3	maltose	10	Farinha de semente de algodão	8,50
4	Óleo de soja	5,4	Farinha de semente de algodão	8,50
5	maltose	10	proteína isolada de soja	5,75
6	Óleo de soja	5,4	proteína isolada de soja	5,75
7	glicerol	10	proteína isolada de soja	5,75
8	amido	10	proteína isolada de soja	5,75
9	glicerol	10	farinha de soja	11,00
10	Amido	10	farinha de soja	11,00
11	Óleo de soja	5,4	farinha de soja	11,00
12	maltose	10	farinha de soja	11,00
13	Óleo de soja	5,4	Soytone®	8,50
14	maltose	10	Soytone®	8,50
15	amido	10	Soytone®	8,50
16	glicerol	10	Soytone®	8,50

4.4.6 Etapa 4: Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio à base de soja

Nesta etapa, foram realizados 3 cultivos de forma a se avaliar o tipo da fonte de nitrogênio proveniente de soja. Utilizaram-se fontes de nitrogênio com diferentes graus de

solubilidade: totalmente solúvel (Soytone®) (cultivo B14), solubilidade mediana (proteína isolada de soja) (cultivo B15) e bastante insolúvel (farinha de soja) (cultivo B16).

Esta etapa foi realizada em biorreator de bancada de 5 L a 28°C, 0,5 vvm e rotação de 800 rpm, utilizando a linhagem de *S. clavuligerus* DSM 41826 e glicerol como fonte de carbono.

Aproximadamente a cada 4 h nas primeiras 24 h e depois a cada 6 h foram retiradas amostras de aproximadamente 20 mL para posteriores análises da reologia, massa seca, concentrações de substrato, concentração de lisina, ácido clavulânico e cefamicina C. Os ensaios tiveram duração de 72 h.

4.4.7 Etapa 5: Produção de cefamicina C em batelada alimentada utilizando diferentes fontes de carbono e condições de alimentação

Nesta etapa, foram realizados 15 cultivos em batelada alimentada, avaliando-se diferentes estratégias de alimentação como variar a vazão de alimentação (0,005 e 0,01 L.h⁻¹) e a concentração de fonte de carbono (glicerol e amido) no meio de cultura suplementar (Cs_e).

A alimentação teve início após 24 h de inoculação. Os cultivos em batelada alimentada foram finalizados com 120 h de experimento.

Baseando-se no número e no volume de amostras retiradas ao longo do cultivo e conhecendo-se a vazão volumétrica de alimentação de meio suplementar (F), foi calculado o volume inicial de caldo na etapa de batelada alimentada de modo que o volume final (em 120 h de cultivo) fosse igual a 4 L. As concentrações de alimentação (Cs_e) foram escolhidas considerando condição de estado quase estacionário ($r_s = F \cdot C_{s_e} / V$), fixando a vazão volumétrica (0,005 ou 0,01 L.h⁻¹) e baseado no consumo de substrato no final do cultivo em batelada. Foram realizados cultivos com concentrações de alimentação de 0,5, 1,0 e 1,5 vezes as concentrações obtidas nos cálculos, até se obter a melhor condição em termos de produção de CefC.

Esta etapa foi realizada em biorreator de bancada de 5 L a 28°C, 0,5 vvm e rotação de 800 rpm, utilizando a linhagem de *S. clavuligerus* DSM 41826.

Aproximadamente a cada 6 h foram retiradas amostras de aproximadamente 20 mL para posteriores análises da reologia, concentrações de substrato, concentração de lisina, ácido clavulânico e cefamicina C.

4.4.7.1 Influência da alimentação de glicerol na produção de cefamicina C

Foram realizados 9 cultivos em biorreator de bancada de 5 L. A suplementação foi realizada de maneira contínua com uma vazão volumétrica de alimentação (F) de 0.005 L.h⁻¹ e 0.01 L.h⁻¹ e concentração de glicerol no meio de alimentação variando de 40 a 300 g.L⁻¹.

As condições experimentais desses cultivos estão apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Condições de alimentação de glicerol nos cultivos em batelada alimentada

Cultivo	F (L.h ⁻¹)	Cs _e (g.L ⁻¹)
BA1	0,005	100,5
BA2	0,005	201,0
BA3	0,005	301,5
BA4	0,010	44,3
BA5	0,010	88,5
BA6	0,010	132,8
BA7	0,010	177,0
BA8	0,010	221,3
BA9	0,010	265,5

4.4.7.2 Influência da alimentação de amido na produção de cefamicina C

Foram realizados 6 cultivos em biorreator de bancada de 5 L. A suplementação foi realizada de maneira contínua com uma vazão volumétrica de alimentação de 0,005 L.h⁻¹ e 0,010 L.h⁻¹ e concentração de glicerol no meio de alimentação variando de 40 a 300 g.L⁻¹.

As condições experimentais desses cultivos estão apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Condições de alimentação de amido nos cultivos em batelada alimentada

Cultivo	F (L.h ⁻¹)	Cs _e (g.L ⁻¹)
BA10	0,005	100,5
BA11	0,005	201,0
BA12	0,005	301,5
BA13	0,01	44,3
BA14	0,01	88,5
BA15	0,01	132,8

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Etapa 1: Quantificação de cefamicina C

5.1.1 Teste de sensibilidade de *Escherichia coli* ESS

Foram realizados experimentos para verificar a sensibilidade da cepa frente aos compostos cefalosporina C, penicilina G e ácido clavulânico. Estes resultados estão apresentados na Figura 5.1.

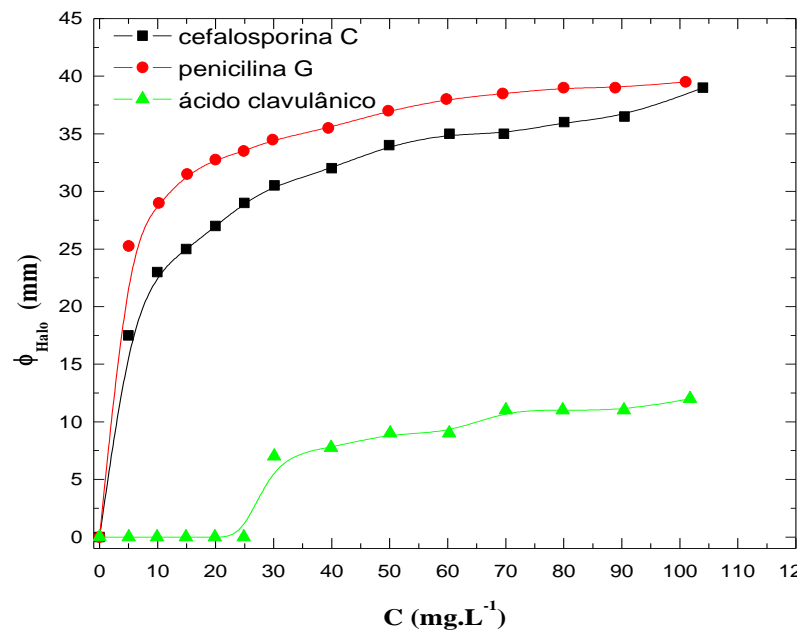


Figura 5.1: Diâmetro do halo de inibição (ϕ_{Halo}) em função da concentração para diferentes concentrações de antibióticos

Observa-se na Figura 5.1 que a linhagem de *E. coli* ESS apresentou mesmos níveis de sensibilidade à penicilina G e à cefalosporina C. Pode-se afirmar que somente não haverá interferência da penicilina N na quantificação de CefC se esse composto estiver no caldo de cultivo em baixas concentrações. Cabe ressaltar que em cultivos com níveis de oxigênio dissolvido elevados não há acúmulo de intermediários da rota de biossíntese de cefamicina C e, conseqüentemente, a concentração de penicilina N é baixa (ROLLINS *et al.*, 1988a). Quanto ao teste realizado com o ácido clavulânico, a bactéria teste não foi sensível a essa substância em concentrações inferiores a 30 mg.L^{-1} . Logo, como nos caldos de cultivo para a produção de CefC há também a presença de AC, a amostra deve ser diluída para que não haja interferência na análise pelo AC.

5.1.2 Influência das presenças de ácido clavulânico e de penicilina N na análise de cefamicina C

Nesta etapa, foram avaliadas as influências das condições de degradação de ácido clavulânico (hidrólise ácida a pH=3,0 e alcalina a pH=9,0) e de hidrólise de penicilina N por penicilinase, na análise de CefC presente em amostras de caldos de fermentação provenientes de cultivos em mesa incubadora rotativa.

Amostras retiradas em 72 e 120 h de cultivo foram centrifugadas e o sobrenadante distribuído em frascos de 20 mL.

Primeiramente, realizou-se a degradação do ácido clavulânico presente nas amostras provenientes do caldo de fermentação. Isto se fez necessário, pois o AC é um potente inibidor de β -lactamases, podendo assim interferir na atividade da penicilinase. Num frasco de amostra procedeu-se a degradação a pH 3,0, acidificada com solução de HCl 1M. Em outro frasco procedeu-se a degradação a pH 9,0, alcalinizada com solução de NaOH 1M.

Em intervalos de tempo, 2 mL da amostra foram neutralizados e a concentração de ácido clavulânico foi determinada. Quando ocorreu total degradação de ácido clavulânico, as amostras foram neutralizadas e submetidas a tratamento com penicilinase e a concentração de CefC foi determinada por bioensaio. A Figura 5.2 ilustra as concentrações de AC ao longo do tempo relativas às diferentes condições de degradação (ácida ou alcalina) e a Figura 5.3 ilustra as concentrações de CefC obtidas nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos realizados.

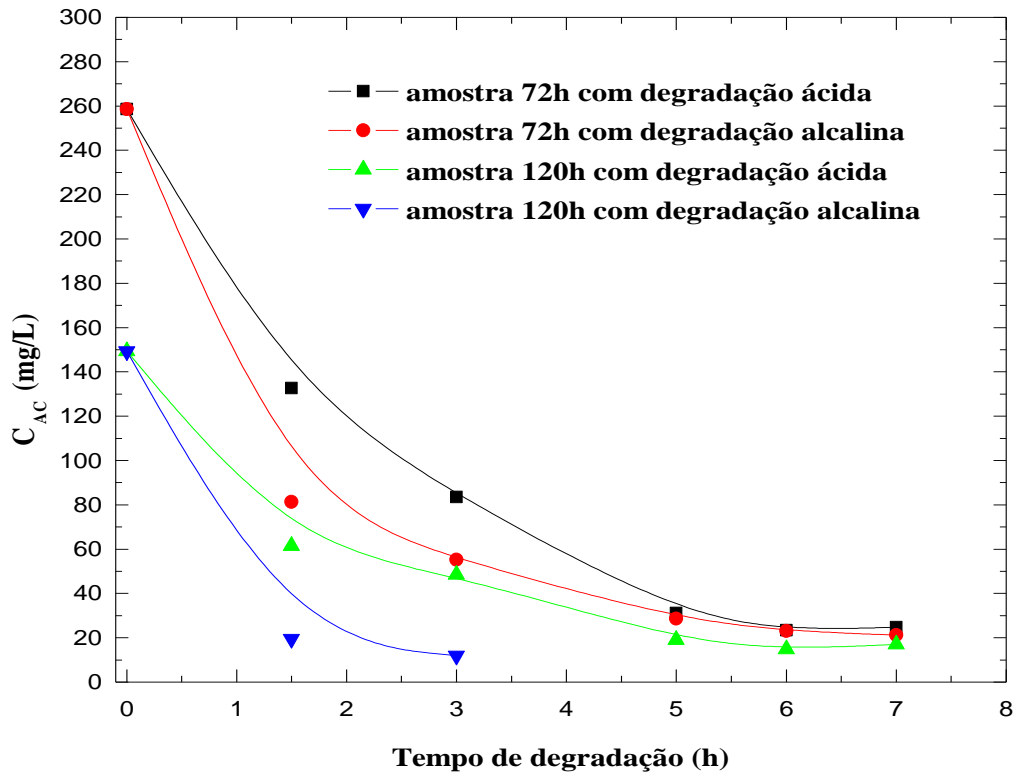


Figura 5.2: Degradação do ácido clavulânico – C_{AC} em função do tempo de hidrólise

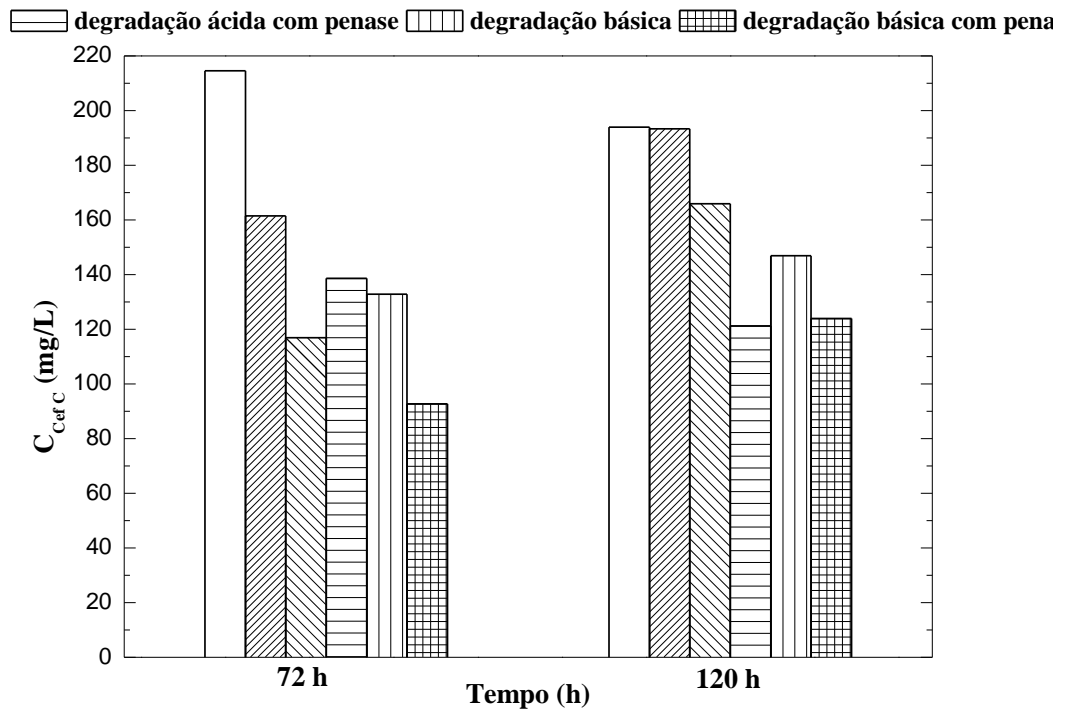


Figura 5.3: Concentrações de CefC obtidas após os diferentes tratamentos das amostras

Pode observar na Figura 5.2 que o ácido clavulânico é mais estável em pH ácido do que em básico, ocorrendo degradação total da amostra de 120 h de cultivo em apenas 1,5 h em pH alcalino.

