

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES DE *STREPTOMYCES CLAVULIGERUS*
ATCC 27064 OBTIDOS POR APLICAÇÃO DE RADIAÇÃO UV E
TRATAMENTO QUÍMICO**

Eliton da Silva Vasconcelos

**SÃO CARLOS
2008**

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Caracterização de Mutantes de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 Obtidos
por Aplicação de Radiação UV e Tratamento Químico.**

Eliton da Silva Vasconcelos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores:

Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka

Prof^a. Dr^a. Isara Lourdes Cruz Hernández

São Carlos – SP
2008

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

V331cm

Vasconcelos, Eliton da Silva.

Caracterização de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 obtidos por aplicação de radiação UV e tratamento químico / Eliton da Silva Vasconcelos. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
90 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Microbiologia industrial. 2. Ácido clavulânico. 3. *Streptomyces clavuligerus*. 4. Caracterização morfológica. I. Título.

CDD: 660.62 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
HISTÓRICO ESCOLAR



Programa de Pós-Graduação em: Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia

Nível do Curso: Mestrado

Último Credenciamento: "Portaria MEC nº 524 de 29 de Abril de 2008"

Aluno: Eliton da Silva Vasconcelos

Filiação: Creudo de Oliveira Vasconcelos e Corina da Silva Vasconcelos

Local de Nascimento: São Carlos - SP

Data de Nascimento: 1711011975

Graduado na Instituição: Universidade Federal de Ponta Grossa

Curso: Ciências Biológicas Ano: 2005

Pós-Graduação na Instituição: _____

Curso / Nível: _____ Ano: _____

Data da matrícula inicial: 02 / 1 / 03 / 2006

Sujeito ao Regimento Interno aprovado pela CaPG, 281.ª reunião, 27 / 08 / 2003

Orientador: Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka e Profª Drª Isara Lourdes Cruz Hernahdez

Exame de Qualificação:

Bolsa de Estudo: FAPESP

escrito: _____

Outros: _____

oral: 19112/2007 _____

Exame de Proficiência: 02 / 03 / 2006 Idioma: Inglês

Data da Defesa da Dissertação / Tese: 18 / 12 / 2008

Título da Dissertação Tese: "Caracterização de Mutantes *Streptomyces Clavuligerus* ATCC 27064 obtidos por Aplicação UV e Tratamento Químico"

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Nome:	Instituição:	Avaliação:
Profª Drª Cristina Paiva de Souza	UFSCar	A
Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior	UFSCar	A
Profª Drª Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo	UNESP	A
Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka	UFSCar	A
_____	_____	_____
X	X	X
X	X	X

À minha família

AGRADECIMENTOS

À minha família e a Edna pelo apoio e pela ajuda.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka e a Prof^a. Dr^a. Isara Lourdes Cruz Hernández pela orientação e pelos ensinamentos.

As professoras Cristina e Lúcia pela ajuda e conselhos.

Ao pessoal do laboratório de bioquímica, especialmente: Vanderlei, Luana, Liliane, Álvaro, Clovis, Luis, Douglas, Débora e Marcel.

Ao técnico Amadeus.

A FAPESP pelo apoio financeiro (Proc 06/54721-7).

Ao DEQ-UFSCar pela infra-estrutura fornecida.

O acaso só favorece a mente preparada.

Louis Pasteur

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Actinomicetos: O gênero <i>Streptomyces</i>	3
2.2. <i>Streptomyces</i> e o seu ciclo de vida.....	4
2.3. <i>Streptomyces clavuligerus</i> : organismo produtor de ácido clavulânico.....	5
2.4. Biossíntese do ácido clavulânico e a regulação da sua produção.....	6
2.5. Melhoramento da produção de antibióticos por mutagênese clássica.....	10
2.6. <i>Streptomyces</i> e a estrutura do seu cromossomo.....	12
2.7. Regulação da expressão gênica em <i>Streptomyces</i>	13
2.8. Regulação da diferenciação morfológica e fisiológica.....	14
2.9. Os genes parálogos em <i>Streptomyces clavuligerus</i>	16
2.10. A resposta estrigente.....	17
2.11. Proteases e produção de pigmentos.....	19
2.12. Atividade lipolítica e o metabolismo dos açúcares.....	19
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo geral.....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Linhagens bacterianas.....	23
4.2. Meios de cultura.....	23
4.3. Condições de cultura e manutenção.....	29

4.4.	Esterilização de equipamentos e materiais.....	29
4.5.	Cultivos em mesa incubadora rotativa.....	30
4.6.	Caracterização morfológica.....	30
4.6.1.	Caracterização morfológica em meio de cultura sólido.....	30
4.6.2.	Caracterização morfológica pela técnica de esgotamento por estrias.....	31
4.6.3.	Caracterização morfológica pela técnica de inoculação cruzada.....	32
4.6.4.	Caracterização morfológica pela técnica de inoculação em bloco de ágar.....	32
4.6.5.	Caracterização morfológica pela técnica de inoculação em lamínula inclinada.....	33
4.6.6.	Caracterização morfológica em meio de cultura líquido.....	33
4.7.	Caracterização bioquímica.....	34
4.7.1.	Produção de pigmentos.....	34
4.7.2.	Atividade proteolítica.....	35
4.7.3.	Bioensaio qualitativo para AC.....	35
4.7.4.	Bioensaio com extração em meio de cultura sólido.....	36
4.7.5.	Bioensaio qualitativo para Cefamicina C.....	36
4.7.6.	Cromatografia em camada delgada.....	37
4.7.7.	Ensaio em meio de cultura mínimo sólido.....	37
4.7.8.	Ensaio em meio de cultura mínimo líquido.....	38
4.7.9.	Cultivo em mesa incubadora totativa pelo método batelada com pulso.....	38
4.7.10.	Atividade da enzima lipase.....	38
4.8.	Métodos Analíticos.....	39
4.8.1.	Determinação da concentração celular.....	39
4.8.2.	Determinação da Concentração de Glicerol.....	39
4.8.3.	Determinação da Concentração de Ácido Clavulânico.....	39
4.8.4.	Atividade lipolítica.....	40
4.8.5.	Determinação de proteínas totais.....	40
4.8.6.	Análises estatísticas.....	40
4.8.7.	Análise de aminoácidos.....	40

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1.	Características morfológicas.....	43
5.1.2.	Características morfológicas das linhagens após os cultivos em placas de Petri.....	43
5.1.3.	Características morfológicas das linhagens mutantes e da selvagem pelo sistema de inoculação cruzada.....	45
5.1.4.	Características morfológicas das linhagens mutantes e da selvagem pelo sistema bloco de ágar.....	46
5.1.5.	Características morfológicas das linhagens mutantes e da selvagem pelo sistema de lamínula inclinada.....	47
5.1.6.	Estudo das características morfológicas em meio de cultura líquido.....	47
5.2.	Características Bioquímicas.....	48
5.2.1.	Produção de pigmentos e atividade proteolítica extracelular.....	48
5.2.2.	Bioensaio qualitativo para ácido clavulânico.....	49
5.2.3.	Ensaio em meio de cultura mínimo sólido.....	50
5.2.4.	Bioensaio com extração em meio sólido.....	52
5.2.5.	Cromatografia em camada delgada.....	52
5.2.6.	Bioensaio qualitativo para cefamicina C.....	53
5.2.7.	Ensaio utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal.....	55
5.2.8.	Ensaio utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal pelo método batelada com pulso.....	57
5.2.9.	Ensaio utilizando os meios GSPA, GSPG e GSPO.....	58
5.2.10.	Ensaio utilizando o meio de cultura Soytone.....	61
5.2.11.	Ensaio utilizando o meio de cultura mínimo líquido suplementado com os aminoácidos ácido glutâmico, prolina, arginina, lisina e ornitina	63
5.2.12.	Estudo da atividade lipolítica intracelular e extracelular, das proteínas totais e de AC após o cultivo de 80 horas.....	66
5.2.13.	Perfil da atividade lipolítica, proteínas totais, biomassa, AC e atividade lipolítica específica utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal após o cultivo de 120 horas.....	68

5.2.14.	Estudo da atividade lipolítica, proteínas totais, biomassa, AC e atividade lipolítica específica utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal modificado sem adição de glicerol.....	72
6.	CONCLUSÕES.....	74
7.	SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....	76
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

ABREVIATURAS

AC – Ácido clavulânico

AAc – Ácido acético

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)

BHI A – Infusão de cérebro e coração com soro de albumina bovina

BHI G - Infusão de cérebro e coração com gelatina.