Na Figura 5.3 observa-se que houve uma pequena degradação de cefamicina C quando as amostras foram submetidas a tratamentos com ácido e com base. Na amostra de 72 h sem tratamento, o ácido clavulânico não inibiu a penicilinase, não interferindo na análise, já que esta quando submetida ao tratamento com penicilinase teve sua concentração de CefC reduzida. Isto ocorreu provavelmente pela existência de penicilina N na amostra, também quantificada pelo bioensaio, sendo a mesma hidrolisada com a penicilinase. Já as amostras 120 h nas mesmas condições (amostras sem degradação do ácido clavulânico, sem e com penicilinase) apresentaram concentrações de CefC muito similares. Provavelmente a concentração de penicilina N nesta amostra é menor do que na amostra de 72h, ainda, com uma pequena inibição da penicilinase pelo ácido clavulânico não foi possível hidrolisar esta penicilina N.

Nas amostras em que ocorreram a degradações ácida e alcalina do ácido clavulânico mostraram uma redução na concentração de CefC quando submetidas a tratamento com penicilinase, mostrando que após a degradação do ácido clavulânico é possível hidrolisar a penicilina N presente nas amostras com penicilinase, quantificando assim somente a CefC. Observou-se o contrário na amostra de 72 h que foi degradada com ácido, mas pode notar que os valores de concentração de CefC desta amostra sem ou com penicilinase diferiram em apenas em 20 mg.L^{-1} o que está dentro do erro da análise. Cabe lembrar que as adições de ácido ou base degradaram sistematicamente a CefC presente nas amostras. Logo, nos ensaios subseqüentes procedeu-se o tratamento das amostras apenas com penicilinase, para que não ocorresse degradação da CefC pelos tratamentos ácido ou alcalino, lembrando que o fato de se diluir a amostra já assegura que o AC não interferiria no bioensaio.

5.2 Etapa 2: Avaliação de meios de cultura para a produção de cefamicina C

Primeiramente, foi realizado um cultivo em mesa incubadora rotativa utilizando o meio de cultura descrito por Park *et al.* (1994). Neste cultivo foi obtida uma produção de 160 mg.L^{-1} de CefC em 60 h. Foi observado que não houve controle do pH, chegando a um valor de 7,9 no final do cultivo, mesmo utilizando tampão MOPS na composição do meio de cultura. O alto valor de pH no final do cultivo pode ter degradado a

cefamicina C e prejudicado a análise dos resultados. Desta forma, definiu-se que todos os cultivos fossem realizados em biorreator de bancada, provido de sistemas de medição e controle de temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido, para que os resultados de produção não fossem mascarados.

Foram realizados 9 cultivos em biorreator de bancada de 5 L utilizando os diferentes meios de cultura descritos no item 4.4.4 e empregando a linhagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. A concentração de CefC foi determinada por bioensaio utilizando a linhagem *Escherichia coli* ESS. Os resultados em termos de consumo de substrato (C_s), índice de consistência do caldo (K) e produção de CefC estão apresentados nas Figuras 5.4, 5.5 e 5.6, respectivamente.

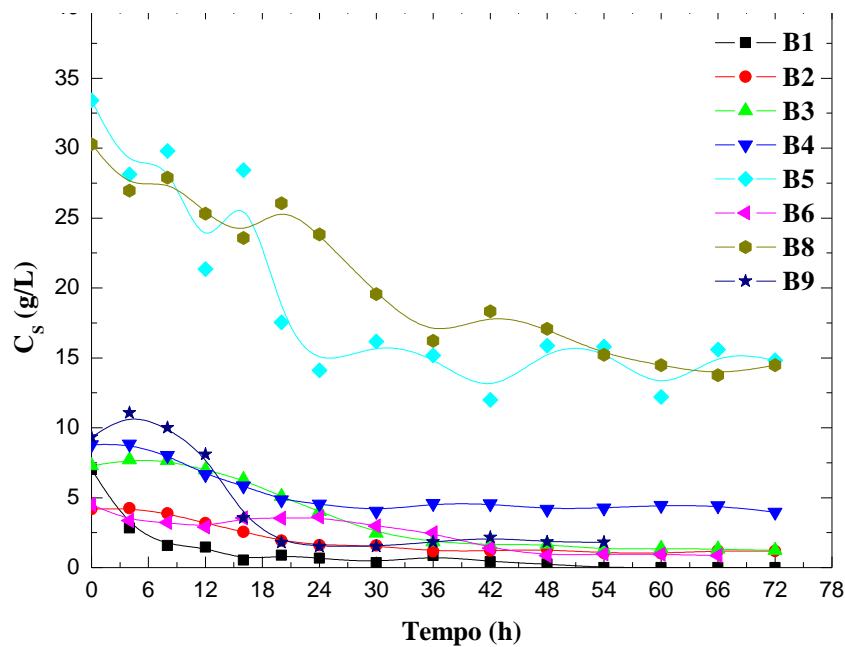


Figura 5.4: Consumo de fonte de carbono em função do tempo para os cultivos com diferentes meios de cultura de literatura

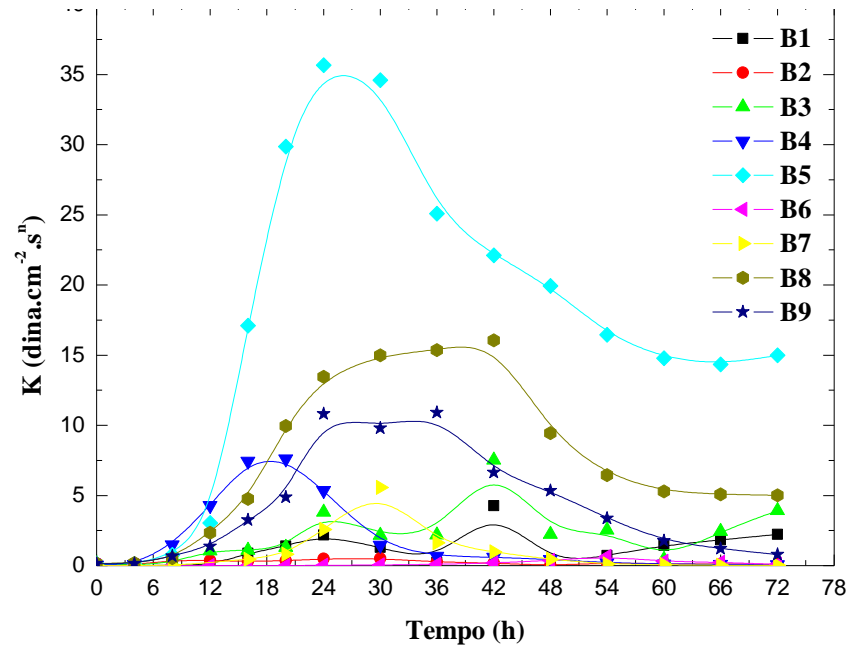


Figura 5.5: Índice de consistência do caldo em função do tempo para os cultivos com diferentes meios de cultura de literatura

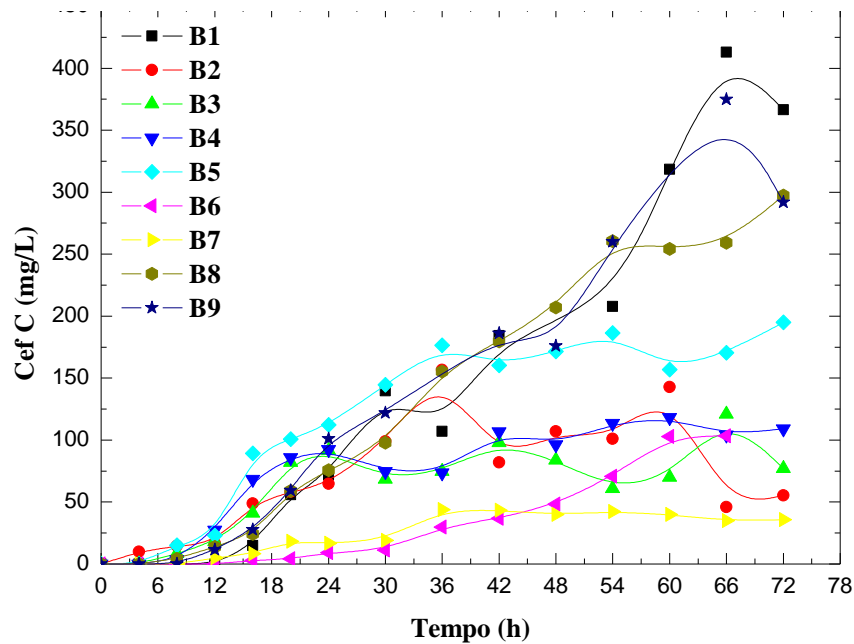


Figura 5.6: Curva de produção de CefC em função do tempo para os cultivos com diferentes meios de cultura de literatura

Observa-se na Figura 5.4 que houve consumo total do substrato somente no cultivo B1, no qual foi utilizado óleo de soja como fonte de carbono, sendo que o mesmo foi consumido totalmente em 48 horas de cultivo. No cultivo B7 onde a fonte de carbono utilizada foi também óleo de soja, não foi possível obter a curva de consumo de substrato

devido a problemas nas análises. Nos demais cultivos (B2 a B6, B8 e B9), onde a fonte de carbono utilizada foi o amido, não houve consumo total deste substrato. Possivelmente, a quebra do amido liberou glicose que foi contabilizada na análise e, como é conhecido da literatura que *Streptomyces clavuligerus* não é capaz de consumir glicose, houve acúmulo desta fonte de carbono ao final do cultivo. Cabe ressaltar que *Streptomyces clavuligerus* também não consome sacarose e que no cultivo B5 esta também foi contabilizada na análise de substrato.

Na Figura 5.5 observa-se que praticamente não houve crescimento celular nos cultivos B2 e B6, provavelmente devido à baixa concentração de fonte de carbono empregada nestes cultivos. Os cultivos B1, B3, B4 e B7 tiveram baixo crescimento celular com índice de consistência máximo do caldo em torno de $5,0 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$. Os cultivos B8 e B9 forneceram bom crescimento celular, com índice de consistência máximo de $16,1 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ em 42 h e $11,0 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ em 36 h, respectivamente. O maior crescimento celular foi observado no cultivo B5, com valor máximo do índice de consistência do caldo de $35,7 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ em 24 h. Cabe ressaltar que o cultivo B8 refere-se ao cultivo B5 com adição de lisina e tiosulfato de sódio, sendo este último reconhecido por afetar negativamente o crescimento celular. Por esta razão foi observado um crescimento celular menor no cultivo B8 em comparação ao B5.

Quanto a produção de CefC, o melhor resultado foi alcançado no cultivo B1 ($412,9 \text{ mg/L}$ em 66 h), como pode-se observar na Figura 5.6. No entanto, observa-se na Figura 5.5 que este cultivo apresentou um crescimento celular muito baixo. Diante dos resultados, escolheu-se para as próximas etapas do trabalho o meio de cultura B9 originalmente proposto por Antonio (2007), que apresentou uma boa produção de cefamicina C ($374,8 \text{ mg/L}$ em 66 h) aliada a um bom crescimento celular. Estes meios de cultura forneceram os melhores resultados pelo fato de conter lisina (precursor da cefamicina C) e tiosulfato que é a fonte que fornece o enxofre da molécula de cefamicina C. O baixo crescimento observado no cultivo B1 foi provavelmente devido ao fato do tiosulfato ser prejudicial à célula, por isso este é adicionado numa etapa de crescimento mais tardia (B9).

A Tabela 5.1 mostra uma comparação dos resultados de produção máxima cefamicina C ($C_{\text{CefC-max}}$) obtidos no presente trabalho, com aqueles obtidos na literatura pesquisada. Cabe lembrar que o microrganismo utilizado nesta etapa do trabalho foi a linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 e que na literatura pesquisada foram utilizadas diferentes linhagens de *Streptomyces clavuligerus*, selvagens e mutantes.

Tabela 5.1: Comparação dos resultados de produção máxima de CefC ($C_{CefC-max}$)

Literatura				Presente trabalho
Referência	$C_{CefC-max}$ ($mg.L^{-1}$)	Microrganismo	Escala	$C_{CefC-max}$ ($mg.L^{-1}$)
Park <i>et al.</i> (1994)	2 $g.L^{-1}$ 8 dias	<i>Streptomyces sp.</i> p6621 mutante	Biorreator 3 L	412,9 mg/L 66 h
Dévi e Sridhar (1999)	2 $g.L^{-1}$	<i>S. clavuligerus</i> LC 21 mutante	Shaker imobilizado	142,7 $mg.L^{-1}$ 60 h
Sarada e Sridhar (1998)	1,2 $g.L^{-1}$ 120 h	<i>S. clavuligerus</i> LC 21 mutante	Shaker 25 mL	120,8 $mg.L^{-1}$ 66 h
Rollins <i>et al.</i> (1988a)	300 $mg.L^{-1}$ 80 h	<i>S. clavuligerus</i> NRRL 3585	Biorreator 10 L	118,3 $mg.L^{-1}$ 60 h
Kamogashira <i>et al.</i> (1982)	2 $g.L^{-1}$ 90 h	<i>Streptomyces sp.</i> OFR 1022 mutante	Biorreator 30 L	194,9 $mg.L^{-1}$ 72 h
Aharonowitz <i>et al.</i> (1978)	180 $mg.L^{-1}$ 96 h	<i>S. clavuligerus</i> NRRL 3585	Shaker 50 mL	103,3 $mg.L^{-1}$ 66 h
Park <i>et al.</i> (1994) – meio sintético	524,5 $mg.L^{-1}$ 48 h	<i>Streptomyces sp.</i> p6621 mutante	Shaker	42,2 $mg.L^{-1}$ 54 h
Kamogashira <i>et al.</i> (1982) - modificado	2 $g.L^{-1}$ 90 h	<i>Streptomyces sp.</i> OFR 1022 mutante	Biorreator 30 L	297,4 $mg.L^{-1}$ 72 h
Antonio (2007)	490 $mg.L^{-1}$ 60 h	<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	Biorreator 4 L	374,8 mg/L 66 h

5.3 Etapa 3: Avaliação de fontes de carbono e nitrogênio na produção de cefamicina C

Com a finalidade de maximizar a produção de cefamicina C, foram realizados cultivos para a determinação da melhor fonte de carbono e nitrogênio para a produção de cefamicina C, utilizando como base o meio de cultura de B9 (ANTONIO, 2007) que foi o meio de cultura que forneceu um dos melhores resultados dentre os propostos na literatura.

Os cultivos foram realizados em mesa incubadora rotativa a 28°C e 300 rpm.

As Tabelas 5.2 e 5.3 apresentam as produções máximas de cefamicina C obtidas nos diferentes ensaios para as duas linhagens testadas.

Tabela 5.2: Concentração máxima de cefamicina obtida nos cultivos com *S. clavuligerus* ATCC 27064

Ensaio	Fonte de C (FC)	C _{FC} (g.L ⁻¹)	Fonte de N (FN)	C _{FN} (g.L ⁻¹)	CefC (mg.L ⁻¹)	t (h)
1	amido	10	farinha de semente de algodão	8,50	231,1	48
2	glicerol	10	farinha de semente de algodão	8,50	129,7	144
3	maltose	10	farinha de semente de algodão	8,50	116,6	72
4	óleo de soja	5,4	farinha de semente de algodão	8,50	81,7	72
5	maltose	10	proteína isolada de soja	5,75	213,6	144
6	óleo de soja	5,4	proteína isolada de soja	5,75	254,1	72
7	glicerol	10	proteína isolada de soja	5,75	260,0	144
8	amido	10	proteína isolada de soja	5,75	211,3	144
9	glicerol	10	farinha de soja	11,00	193,3	96
10	Amido	10	farinha de soja	11,00	212,8	144
11	óleo de soja	5,4	farinha de soja	11,00	223,8	72
12	maltose	10	farinha de soja	11,00	174,5	96
13	óleo de soja	5,4	Soytone®	8,50	144,2	72
14	maltose	10	Soytone®	8,50	185,8	144
15	amido	10	Soytone®	8,50	167,7	144
16	glicerol	10	Soytone®	8,50	117,3	144

Tabela 5.3: Concentração máxima de cefamicina obtida nos cultivos com *S. clavuligerus* DSM 41826

Ensaio	Fonte de C (FC)	C _{FC} (g.L ⁻¹)	Fonte de N (FN)	C _{FN} (g.L ⁻¹)	CefC (mg.L ⁻¹)	t (h)
1	amido	10	farinha de semente de algodão	8,50	112,2	144
2	glicerol	10	farinha de semente de algodão	8,50	121,2	144
3	maltose	10	farinha de semente de algodão	8,50	93,6	144
4	óleo de soja	5,4	farinha de semente de algodão	8,50	25,6	144
5	maltose	10	proteína isolada de soja	5,75	173,2	120
6	óleo de soja	5,4	proteína isolada de soja	5,75	220,4	120
7	glicerol	10	proteína isolada de soja	5,75	251,5	120
8	amido	10	proteína isolada de soja	5,75	256,6	120
9	glicerol	10	farinha de soja	11,00	244,5	120
10	Amido	10	farinha de soja	11,00	184,2	96
11	óleo de soja	5,4	farinha de soja	11,00	215,0	144
12	maltose	10	farinha de soja	11,00	98,8	120
13	óleo de soja	5,4	Soytone®	8,50	91,1	144
14	maltose	10	Soytone®	8,50	77,7	96
15	amido	10	Soytone®	8,50	72,9	120
16	glicerol	10	Soytone®	8,50	56,8	144

Observa-se na Tabelas 5.2 e 5.3 que em geral a linhagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 apresentou um melhor desempenho em relação à linhagem de *Streptomyces clavuligerus* DSM 41826, como também esta última apresentou uma produção mais lenta.

As Figuras 5.7 e 5.8 ilustram os gráficos de concentração máxima e produtividade volumétrica máxima de CefC obtidas nos diferentes ensaios para as duas linhagens testadas.

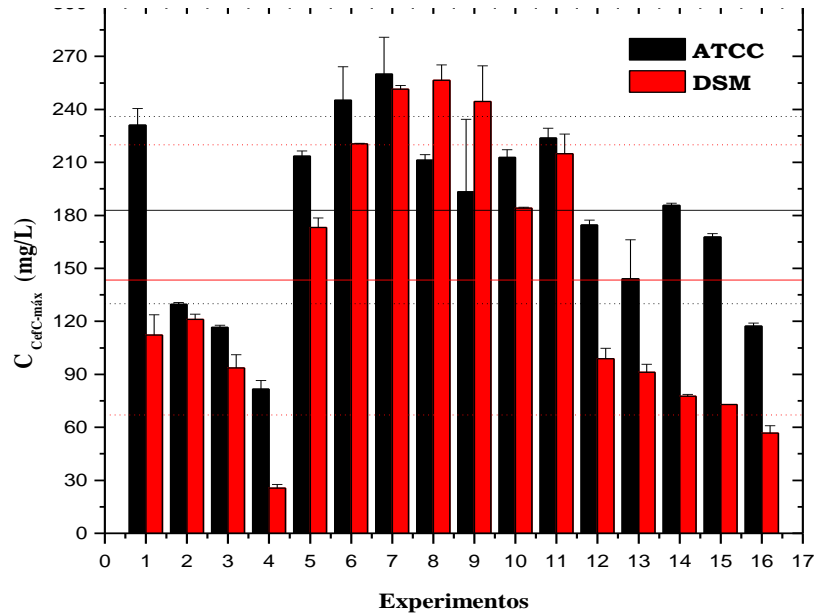


Figura 5.7: Produção máxima de CefC obtidas nos cultivos com diferentes fontes de C e N: (-) média para a linhagem ATCC 27064, (..) desvio padrão para a linhagem ATCC 27064, (-) média para a linhagem DSM 41826 (..) e desvio padrão para a linhagem DSM 41826

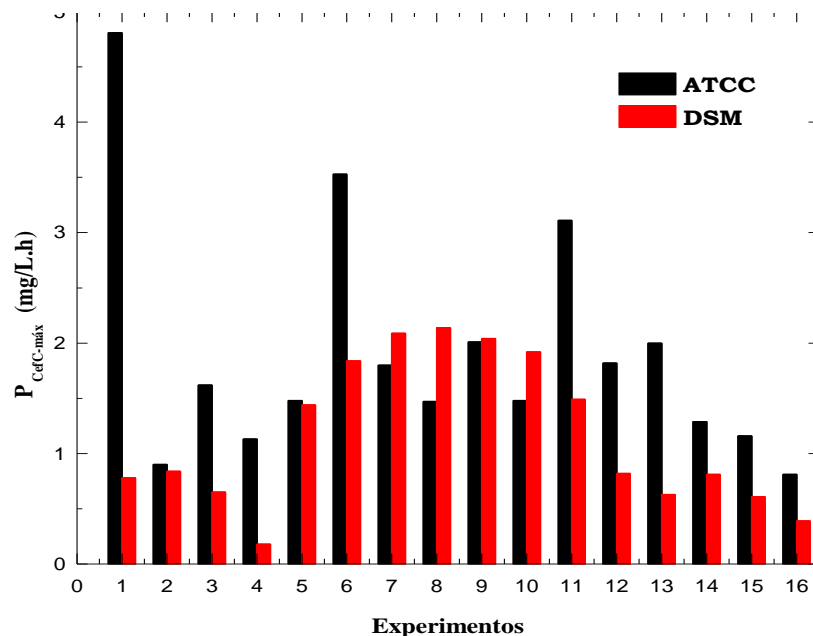


Figura 5.8: Resultados de produtividade máxima em CefC obtidas nos cultivos com diferentes fontes de C e N para as duas linhagens empregadas

Pela Figura 5.7 pode-se observar um melhor desempenho em termos de produção de CefC (valores acima da média mais o desvio padrão) quando se utilizou a linhagem de *S. clavuligerus* ATCC 27064 nos experimentos 1 (amido e farinha de semente de

algodão), 6 (óleo de soja e proteína isolada de soja) e 7 (glicerol e proteína isolada de soja). Quando se utilizou a linhagem de *S. clavuligerus* DSM 41826 alcançou-se o melhores resultados nos experimentos 6 (óleo de soja e proteína isolada de soja) e 7 (glicerol e proteína isolada de soja), 8 (amido e proteína isolada de soja), 9 (glicerol e farinha de soja) e 11 (óleo de soja e farinha de soja).

Em relação à produtividade pode observar pela Figura 5.8 que em geral, a linhagem de *S. clavuligerus* ATCC 27064 apresentou produtividades mais altas do que a linhagem de *S. clavuligerus* DSM 41826, com destaque para os experimentos 1 (amido e farinha de semente de algodão), 6 (óleo de soja e proteína isolada de soja) e 11 (óleo de soja e farinha de soja). Nos experimentos 7 (glicerol e proteína isolada de soja), 8 (amido e proteína isolada de soja), 9 (glicerol e farinha de soja) e 10 (amido e farinha de soja), a linhagem de *S. clavuligerus* DSM 41826 forneceu produtividades maiores que a linhagem de *S. clavuligerus* ATCC 27064.

Os experimentos nos quais foram alcançados melhores resultados em termos de concentração máxima de CefC ($C_{CefC-max}$) foram repetidos utilizando-se meio de cultura de inóculo igual ao meio de cultura de produção. Estes resultados estão ilustrados na Figura 5.9.

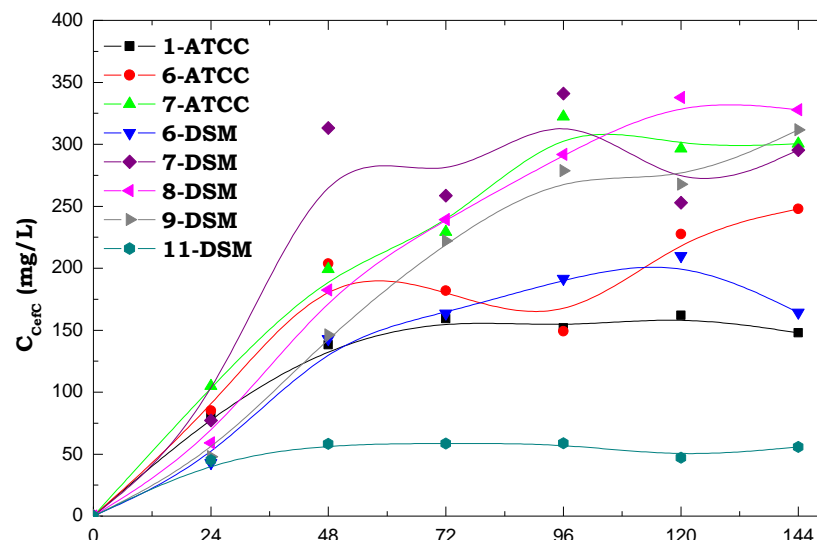


Figura 5.9: Concentração de cefamicina C em função do tempo para os cultivos com diferentes linhagens e meios de cultura

Pode observar pela Figura 5.9 que os melhores resultados obtidos em termos de produção de CefC foram alcançados no experimento 7 para a linhagem *S. clavuligerus* ATCC

27064, de 322 mg.L⁻¹ em 96 h, e nos experimentos 7, 8 e 9 para a linhagem *S. clavuligerus* DSM 41826, de 341 mg.L⁻¹ em 96 h, 338 mg.L⁻¹ em 120 h e 312 mg.L⁻¹ em 144 h, respectivamente. Todos os resultados em termos de produção de CefC foram superiores aqueles obtidos nos cultivos anteriores que utilizaram um meio de cultura de inóculo comum. Observa-se, portanto, que a utilização do meio de cultura principal como meio de preparo de inóculo favorece a produção, possivelmente devido à adaptação do microrganismo aos nutrientes presentes na composição do meio de cultura.

Embora a linhagem DSM 41826 seja indicada pela literatura como um mutante espontâneo da linhagem selvagem ATCC 27064 maior produtor de CefC (VINING *et al.*, 1987), observou-se que aos resultados de produção de CefC obtidos para as duas linhagens testadas não apresentaram grande diferença, indicando que a otimização das condições de cultivo são preponderantes na melhoria da produção de CefC.

Pode observar também que o glicerol mostrou-se bastante favorável como fonte de carbono na produção de cefamicina C (experimentos 7 e 9), cabendo ressaltar que o glicerol também favorece a produção de ácido clavulânico, outro importante metabólito secundário produzido por este microrganismo.

Com a finalidade de validar os resultados obtidos em mesa incubadora rotativa, os cultivos que tiveram os melhores desempenhos foram repetidos no biorreator de bancada de 5 L, quais sejam: experimento 7 (B10) para linhagem *S. clavuligerus* ATCC 27064: e experimentos 7 (B11), 8 (B12) e 9 (B13) para a linhagem *S. clavuligerus* DSM 41826. Os resultados em termos de produção de cefamicina C estão ilustrados na Figura 5.10.