BSA – Bovine Serum Albumin (Soro de albumina bovina)

C – citosina

C° - Grau Celsius

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade Óptica

E. coli – *Escherichia coli*

EtOH - Etanol

G - guanina

GlyPep – Glicerol e peptona

GlyPep G – Glicerol, peptona e gelatina

GlyPep A – Glicerol, peptona e soro de albumina bovina

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ISP2 – International *Streptomyces* Project 2

mg – Miligrama

mg/L – Miligrama por litro

mL – Mililitro

MMS – Metil Metano Sulfonato

mm – milímetro

mM – Milimolar

MOPS – Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

NaOH – Hidróxido de sódio

nm - nanômetro

RNA – Ácido ribonucléico

rpm – Rotações por minuto

UV – Ultra Violeta

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Gradiente utilizado para separar os compostos derivatizados e determinar a concentração dos aminoácidos.....	42
Tabela 5.1. Características fenotípicas de mutantes obtidos por tratamento com luz UV e MMS a partir de <i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064.....	44
Tabela 5.2. Resultado do teste de crescimento em meio de cultura mínimo suplementado com aminoácidos separadamente.....	50
Tabela 5.3. Resultado do teste de crescimento em meio de cultura mínimo suplementado com aminoácidos separadamente e modificado com adição de glicerol.....	51
Tabela 5.4. Resultado do bioensaio com a bactéria teste <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 29665 pela técnica de extração em meio sólido.....	52
Tabela 5.5. Resultado do bioensaio qualitativo para cefamicina C.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura do ácido clavulânico.....	6
Figura 2.2. Via biossintética da produção de ácido clavulânico em <i>S. clavuligerus</i>	9
Figura 4.1. Procedimento dos cultivos em mesa incubadora rotativa.....	30
Figura 4.2. Técnica de esgotamento por estrias.....	31
Figura 4.3. Inoculação cruzada.....	32
Figura 4.4. Inoculação em bloco de ágar.....	32
Figura 4.5. Inoculação com lamínula inclinada.....	33
Figura 4.6. Classificação morfológica em meio de cultura líquido.....	34
Figura 5.1. Linhagem selvagem, linhagens mutantes “white” AC116, MMS 54, MMS 150 e linhagens mutantes AC13a e AC17a.....	44
Figura 5.2. Hifas e suas estruturas da linhagem selvagem e das linhagens mutantes fotografadas pelo sistema de inoculação cruzada.....	45
Figura 5.3. Micélios aéreos da linhagem selvagem e das linhagens mutantes fotografadas após o crescimento pelo sistema de bloco de ágar.....	46
Figura 5.4. Hifas da linhagem selvagem e das linhagens mutantes fotografadas pelo sistema de lamínula inclinada.....	47
Figura 5.5. Quantificação de glicerol entre a linhagem selvagem e a mutante MMS 150 utilizando o meio GSPG.....	48
Figura 5.6. Bioensaio qualitativo para AC.....	50
Figura 5.7. Teste qualitativo para cefamicina C pelo método decromatografia em camada delgada.....	53
Figura 5.8. Comparação da biomassa entre as linhagens AC 116 e selvagem.....	54
Figura 5.9. Perfil do pH entre as linhagens AC 116 e selvagem.....	54
Figura 5.10. Comparação da concentração de AC entre as linhagens mutantes e a linhagem selvagem utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal.....	55
Figura 5.11. Quantificação de glicerol entre as linhagens mutantes e a linhagem selvagem utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal.....	56
Figura 5.12. Perfil do pH entre as linhagens mutantes e a linhagem selvagem utilizando um meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo	

vegetal.....	56
Figura 5.13. Comparação da concentração de AC entre as linhagens mutante MMS 150 e a linhagem selvagem pelo método batelada com pulso.....	57
Figura 5.14. Perfil do pH entre a linhagem MMS 150 e a selvagem utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal pelo método batelada com pulso.....	58
Figura 5.15. Comparação da concentração de AC entre a linhagem selvagem e a mutante MMS 150 utilizando os meios GSPA, GSPO e GSPG.....	59
Figura 5.16. Quantificação de glicerol entre a linhagem selvagem e a mutante MMS 150 utilizando os meios GSPA, GSPG e GSPO.....	59
Figura 5.17. Perfil do pH entre a linhagem selvagem e a mutante MMS 150 utilizando os meios GSPA, GSPG e GSPO.....	60
Figura 5.18. Comparação da biomassa entre a linhagem selvagem e a mutante MMS 150 utilizando os meios GSPA, GSPG e GSPO.....	60
Figura 5.19. Comparação da concentração de AC entre as linhagens selvagem e MMS 150 utilizando o meio de cultura soytone.....	61
Figura 5.20. Quantificação de glicerol entre as linhagens MMS 150 e selvagem utilizando o meio de cultura soytone.....	62
Figura 5.21. Perfil do pH entre as linhagens selvagem e MMS 150 utilizando o meio de cultura soytone.....	62
Figura 5.22. Comparação da biomassa entre as linhagens selvagem e a MMS 150 utilizando o meio de cultura soytone.....	63
Figura 5.23. Linhagem selvagem e o seu consumo de aminoácidos utilizando o meio de cultura mínimo suplementado com aminoácidos.....	64
Figura 5.24. Linhagem MMS 150 e o seu consumo de aminoácidos utilizando o meio de cultura mínimo suplementado com aminoácidos.....	64
Figura 5.25. Comparação da concentração de AC entre as linhagens selvagem e MMS 150 utilizando o meio de cultura mínimo suplementado com aminoácidos.....	65
Figura 5.26. Comparação da biomassa entre a linhagens selvagem e a MMS 150 utilizando o meio de cultura mínimo suplementado com aminoácidos.....	65
Figura 5.27. Perfil da atividade lipolítica do pellet e do sobrenadante entre as linhagens selvagem e a MMS 150.....	66
Figura 5.28. Comparação da concentração de AC entre as linhagens selvagem e MMS 150 utilizando diferentes temperaturas de estoque.....	67
Figura 5.29. Comparação de proteínas totais entre as linhagens selvagem e MMS 150 utilizando diferentes temperaturas de estoque.....	67

Figura 5.30. Perfil da atividade lipolítica entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo.....	68
Figura 5.31. Comparação da concentração de proteínas totais entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo.....	69
Figura 5.32. Comparação da biomassa entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo.....	69
Figura 5.33. Comparação da concentração de AC entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo.....	70
Figura 5.34. Perfil da atividade lipolítica específica utilizando o meio de cultura complexo.....	70
Figura 5.35. Perfil da atividade lipolítica entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo modificado.....	71
Figura 5.36. Comparação da concentração de proteínas totais entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo modificado.....	72
Figura 5.37. Comparação da biomassa entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo modificado.....	72
Figura 5.38. Comparação da concentração de AC entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo modificado.....	73
Figura 5.39. Perfil da atividade lipolítica específica utilizando o meio de cultura complexo modificado.....	73

RESUMO

O ácido clavulânico é um poderoso inibidor de enzimas β -lactamases produzidas por bactérias resistentes a penicilinas e cefalosporinas. Esse ácido é produzido industrialmente através de cultivos submersos de *Streptomyces clavuligerus*, em meios complexos cujas fontes de carbono e de nitrogênio são supridas por matérias primas de baixo custo que propiciam altas produtividades. O ácido clavulânico mostra uma grande afinidade por enzimas que se ligam a derivados da penicilina, facilitando a sua utilização frequente com penicilinas semi-sintéticas, sendo a combinação com a amoxicilina o melhor exemplo do uso de substâncias inibidoras de beta-lactamases.

O melhoramento genético utilizando agentes físicos e químicos é uma estratégia necessária em programas de produção de metabólitos bioativos já que as linhagens de porte industrial perdem sua produtividade devido a fenômenos de instabilidade genética.

Neste trabalho foram avaliadas características morfológicas e bioquímicas de algumas linhagens mutantes obtidas por tratamento com luz UV e com metil metano sulfonato, comparando sempre as características dos mutantes com as da linhagem selvagem (*Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064).

Os resultados indicaram que as mutações deram origem a linhagens fenotipicamente diferentes, sendo que as maiores mudanças foram demonstradas pelas linhagens mutantes AC116, MMS 150 e MMS 54, que apresentaram ausência de pigmentação dos seus esporos maduros. A linhagem MMS 150 apresentou uma maior produção de AC diante os cultivos realizados com os meios de cultura semi-sintéticos. Perante os outros meios de cultura a linhagem selvagem obteve uma maior produção, porém quando utilizado o meio de cultura complexo modificado, a linhagem MMS 150 apresentou mudanças na sua atividade lipolítica e uma maior produção de AC.