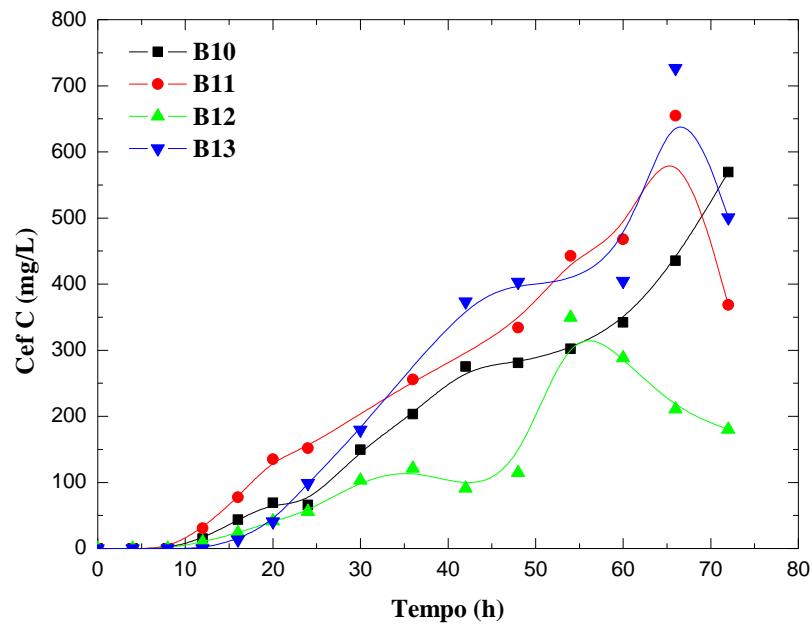


Figura 5.10: Produção de cefamicina C nos cultivos com o meio de cultura B10 (ATCC 27064), B11 (DSM 41826), B12 (DSM 41826) e B13 (DSM 41826) em biorreator

Observa-se na Figura 5.10 que nos cultivos B11 (glicerol como fonte de carbono e proteína isolada de soja como fonte de nitrogênio) e B13 (glicerol como fonte de carbono e farinha de soja como fonte de nitrogênio) com a linhagem *S. clavuligerus* DSM 4182 foram obtidos os melhores desempenhos com produções máximas de CefC de 654,5 mg.L⁻¹ em 66 h e 726,9 mg.L⁻¹ em 66 h, respectivamente.

Vining *et al.* (1987) testaram diversas fontes de carbono e nitrogênio para a produção de cefamicina C utilizando um “mutante espontâneo” de *Streptomyces clavuligerus* NRLL 3585, atual *S. clavuligerus* DSM 41826 em mesa incubadora rotativa, e obtiveram um máximo de produção 65 mg.L⁻¹ em 120 h quando utilizaram succinato como fonte de carbono e 142 mg.L⁻¹ em 60 h quando utilizaram “trypticase soy broth” (TSB) como fonte de nitrogênio. Pode-se observar no presente trabalho concentrações máximas de cefamicina C superiores às relatadas por Vining *et al.* (1987).

5.4 Etapa 4: Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio à base de soja

Com a finalidade de melhor entendimento quanto à influência da fonte de nitrogênio no processo de produção de CefC, foram realizados cultivos em biorreator de bancada com diferentes fontes de nitrogênio a base de soja: uma fonte de nitrogênio totalmente solúvel (Soytone®) (cultivo B14), com solubilidade mediana (proteína isolada de

soja) (cultivo B15) e uma fonte bastante insolúvel (farinha de soja) (cultivo B16). Cabe ressaltar que os cultivos B15 e B16 foram repetições dos cultivos B11 e B13 respectivamente.

As Figuras 5.11, 5.12 e 5.13 mostram os perfis do parâmetro K (índice de consistência do caldo), de concentração celular (C_x), de glicerol (C_s), de lisina (C_{lis}), de ácido clavulânico (AC) e de cefamicina C (Cef C) ao longo dos cultivos.

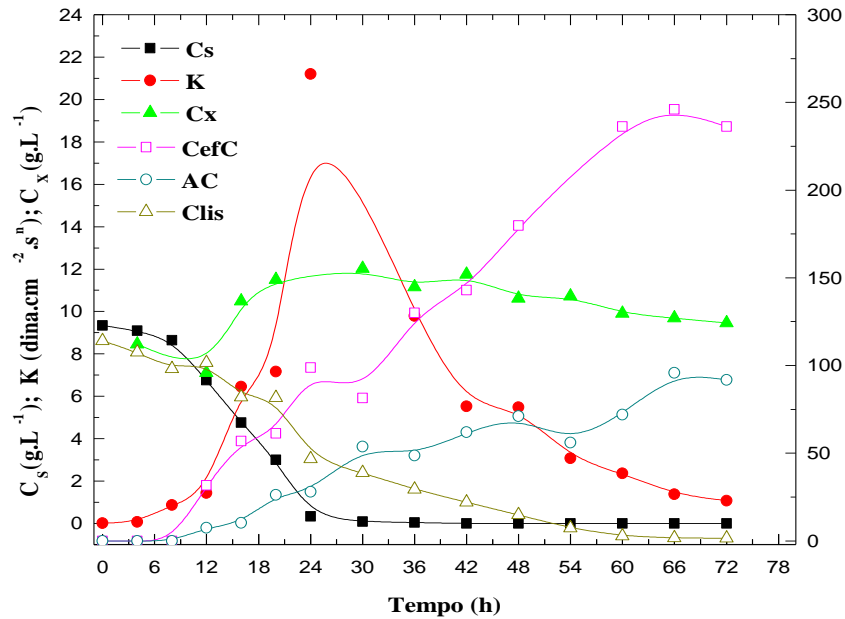


Figura 5.11: Perfis de K, C_x , C_s , C_{lis} , C_{AC} e de CefC ao longo do cultivo com Soytone® como fonte de nitrogênio (cultivo B14)

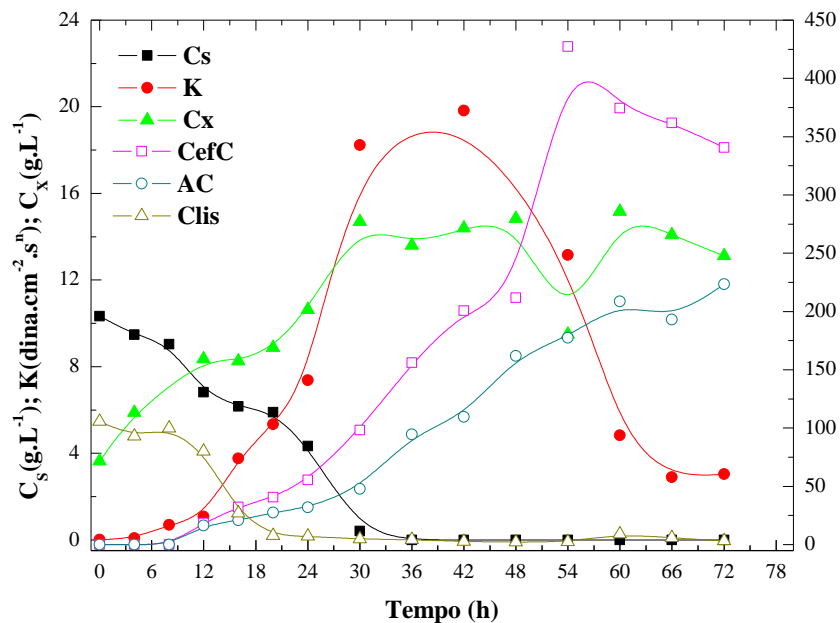


Figura 5.12: Perfis de K, C_x , C_s , C_{lis} , C_{AC} e de CefC ao longo do cultivo com proteína isolada de soja como fonte de nitrogênio (cultivo B15)

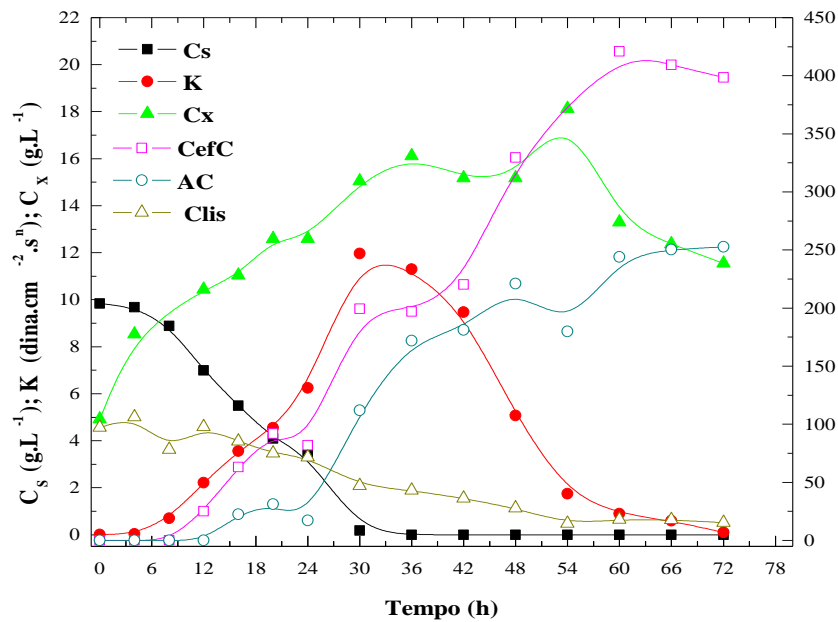


Figura 5.13: Perfis de K, C_X, C_S, C_{lis}, C_{AC} e de CefC ao longo do cultivo com farinha de soja como fonte de nitrogênio (cultivo B16)

Pelas Figuras 5.11, 5.12 e 5.13 pode-se observar que houve total consumo da fonte de carbono (glicerol), sendo que no cultivo B14 o consumo foi o mais rápido (24 h de cultivo). Pode-se observar também que a produção de CefC ainda estava aumentando quando o glicerol foi totalmente consumido, indicando que esta fonte de carbono não foi o substrato limitante para a produção. O índice de consistência do caldo (K) teve seu ponto máximo no momento em que o glicerol foi totalmente consumido, decaindo após esse tempo.

Observa-se ainda produção de ácido clavulânico nos 3 cultivos realizados, sendo menor no cultivo B14. A produção de CefC também foi inferior no cultivo B14, como observado na Figura 5.11. Nos cultivos B15 (proteína isolada de soja) e B16 (farinha de soja) ocorreram perfis de produção de cefamicina C e ácido clavulânico muito similares, indicando a preferência deste microrganismo por fontes de nitrogênio com graus de insolubilidade. Provavelmente, estas fontes de nitrogênio são disponibilizadas no meio de cultura mais lentamente, simulando assim uma batelada alimentada e evitando possíveis processos de inibição e repressão. Nota-se também que as produções de CefC nos cultivos B15 (427 mg.L⁻¹) e B16 (421 mg.L⁻¹) foram razoavelmente inferiores àquelas obtidas nos cultivos B11 (655 mg.L⁻¹) e B13 (727 mg.L⁻¹), utilizando os mesmos meios de cultura de produção. Isso se deve, provavelmente, à queda de produtividade da linhagem preservada em criotubos, fato comum que ocorre com a preservação de *S. clavuligerus*.

Quanto ao consumo de lisina, precursor da biossíntese de cefamicina C, pode-se observar que no cultivo B15 houve total consumo, já nos cultivos B14 e B16 o consumo de lisina foi mais lento. Deve-se salientar que com a adição de lisina no início dos cultivos, a mesma pode ser metabolizada como fonte de nitrogênio e como precursor da biossíntese de CefC, não sendo possível ponderar tal consumo.

5.5 Etapa 5: Cultivos em batelada alimentada

Primeiramente, foram realizados dois cultivos em batelada utilizando o meio de cultura do cultivo B16 que gerou os melhores resultados em termo de produção de CefC (item 5.4: Etapa 4). No intuito de se avaliar a melhor fonte de carbono a ser alimentada visando o aumento da produção de CefC, no primeiro cultivo em batelada foi utilizado glicerol e no segundo foi utilizado amido como fonte de carbono. Para fins comparativos com os demais cultivos em batelada alimentada, esses cultivos foram considerados como controles para cada fonte de C. Os resultados em termos de consumo de substrato (C_S), consumo de lisina (C_{lis}), índice de consistência do caldo (K), produção de ácido clavulânico (C_{AC}) e produção de cefamicina C (C_{CefC}) estão apresentados nas Figura 5.14 e 5.15.

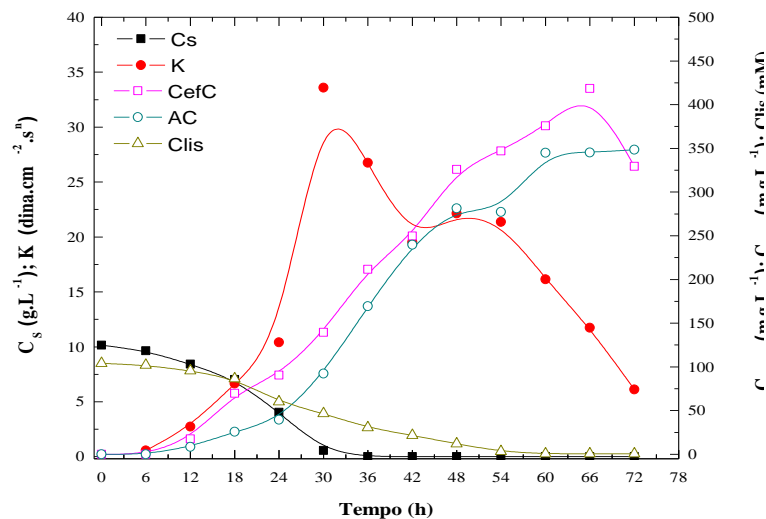


Figura 5.14: Perfis de K, C_X , C_S , C_{lis} , C_{AC} e de C_{CefC} ao longo do cultivo contendo glicerol como fonte de carbono

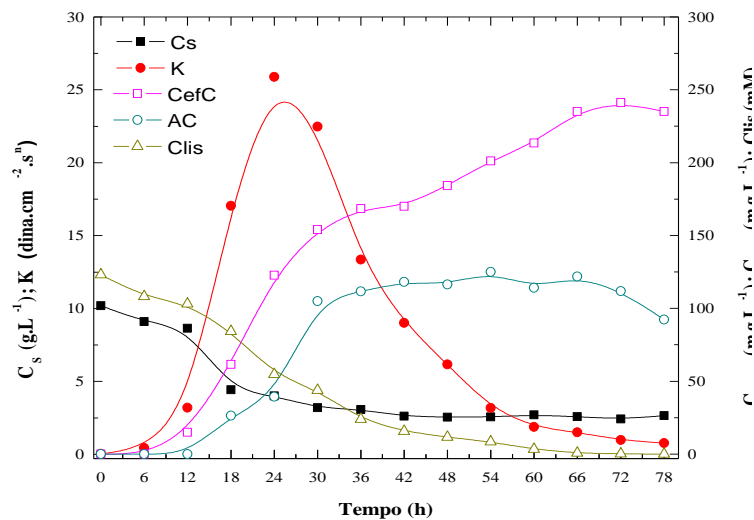


Figura 5.15: Perfis de K, C_X, C_S, C_{lis}, C_{AC} e de C_{CefC} ao longo do cultivo contendo amido como fonte de carbono

Observa-se na Figura 5.14 que houve consumo total de substrato (glicerol) em 30 h de cultivo, enquanto que no cultivo contendo amido como fonte de carbono (Figura 5.15) não houve total consumo deste substrato. Possivelmente, a quebra do amido liberou glicose que foi contabilizada na análise e como *S. clavuligerus* não é capaz de consumir glicose, houve acúmulo desta fonte de carbono ao final do cultivo.

Os dois cultivos forneceram bons crescimentos celulares, com índices de consistência máximos de 33,6 dina.cm⁻².sⁿ e 25,9 dina.cm⁻².sⁿ nos cultivos com glicerol e amido, respectivamente.

Quanto a produção de antibióticos, pode-se observar que no cultivo contendo glicerol os perfis de concentrações de CefC e AC foram bastante similares, com produções máximas de 418,5 mg.L⁻¹ de CefC e 348,5 mg.L⁻¹ de AC, respectivamente. No cultivo contendo amido como fonte de carbono, houve uma produção de CefC de 241,3 mg.L⁻¹ em 72 h que foi 2 vezes maior que a produção de AC (125,0 mg.L⁻¹ em 54 h).

Na procura por aumentar a produção de cefamicina C e dissociá-la da produção de ácido clavulânico foram realizados 15 cultivos em batelada alimentada com diferentes concentrações dos substratos glicerol e amido na alimentação (C_{S_e}) na faixa de 40 a 300 g.L⁻¹ e vazões de alimentação de 0,005 e 0,010 L.h⁻¹. As concentrações de alimentação foram calculadas considerando condição de estado quase estacionário ($r_s = F.C_{S_e}/V$), fixando a vazão volumétrica (0,005 L.h⁻¹ ou 0,01 L.h⁻¹) e baseado no consumo de substrato no final do cultivo em batelada. Tanto glicerol quanto o amido tiveram um consumo de substrato de 6 g.L⁻¹ em 24 h (Figuras 5.14 e 5.16), calculando uma velocidade de consumo de 0,25 g.L⁻¹.h⁻¹ e concentrações padrão de fontes de carbono (glicerol e amido) nos meios de cultura

suplementares de aproximadamente 200 e 90 g.L^{-1} para as vazões volumétricas de alimentação de 0,005 e 0,010 L.h^{-1} , iniciando os cultivos com volumes iniciais de 4 L e 3,5 L, respectivamente.

5.5.1 Influência da alimentação de glicerol na produção de cefamicina C

Na seqüência do trabalho foi avaliada a influência da adição de glicerol na produção de cefamicina C e ácido clavulânico em cultivos em batelada alimentada. A principal característica desse tipo de cultivo é minimizar os efeitos inibitórios e de repressão catabólica no meio de produção.

Foram realizados 9 cultivos em biorreator de bancada de 5 L. A suplementação foi realizada de maneira contínua com vazões volumétricas de alimentação de 0,005 e 0,010 L.h^{-1} e concentração de glicerol no meio de alimentação variando de 40 a 300 g.L^{-1} conforme descrito no item 4.4.7.1. Os resultados em termos de consumo de substrato (C_S), índice de consistência do caldo (K), produção de CefC (C_{CefC}) e de AC (C_{AC}) estão apresentados nas Figuras 5.16 a 5.19.

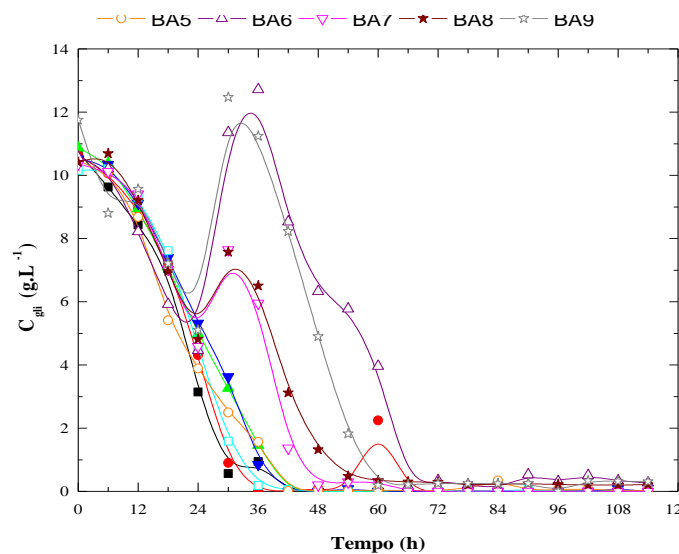


Figura 5.16: Consumo de glicerol em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada

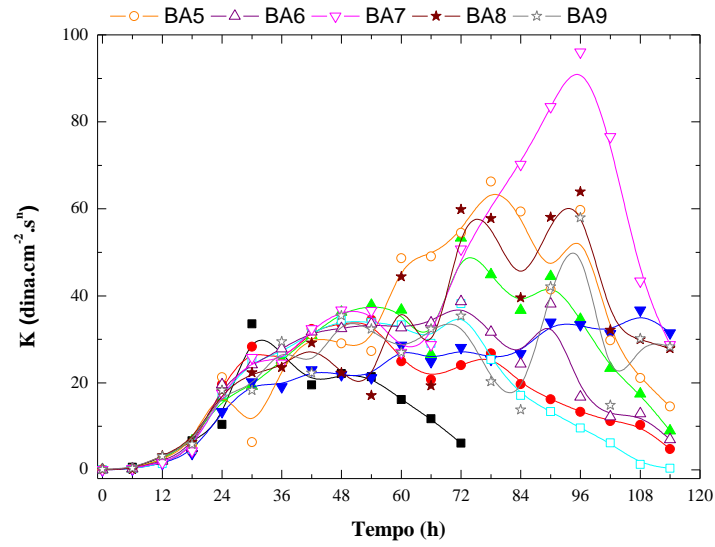


Figura 5.17: Índice de consistência dos caldos em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada contendo glicerol

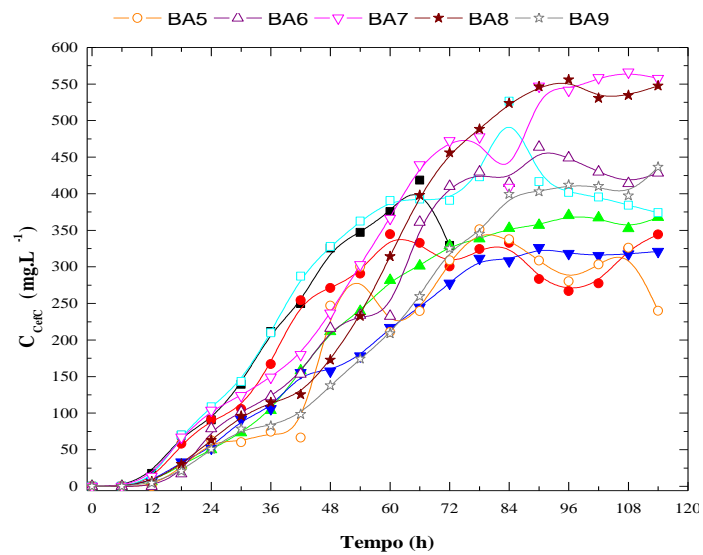


Figura 5.18: Curva de produção de CefC em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada contendo glicerol

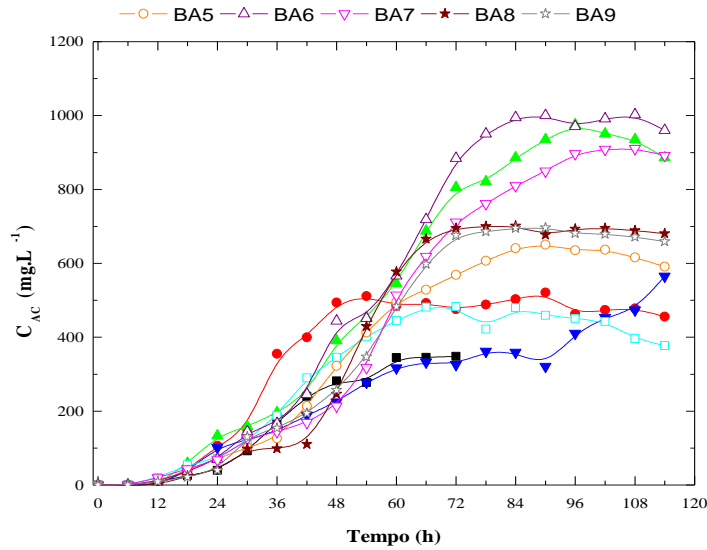


Figura 5.19: Curva de produção de AC em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada contendo glicerol

Observa-se na Figura 5.16 que nos cultivos BA6, BA7, BA8 e BA9 houve um acúmulo de glicerol após o início da alimentação (24 h) até aproximadamente 60 h de cultivo. Provavelmente, houve este acúmulo de fonte de carbono pelo fato de nestes cultivos, as vazões de alimentação e concentrações de alimentação terem sido maiores que nos demais cultivos. Nos cultivos BA1 a BA5, o glicerol foi totalmente consumido em aproximadamente 36 h de cultivo, mantendo-se em aproximadamente zero ao longo dos cultivos.

Na Figura 5.17 pode se observar um bom crescimento celular em todos os cultivos. O maior crescimento celular foi observado no cultivo BA7, com valor máximo do índice de consistência do caldo de $96,0 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ em 96 h, um dos maiores já observados em cultivos de *S. clavuligerus*. Nos cultivos BA5 e BA8 tiveram um crescimento celular bastante similar, com valor máximo do índice de consistência do caldo de $66,3 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ em 78 h e $63,9 \text{ dina.cm}^{-2}.\text{s}^n$ em 96 h, respectivamente.

Quanto a produção de CefC, os melhores resultados foram alcançados nos cultivos BA7 (567 mg.L^{-1} em 108 h) e BA8 (556 mg.L^{-1} em 72 h). Ainda, estes cultivos foram os únicos que superaram o cultivo controle (419 mg.L^{-1} em 72 h) como pode-se observar na Figura 5.21.

Pela Figura 5.18 observa-se produções de AC bastante altas, tendo alcançado um valor máximo de $1002,6 \text{ mg.L}^{-1}$ em 108 h no cultivo BA6. Em todos os cultivos em batelada alimentada a produção de AC superou a produção obtida no cultivo controle. Os altos resultados alcançados de produção de ácido clavulânico nos cultivos em batelada alimentada com glicerol se deve ao fato que na rota biossintética do AC, o glicerol pode ser

convertido em D-gliceraldeído-3-P, o precursor direto do ácido clavulânico (LIRAS e RODRIGUES-GARCIA, 2000).

Teodoro et al. (2006) alcançaram uma produção de 1,6 g/L de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em batelada alimentada com glicerol a uma vazão volumétrica de 0,01 L.h⁻¹ e concentração na alimentação de 120 g.L⁻¹.

5.5.2 Influência da alimentação de amido na produção de cefamicina C

Foram realizados 6 cultivos em batelada alimentada contendo amido como fonte de carbono. A suplementação foi realizada de maneira contínua com vazões volumétricas de alimentação de 0,005 e 0,010 L.h⁻¹ e concentração de amido no meio de alimentação variando de 40 a 300 g.L⁻¹ conforme descrito no item 4.4.7.2. Os resultados em termos de consumo de substrato (C_S), índice de consistência do caldo (K), produção de CefC (C_{CefC}) e produção de AC (C_{AC}) estão apresentados na Figura 5.20 a 5.23, respectivamente.

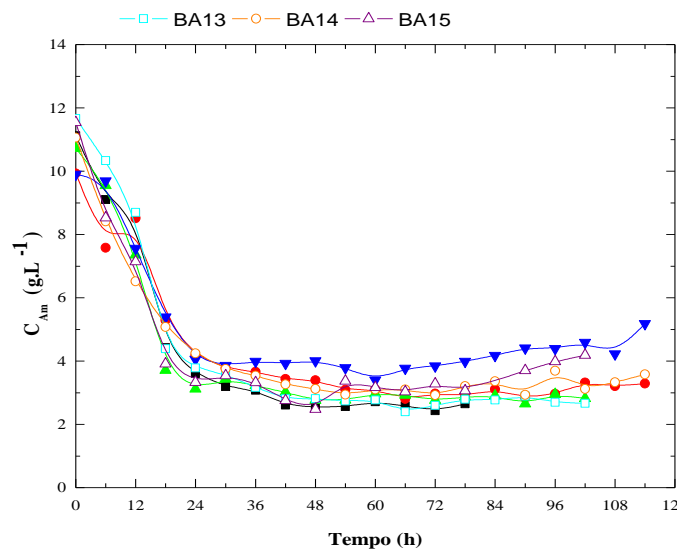


Figura 5.20: Concentração de amido em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada

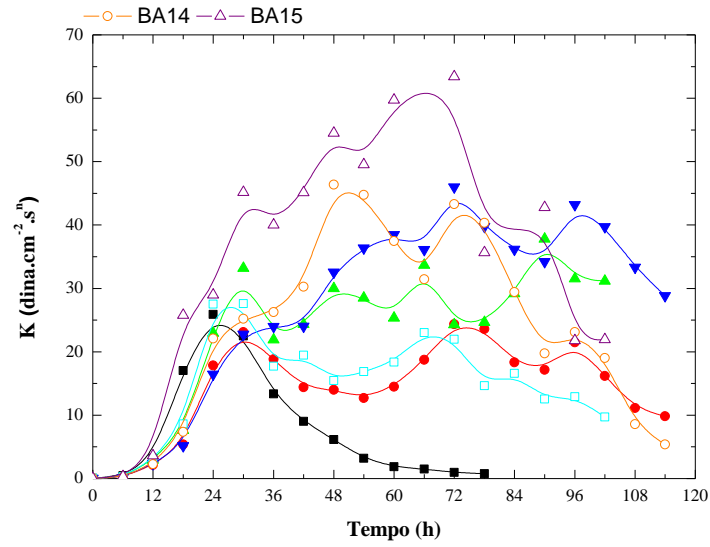


Figura 5.21: Índice de consistência do caldo em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada contendo amido

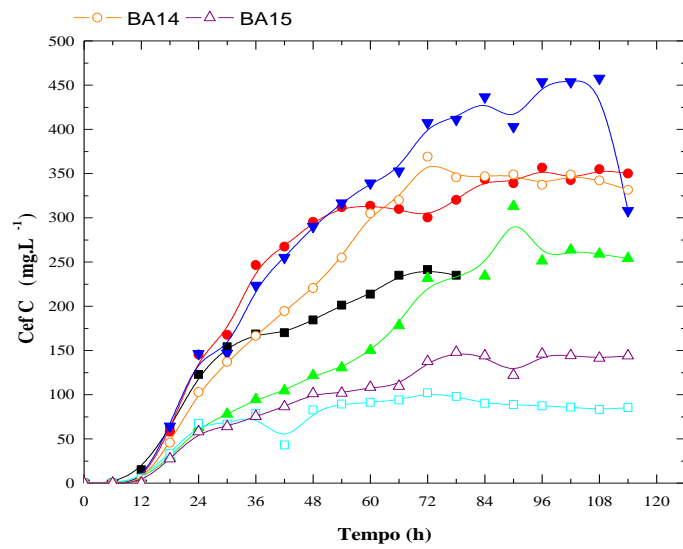


Figura 5.22: Curva de concentração de CefC em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada contendo amido

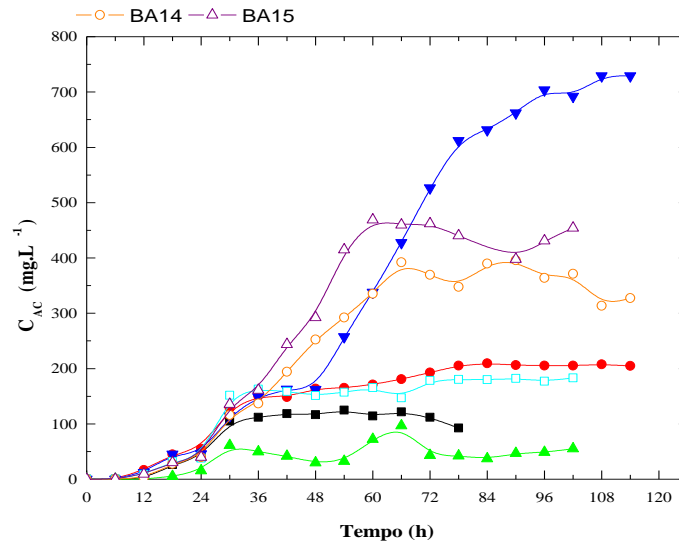


Figura 5.23: Curva de concentração de AC em função do tempo para os cultivos em batelada alimentada contendo amido

Observa-se na Figura 5.20 que não houve total consumo de amido em todos os cultivos. A hidrólise do amido libera moléculas glicose que não são consumidas por *Streptomyces clavuligerus*, mas como a análise utilizada para quantificar amido foi a de açúcar redutor e sendo a glicose um açúcar redutor, esta é contabilizada na análise.

Na Figura 5.21 observa-se um bom crescimento celular em todos os cultivos, mas menor do que nos cultivos contendo glicerol como fonte de carbono. O maior crescimento celular foi observado no cultivo BA15, com valor máximo do índice de consistência do caldo de 63,4 dina.cm⁻².sⁿ em 72 h. Os cultivos BA10 e BA13 foram os que tiveram menores crescimentos celulares, com valor máximo do índice de consistência do caldo de 24,4 dina.cm⁻².sⁿ em 72 h e 23,3 dina.cm⁻².sⁿ em 66 h, respectivamente.

Quanto a produção de CefC, o melhor resultado foi alcançado no cultivo BA12 (478 mg.L⁻¹ em 108 h). Os cultivos BA13 e BA15 forneceram resultados em relação a produção de CefC bastante baixos, inferiores ao cultivo controle, com produções máximas de 102 mg.L⁻¹ em 72 h e 148 mg.L⁻¹ em 78 h, respectivamente, como pode-se observar na Figura 5.22.

Pode-se observar na Figura 5.23 que o cultivo BA12 forneceu a maior produção de AC (729 mg.L⁻¹ em 114 h) que foi mais alta que a produção de CefC. Somente o cultivo BA11 forneceu uma produção de AC inferior ao cultivo controle (97 mg.L⁻¹ em 66 h).

Romero *et al.* (1984) observaram que na ausência de glicerol como fonte de carbono não ocorreu a produção de ácido clavulânico, mostrando que nestas condições a biossíntese da cefamicina C foi dissociada da biossíntese de AC. Os autores relataram que o

glicerol é indispensável para a biossíntese de ácido clavulânico. No presente trabalho, não foi observado esse comportamento, pois nos cultivos contendo amido como fonte de carbono (ausência de glicerol) foram detectadas altas produções de ácido clavulânico, contrariando a literatura.

5.5.3 Comparação entre as produções de AC e CefC em relação às fontes de carbono

Os cultivos em batelada alimentada realizados em diferentes condições de alimentação e com diferentes fontes de carbono tiveram o intuito de aumentar a produção de CefC e avaliar a dissociação entre as produções de CefC e AC, produzidos por rotas paralelas. As Figuras 5.24 e 5.25 ilustram os gráficos de concentração máxima e produtividade volumétrica máxima de CefC e AC obtidas nos ensaios.

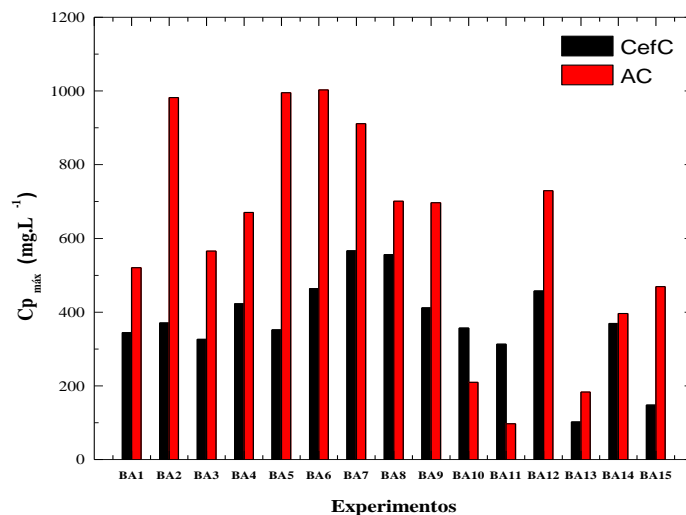


Figura 5.24: Concentrações máximas de CefC e AC obtidas nos diferentes cultivos

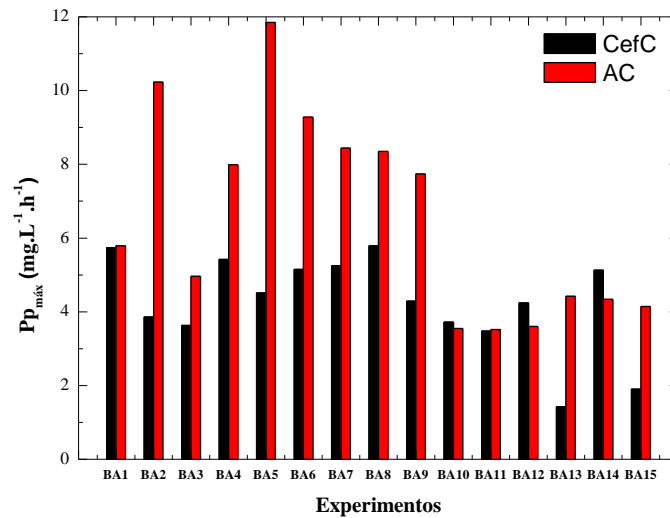


Figura 5.25: Produtividade em CefC e AC obtidas nos diferentes cultivos

Na Figura 5.24 pode-se observar maiores produções de CefC em relação à produção de AC somente nos cultivos BA10 e BA11, ambos alimentados com amido à uma vazão volumétrica de $0,005 \text{ L.h}^{-1}$. Embora nesses cultivos as produções de CefC tenham sido superiores à produção de AC, não foram as condições que forneceram os melhores resultados em termos de produção de CefC. Nos demais cultivos, a estratégia de batelada alimentada favoreceu a produção de ácido clavulânico.

Em relação à produtividade volumétrica máxima, apenas nos cultivos BA12 e BA14 a produtividade em CefC foi superior à de AC, no entanto as diferenças foram pequenas.

As Figuras 5.26a, 5.26b, 5.27a e 5.27b ilustram os gráficos de concentrações máximas de CefC e de AC, ambas representadas por $C_{p_{\max}}$, em função do produto $F.Cs_e$ para os cultivos contendo glicerol e amido alimentados nas vazões de $0,005 \text{ L.h}^{-1}$ e $0,010 \text{ L.h}^{-1}$, respectivamente.

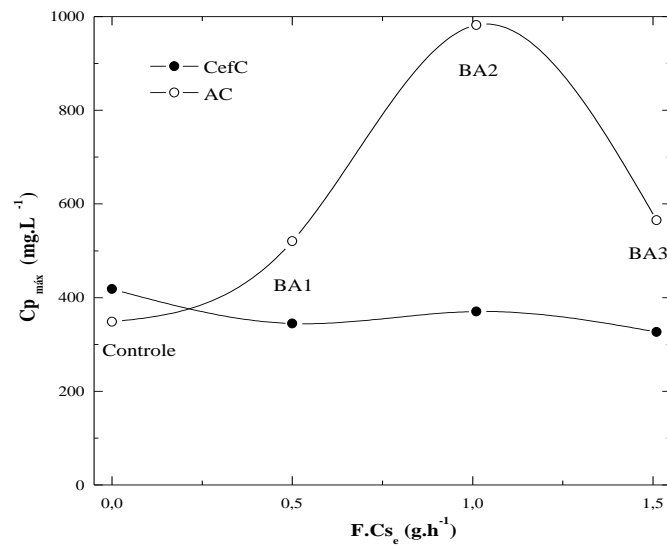


Figura 5.26a: Concentrações máximas de CefC e AC em função do produto $F.Cs_e$ para os cultivos em batelada alimentada com glicerol a vazão de $0,005 \text{ L.h}^{-1}$

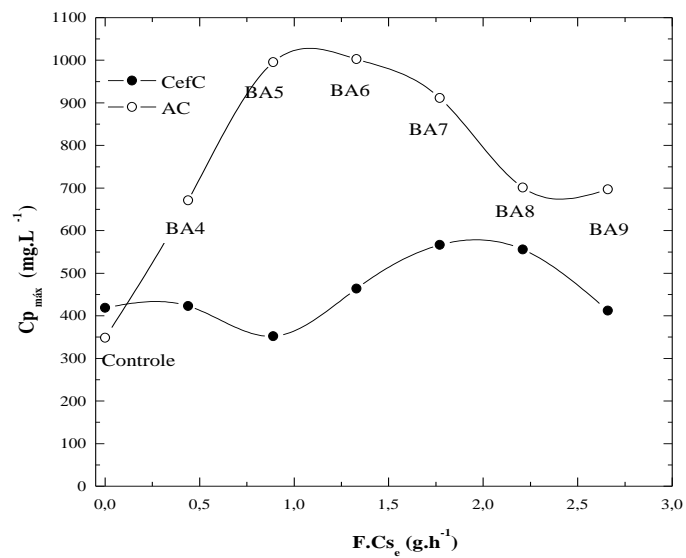


Figura 5.26b: Concentrações máximas de CefC e AC em função do produto $F.Cs_e$ para os cultivos em batelada alimentada com glicerol a vazão de $0,010 \text{ L.h}^{-1}$

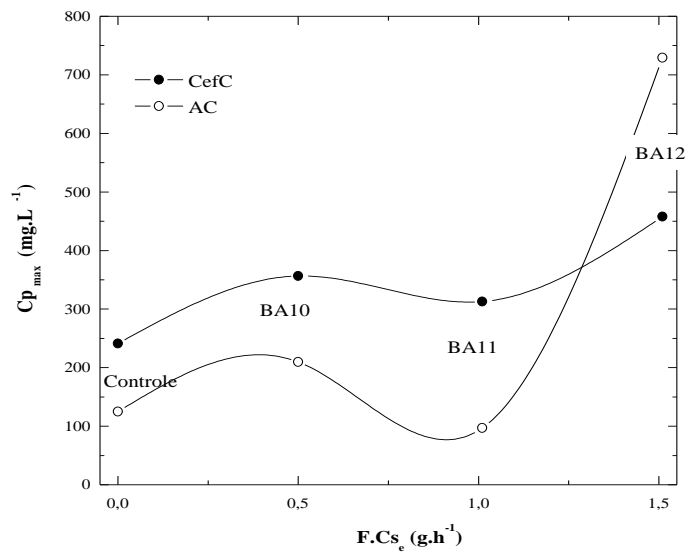


Figura 5.27a: Concentrações máximas de CefC e AC em função do produto $F.Cs_e$ para os cultivos em batelada alimentada com amido a vazão de $0,005 \text{ L.h}^{-1}$

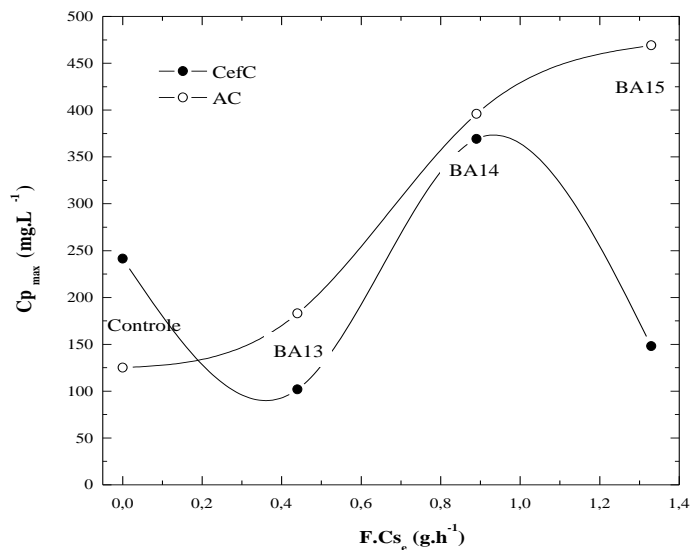


Figura 5.27b: Concentrações máximas de CefC e AC em função do produto $F.Cs_e$ para os cultivos em batelada alimentada com amido a vazão de $0,010 \text{ L.h}^{-1}$

Na Figura 5.26a, onde o cultivo foi alimentado com glicerol a uma vazão volumétrica de $0,005 \text{ L.h}^{-1}$ o pico de produção de CefC coincidiu com o pico de produção de ácido clavulânico. Quando a alimentação foi realizada com amido nas mesmas condições ($F=0,005 \text{ L.h}^{-1}$) houve uma alta produção de AC quando o produto $F.Cs_e$ foi de $1,5 \text{ g.h}^{-1}$, enquanto que a produção de CefC nestas condições (amido alimentado à uma vazão de $0,005$

L.h⁻¹) não sofreu muita alteração em toda a faixa de concentração de amido na alimentação empregadas, não apresentando, portanto, um ponto de máximo de produção.

As produções máximas de CefC foram obtidas nos cultivos alimentados com glicerol com uma vazão de 0,010 L.h⁻¹, quando o produto F.Cs_e foi de 1,77 g.h⁻¹. No entanto, as produções de AC nessas condições foram bastante altas. Cabe salientar que o glicerol é um precursor da biossíntese do ácido clavulânico, não sendo possível nas condições experimentais empregadas dissociar as produções de CefC e AC.

Apenas na condição de alimentação com amido à vazão de 0,005 L.h⁻¹ foi observado que a produção de AC foi menor que a de CefC, exceto na condição onde a concentração de alimentação utilizada foi a mais alta (Cs_e=301,5 g.L⁻¹).

A Tabela 5.4 resume os resultados alcançados nos cultivos em batelada alimentada com glicerol e amido. Nessa tabela, foram calculadas as relações ($C_{\text{CefC-max}}/C_{\text{AC-max}}$) e ($\frac{C_{\text{CefC-max}}/C_{\text{CefC-c}}}{C_{\text{AC-max}}/C_{\text{AC-c}}}$) na tentativa de se estabelecer um índice de dissociação entre as produções de CefC e AC.

Tabela 5.4. Principais resultados obtidos nos cultivos em batelada alimentada

Ensaio	Fonte de C	F (L.h ⁻¹)	Cs _e (g.L ⁻¹)	C _{CefC-max} (mg.L ⁻¹)	C _{AC-max} (mg.L ⁻¹)	$\frac{C_{\text{CefC-max}}}{C_{\text{AC-max}}}$	$\frac{C_{\text{CefC-max}}/C_{\text{CefC-c}}}{C_{\text{AC-max}}/C_{\text{AC-c}}}$ *
BA1	Glicerol	0,005	100,5	345	521	0,66	0,55
BA2	Glicerol	0,005	201,0	370	982	0,38	0,31
BA3	Glicerol	0,005	301,5	327	566	0,58	0,48
BA4	Glicerol	0,010	44,25	423	671	0,63	0,53
BA5	Glicerol	0,010	88,5	352	995	0,35	0,29
BA6	Glicerol	0,010	132,75	464	1003	0,46	0,39
BA7	Glicerol	0,010	177	566	911	0,62	0,52
BA8	Glicerol	0,010	221,25	556	701	0,79	0,66
BA9	Glicerol	0,010	265,5	412	697	0,59	0,49
BA10	Amido	0,005	100,5	357	210	1,70	0,88
BA11	Amido	0,005	201,0	313	97	3,23	1,67
BA12	Amido	0,005	301,5	458	730	0,63	0,33
BA13	Amido	0,010	44,25	102	183	0,56	0,29
BA14	Amido	0,010	88,5	369	396	0,93	0,48
BA15	Amido	0,010	132,75	148	469	0,32	0,16

* C_{CefC-c} e C_{AC-c} referem-se às produções máximas de CefC e AC obtidas nos cultivos controles

Observa-se pelos resultados da Tabela 5.4 que apenas nos cultivos BA11 e BA15 as produções de CefC se dissociaram das produções de AC. No cultivo BA11, com alimentação de amido à vazão volumétrica de 0,005 L.h⁻¹ e concentração de 201 g.L⁻¹, a

produção de ácido clavulânico foi inferior à produção de CefC, enquanto que no cultivo BA15 ocorreu o contrário, obtendo-se uma produção de CefC bastante inferior em relação aos demais cultivos. Nesses dois cultivos, os valores do produto F.Cse foram bem próximos, mas os resultados obtidos bem diferentes, não sendo possível visualizar uma tendência nas condições empregadas que caracterizasse a dissociação da produção de ácido clavulânico e de CefC.

Nos cultivos com alimentação com glicerol, a condição empregada que melhor dissociou as produções de AC e CefC foi a empregada no cultivo BA5. No entanto, observa-se nesse cultivo a segunda maior produção obtida de AC. Independentemente das condições experimentais empregadas, as produções de AC nos cultivos em batelada alimentada contendo glicerol foram bastante altas, em virtude do papel dessa fonte de C como precursor da molécula de AC.

Nos demais cultivos pode-se observar que as condições experimentais que forneceram melhores desempenhos em relação à produção de CefC, também foram os melhores para a produção de AC, não sendo possível a dissociação da produção desses antibióticos.

Romero *et al.*, (1984) relatam que as produções de ácido clavulânico e cefamicina C podem ser dissociadas sob condições apropriadas, observaram que na ausência de glicerol não há produção de ácido clavulânico e na ausência de sulfato não há produção de cefamicina C. No entanto, sob as condições de cultivos testadas nesse trabalho utilizando glicerol e amido como fontes de carbono em condições de não limitação por falta de oxigênio, não foi possível visualizar uma tendência em relação às condições empregadas (fonte de C e condições de alimentação) que caracterizasse a dissociação entre as produções de ácido clavulânico e de cefamicina C.

Em todos os cultivos realizados em batelada alimentada, a produção de CefC foi maior nos cultivos contendo glicerol do que nos cultivos contendo amido, contrariando a literatura que relata que o amido é uma boa fonte de carbono para a produção de CefC. O amido pode ser parcial ou totalmente hidrolisado no caldo de cultivo. Caso seja liberada glicose nessa hidrólise a mesma não é assimilada por *S. clavuligerus* (PRUESS e KELLETT, 1983). Caso o amido seja quebrado em partes maiores desde moléculas de maltose até oligossacarídeos, o mesmo é assimilado por *S. clavuligerus*. Essas glicanas são hidrolisadas e transformadas em glicose-6-fosfato pela ação das enzimas amido fosforilase e fosfoglicomutase e a glicose-6-fosfato é então convertida em 2 moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (Figura 5.28a). Nessa etapa ocorre o consumo de 2 moléculas de ATP. As 2 moléculas

de gliceraldeído-3-fosfato são convertidas em 2 moléculas de piruvato ocorrendo a liberação de 4 moléculas de ATP (Figura 5.28b). Em termos energéticos, o resultado líquido dessa etapa é a geração de 2 moléculas de ATP e 2 NaDH. Quando glicerol é utilizado como fonte de carbono no processo de produção de cefamicina, o mesmo é convertido a 1 molécula de gliceraldeído-3-fosfato ocorrendo o consumo de 1 molécula de ATP e 2 NaDH (Figura 5.29). Massas de glicerol e amido iguais geram uma mesma quantidade de ATPs como pode ser observado pelas estequiometrias (Figura 5.30). Uma vez que a massa molar da glicose é o dobro da de glicerol, a diferença entre as estequiometrias é a geração de 2 NaDH no glicerol. No entanto, ma biossíntese de cefamicina C não é necessário NaDH. Estas considerações se baseiam no fato que todo amido vai ser hidrolisado produzindo glicose, do ponto de vista intercelular isto é plausível. No entanto, no caso de hidrólise extracelular gerando moléculas de glicose, estas não são consumidas por *Streptomyces clavuligerus*. Por essa razão em todos os cultivos observou-se uma quantidade residual de glicose. Portanto, diferentemente do glicerol nem todo amido foi consumido.

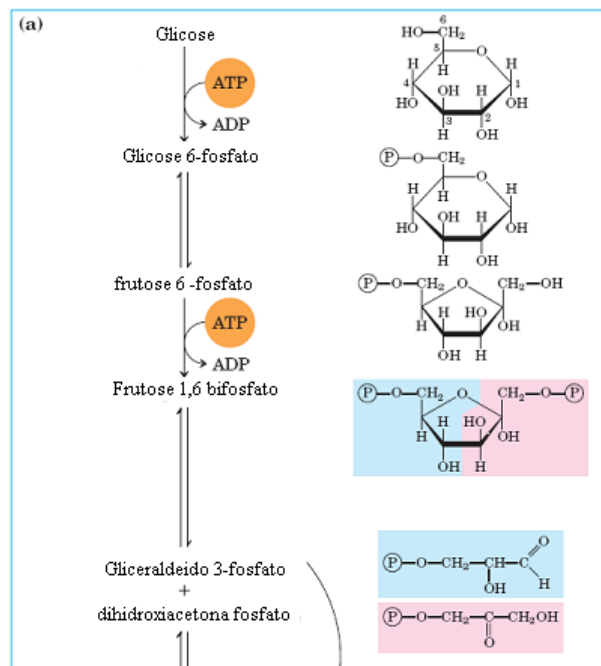


Figura 5.28a: Fosforilação da glicose e sua conversão à gliceraldeído 3-fosfato

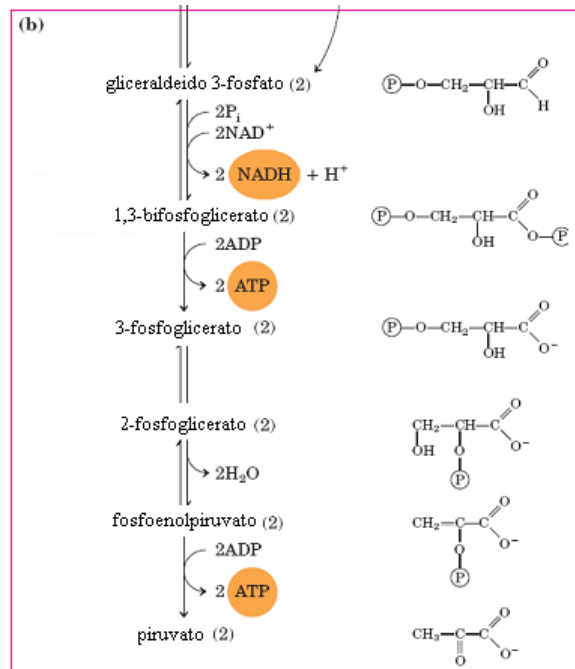


Figura 5.28b: Conversão oxidativa do gliceraldeído 3-fosfato à piruvato

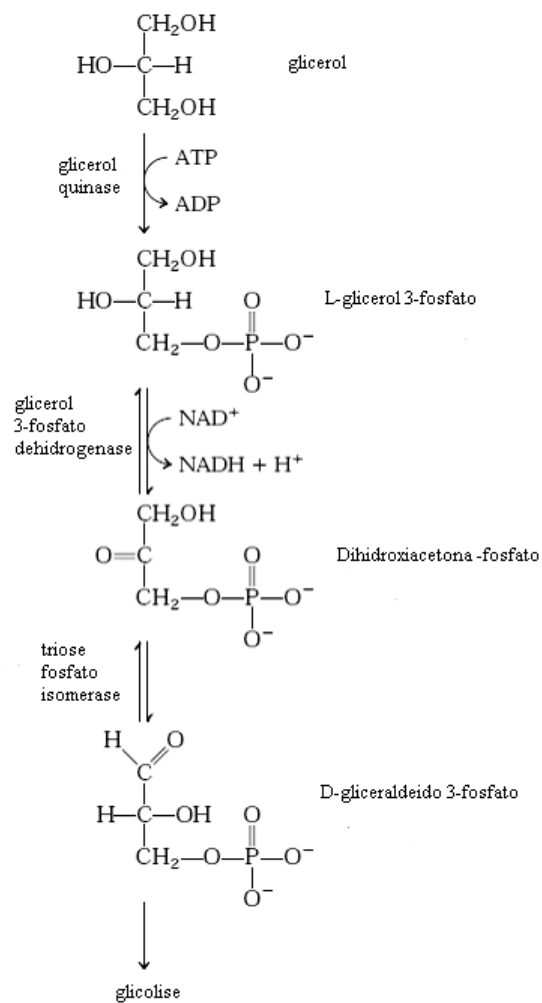


Figura 5.29: Conversão do glicerol à gliceraldeído 3-fosfato

1 glicose \longrightarrow 2 piruvatos + 2 ATPs + 2 NaDHs

2 glicerol \longrightarrow 2 piruvatos + 2 ATPs + 4 NaDHs

Figura 5.30: Balanço energético da glicose e do glicerol

6 CONCLUSÕES

Com os testes de sensibilidades realizados, conclui-se que a linhagem de *E. coli* ESS é sensível à penicilina G e a cefalosporina C e pouco sensível à presença de AC no caldo, apenas em concentrações superiores a 30 mg.L⁻¹. Como as amostras são diluídas para a realização dos bioensaios, o AC não influencia no tamanho do halo de inibição, mas a penicilina N influencia.

Quanto ao tratamento das amostras que envolvem as hidrólises de AC e penicilina N presentes de modo a quantificar corretamente a concentração de CefC, tanto AC quanto a CefC são degradados em meios ácidos e alcalinos, sendo a degradação maior em pH básico. Os resultados mostraram que hidrolisando o ácido clavulânico presente nas amostras é possível reduzir as concentrações de compostos intermediários da rota biossintética de CefC.

Com relação às avaliações de meios de cultivos de literatura para a produção de CefC em biorreator, nos cultivos em que foi utilizado amido como fonte de carbono não houve o consumo total deste substrato, devido provavelmente à hidrólise do amido e geração de glicose que não é assimilada por *S. clavuligerus*. Quanto à produção de CefC, o melhor resultado foi alcançado no cultivo B1 com óleo de soja como fonte de carbono e farinha de soja como fonte de nitrogênio (413 mg.L⁻¹ em 66 h), no entanto com crescimento celular baixo. O meio de cultura B9 (amido como fonte de carbono e farinha de semente de algodão como fonte de nitrogênio) foi o que forneceu melhor desempenho quanto à produção de cefamicina (375 mg.L em 66 h) associada a um bom crescimento celular.

Avaliando-se diferentes fontes de carbono e de nitrogênio, os melhores resultados em termos de produção máxima de CefC foram de 323 mg.L⁻¹ em 96 h e de 341 mg.L⁻¹ em 96 h nos cultivos contendo glicerol e proteína isolada de soja para as linhagens de *S. clavuligerus* ATCC 27064 e DSM 41826, respectivamente.

Embora a linhagem DSM 41826 seja indicada pela literatura como um mutante espontâneo da linhagem selvagem ATCC 27064 maior produtor de CefC, os resultados em termos de produção de CefC obtidos para as duas linhagens testadas não apresentaram diferenças que confirmassem essa informação.

Avaliando-se a influência das fontes de nitrogênio provenientes da soja, pode observar que este microrganismo prefere fontes de nitrogênio com presença de insolúveis que são disponibilizadas no meio de cultura mais lentamente, simulando assim uma suplementação contínua na forma de cultivos em batelada alimentada, evitando assim os fenômenos de inibição e repressão da produção de CefC.

Nos cultivos em batelada alimentada o melhor resultado alcançado em termos de produção de cefamicina C foi no cultivo BA7 (566,5 mg.L⁻¹ em 108 h), cultivo suplementado com glicerol à vazão volumétrica de 0,010 L.h⁻¹ e concentração de glicerol na alimentação de 177 g.L⁻¹ (F.Cs_e=1,77 g.h⁻¹).

Nas condições experimentais testadas nos cultivos em batelada alimentada não foi possível visualizar uma tendência em relação às condições empregadas (fonte de C e condições de alimentação) que caracterizasse a dissociação entre as produções de ácido clavulânico e de cefamicina C. Em todos os cultivos realizados houve produção de ácido clavulânico, sendo estas inferiores às de cefamicina C apenas nos cultivos BA10 e BA11, ambos alimentados com amido e à vazão volumétrica de 0,005 L.h⁻¹.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHARONOWITZ, Y.; DEMAINE, A.L. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 14, p. 159-164, 1978.
- ANTONIO, T. Estudo da composição de meios de cultura para a produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*. 2007 58f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. Instituto de Química de Araraquara, Araraquara, 2007.
- BAGGALEY, K.H.; BROWN, A.G.; SCHOFIELD, C.J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and others clavams. *Natural Products Reports*, p. 329-333, 1997.
- BAPTISTA NETO, A. *et al.* Determinação da cefamicina C por cromatografia líquida de alta eficiência. In: Congresso Latino-americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas. COLACRO XII, Florianópolis, 2008.
- BASCARÁN, V. *et al.* Stringent response and initiation of secondary metabolism in *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of General Microbiology*, v. 137, p. 1625-1634, 1991.
- 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.
- BRAÑA, A.F.; HU, W-S.; DEMAINE, A.L. Involvement of aeration in carbon source regulation of cephem antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology Letters*, v. 5, p. 791-794, 1983.
- BRAÑA, A.F.; WOLFE, S.; DEMAINE, A.L. Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 736-743, 1985.
- BROWN, A.C. *et al.* Naturally occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *Journal of Antibiotics*, v. 29, p. 668-669, 1976.
- BUSHELL, M.E.; FRYDAY, A. The application of materials balancing to the characterization of sequential secondary metabolite formation in *Streptomyces cattalea* NRRL 8057. *Journal of General Microbiology*, v. 129, p. 1733-1741, 1983.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis and fermentation In: VANDAMME, E.J. Biotechnology of industrial antibiotics, New York, Marcel Decker Inc, p. 3-31, 1984.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. PNAS 100, p. 14555-14561, 2003.

COLEMAN, K. *et al.* Bacterial resistance mechanisms as therapeutic targets. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 33, p. 1091-1116, 1994.

COLOMBIÉ, V. *et al.* Effects of glucose limitation on biomass and spiramycin production by *Streptomyces ambofaciens*. Bioprocess and Biosystem Engineering, v. 28, p. 55-61, 2005.

CRUZ, A.J.G. Estudos de produção de cefalosporina C com acompanhamento em linha de variáveis do processo. Tese de Doutorado. 2000. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.

DEMAIN, A.L.; ELANDER, R.P. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. Antonie van Leeuwenhoek, v. 75, p. 5-19, 1999.

DÉVI, S.; SRIDHAR, P. Optimization of critical parameters in immobilization of *Streptomyces clavuligerus* on alginate gel matrix for cephamecin C production. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 15, p. 185-192, 1999.

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

ESSACK, S. The development of β -lactam antibiotics in response to evolution of β -lactamases. Pharmaceutical Research, v. 18, p. 1391-1399, 2001.

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

GRESSER, U. Amoxicillin acid therapy maybe associated with severe side effects – Review of the literature. European Journal of Medicinal Research, v. 4, p. 139-149, 2001.

HENRIKSON, R.L.; MEREDITH, S.C. Amino acid analysis by reverse phase highperformance liquid chromatography precolumn derivatization with phenylthiocyanate analytical. *Biochemistry*, v. 13, p. 65-72, 1984.

INAMINE, E.; BIRNBAUM, J. Production of cephamycin C by fermentation. GB Pat 1466055, 1977.

IVES, P.R.; BUSHELL, M.E. Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology*, v. 143, p. 3573-3579, 1997.

JENSEN, S.E.; PARADKAR A. Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 75, p. 125-133, 1999.

JIN, W. *et al.* Cephamycin C production is regulated by *relA* and *rsh* genes in *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064. *Journal of Biotechnology*, v. 114, p. 81-87, 2004.

KAMOGASHIRA, T. *et al.* Process for the production of antibiotic cephamycin C. US Pat 4332891, 1982.

KERN, B.A.; HENDLIN, D.; INAMINE, E. L-lysine ϵ -aminotransferase involved in cephamycin C synthesis in *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, v. 17, p. 679-685, 1980.

KHALEELI, N.; LI, R.; TOWNSEND, C.A. Origin of beta-lactam carbons in clavulanic acid from and unusual thiamine pyrophosphate mediated reaction. *Journal of American Society*, v. 121, p. 9223-9224, 1999.

KHETAN, A. *et al.* Precursor and cofactor as a check valve for cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnonology Progress*, v. 15, p. 1020-1027, 1999.

KIESER, T. *et al.* Practical *Streptomyces* genetics. Norwich: The John Innes Foundation, p. 613, 2000.

KLEMAN, G.L. *et al.* A predictive and feedback control algorithm maintains a constant glucose concentration in fed-batch fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p. 910-917, 1991.

KOTA, K.P.; SRIDHAR, P. Solid state cultivation of *Streptomyces clavuligerus* for cephamycin C production. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 325-328, 1999.

LA FUENTE, J.L. *et al.* Δ -1-piperideine-6-carboxylate dehydrogenase, a new enzyme that forms α -aminoadipate in *Streptomyces clavuligerus* and other cephamycin C producing actinomycetes. *Biochemistry Journal*, v. 327, p. 59-64, 1997.

LEBRIHI, A.; GERMAIN, P.; LEFEBVRE, G. Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p. 130-135, 1987.

LEBRIHI, A.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P. A study on the regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis by *Streptomyces clavuligerus* in continuous and batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 28, p. 39-43, 1988a.

LEBRIHI, A.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P. Carbon catabolite regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 28, p. 44-51, 1988b.

LIRAS, P.; MARTÍN, J.F. Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*. In: BARREDO, J. L., *Methods in Biotechnology*, vol. 18 (Microbial processes and products), cap. 7, Humana Press Inc., Totowa, p. 149, 2005.

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

MADDURI, K.; STUTTARD, C.; VINING, L.C. Cloning and location of a gene governing lysine ϵ -aminotransferase, an enzyme initiating beta-lactam biosynthesis in *Streptomyces spp.* *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 985-988, 1991.

MAHRO, B.; DEMAIN, A.L. In vivo conversion of penicillin N into a cephalosporin type antibiotic by a non-producing mutant of *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 272-275, 1987.

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

MARTÍN, J.F. Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Advances Biochemical Engineering*, v. 6, p. 105-127, 1977.

MARTÍN, J.F.; DEMAIN, A.L. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological Reviews*, v. 44, p. 230-251, 1980.

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

MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.

MITSURU, I. *et al.* Application of mineral support on cephamycin C production in culture using soybean oil as the sole carbon source. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 53, p. 207-213, 1997.

NAYLER, J.H.C. Resistance to beta-lactams in gram-negative bacteria: relative contributions of beta-lactamase and permeability limitations *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 19, p. 713-732, 1987.

NEVES, A.A.; VIEIRA, L.M.; MENEZES, J.C. Effects of preculture variability on clavulanic acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 72, p. 628-633, 2001.

OKABE, M. *et al.* Preferential and high-yield production of a cephamycin C by dissolved oxygen controlled fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 73, p. 292-296, 1992.

OMSTEAD, D.R.; HUNT, G.H.; BUCKLAND, B.C. Commercial production of cephamycin antibiotics. In: Moo-Young, M. *Comprehensive biotechnology*, vol. 3 (The practice of biotechnology: current commodity products), cap. 9, p. 187, Pergamon Press Inc., USA, 1985.

PARK, Y.S. *et al.* Enhancement of Cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 40, p. 773-779, 1994.

PRUESS, D.L.; KELLETT, M. Ro 22-5417 A new clavam antibiotic from *Streptomyces clavuligerus* I-Discovery and biological activity. *The Journal of Antibiotics*, p. 208-212, 1983.

RIUS, N.; DEMAIN, A.L. Regulation of lysine ϵ -aminotransferase by carbon source and lack of control by phosphate in *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 48, p. 735-737, 1997.

RIUS, N.; MAEDA, K.; DEMAIN, A.L. Induction of L-lysine ϵ -aminotransferase by L-lysine in *Streptomyces clavuligerus*, producer of cephalosporin. FEMS Microbiology Letters, p. 207-211, 1996.

ROLLINS, M.J.; JENSEN, S.E.; WESTLAKE, D.W.S. Effect of aeration on antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus*. Journal of Industrial Microbiology, v. 3, p. 357-364, 1988a.

ROLLINS, M.J. *et al.* Dissolved oxygen control of a maltose feed to batch fermentations of *Streptomyces clavuligerus*: effect on cephamycin C biosynthesis. Biotechnology Letters, v. 10, p. 295-300, 1988b.

ROLLINS, M.J. *et al.* Oxygen derepresses deacetoxycephalosporin C synthase and increases the conversion of penicillin N to cephamycin C in *Streptomyces clavuligerus*. Enzyme and Microbial Technology, v. 12, p. 40-45, 1990.

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

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

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

SARADA, I.; SRIDHAR, P. Nutritional improvement for cephamycin C fermentation using a superior strain of *Streptomyces clavuligerus*. Process Biochemistry, v. 33, p. 317-322, 1998.

SATO, S. Produção de antibióticos. In: SCHMIDELL, W. *et al.* Biotecnologia industrial, vol. 3 (Processos fermentativos e enzimáticos), cap. 5, , Editora Edgard Blücher Ltda., p. 101-124, 2002.

SAUDAGAR, P.S.; SINGHAL, R.S. Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. Bioresource Technology, v. 98, p. 2010 – 2017, 2007.

SHIH, I.; SHEN, M. Optimization of cell growth and poly (ϵ -lysine) production in batch and fed-batch cultures by *Streptomyces albulus* IFO 14147. Process Biochemistry, v. 41, p. 1644 – 1649, 2006.

SILVA, A.S. *et al.* The effect of the addition of invert sugar on the production of cephalosporin C in fed-batch bioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 15, p. 320-325, 1998.

SRIDHAR, P. Cephamicins, important milestone in β -lactum. *Express Pharma Pulse*. 2002. Disponível em: www.expresspharmapulse.com – Acesso em: 01 maio 2006.

STAPLEY, E.O. *et al.* Cephamicins, a new family of β -lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 2, p. 122-131, 1972.

TEODORO, J.C. *et al.* Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 72, p. 450 – 455, 2006.

THYKAER, J.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of β -lactam production. *Metabolic engineering*, v. 5, p. 56-69, 2003.

VANDAMME, E.J. *Biotechnology of industrial antibiotics*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.

VINING, L.C. *et al.* Cephamicin production and isopenicillin N synthetase activity in cultures of *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 27, p. 240-246, 1987.

YAMANÉ, T.; SHIMIZU, S. Fed-batch techniques in microbial process. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, v. 30, p. 147-194, 1984.

YEGNESWARAN, P.K.; GRAY, M.R.; THOMPSON, B.G. Experimental simulation of dissolved oxygen fluctuations in large fermentors: effect in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38, p. 1203-1209, 1991.

YEGNESWARAN, P.K.; GRAY, M.R.; WESTAKLE, D.W.S. Effects of reduced oxygen on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology Letters*, v. 10, p. 479-484, 1988.

ZHANG, J.; DEMAIN, A.L. Regulation of ACV synthetase activity in the beta-lactam biosynthetic pathway by carbon sources and their metabolites. *Archives of Microbiology*, v. 158, p. 364-369, 1992.