ABSTRACT

The clavulanic acid is a powerful inhibitor of the beta-lactamases produced by bacterias resistant to penicillin and cephalosporin. This acid is produced industrially by strains of *Streptomyces clavuligerus* in complex medium whose carbon and nitrogen source are supplied by inexpensive substances that provide high production. The clavulanic acid has a high affinity for enzymes that attach to penicillin derivatives, what enable to be used with semi-synthetic penicillin, being the combination with amoxilin the best exemple of substances inhibitor of beta-lactamases.

The genetic improvement using physical and chemical agents is a necessary strategy in programs of production of bioactive metabolit whereas the industrial strains lost its productivity due phenomenon of genetic instability.

In this work it appraised morphologic and biochemistry characteristic of some mutant strains obtained by treatment with UV light and with MMS, always comparing the characteristics of the mutants with the wild type (*Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064).

The results indicated that the mutations originated strains with different phenotypes, and the larger changes were demonstrated through mutants strains AC116, MMS 150 and MMS 54, that exhibited absence of pigmentation in its mature spores. The strains MMS 150 presented a larger production of AC when cultured in semi-synthetics mediums. Among the others mediums the wild type strain obtained a larger production, however when used the modified complex medium, the MMS 150 strain showed changes in its lipolitic activity and a larger production of AC.

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos são substâncias produzidas por microrganismos ou outros tipos de organismos, que em quantidades muito pequenas inibem o desenvolvimento de outros microorganismos. Dos antibióticos produzidos por microrganismos 66 % originam-se dos actinomicetos, 22 % de fungos e 12 % de bactérias não-actinomicetos. Daqueles originados dos actinomicetos 80% são obtidos do gênero *Streptomyces* (Kieser *et al.*, 2000). Os estreptomicetos também constituem o maior grupo de actinomicetos produtores de outras classes de metabólitos secundários biologicamente ativos (Williams *et al.*, 1989, Korn-Wendisch e Kutzner, 1992).

Diferentes classes de antibióticos, incluindo os β -lactâmicos, amplamente utilizados na prática médica, têm sido obtidos a partir de diferentes gêneros de fungos, bactérias e actinomicetos. Os β -lactâmicos incluem penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens. Todos eles contêm um núcleo básico comum, o anel β -lactâmico. Os carbapenens ou tienamicinas são produzidos por *Streptomyces cattleya*. Os antibióticos β -lactâmicos foram os primeiros a serem empregados na terapêutica clínica com o uso da penicilina em 1942 e da cefalosporina posteriormente.

Praticamente desde a primeira aplicação clínica, a eficiência de compostos da classe dos antibióticos β -lactâmicos tem sido diminuída pelo crescente número de bactérias capazes de inativá-los. Esta inativação acontece pela capacidade de certos microorganismos patógenos de produzir β -lactamases. Constituindo este o mais importante mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos (Pelczar *et al.*, 1997).

Desta forma existe um número importante de patógenos resistentes aos antibióticos β -lactâmicos, dentre os quais se destacam *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* e *Haemophilus influenzae*. Estes microrganismos, através das β -lactamases, hidrolisam o anel β -lactâmico, liberando produtos de hidrólise que não possuem atividade antibiótica (Bush, 1989).

As primeiras tentativas sem sucesso para encontrar inibidores de β -lactamases foram realizadas entre os anos 1940 e 1950. Em 1967 foi iniciado o primeiro programa de triagem com microrganismos para o isolamento de inibidores das β -lactamases de

ocorrência natural. Este programa permitiu o isolamento a partir de *Streptomyces clavuligerus* do ácido clavulânico e, do ácido olivânico a partir do *Streptomyces olivaceus* (Rolinson, 1991). Este último composto, embora constitua um potente inibidor das β -lactamases, nunca foi utilizado como fármaco por ser um composto suscetível a degradação metabólica nos rins.

O ácido clavulânico, apesar de ser um antibiótico de atividade fraca (Concentração Inibitória Mínima de 25-125 $\mu\text{g/ml}$), é um poderoso inibidor de β -lactamases produzidas por bactérias resistentes a penicilinas e cefalosporinas. Quando utilizado em combinação com estes antibióticos, o ácido clavulânico se liga irreversivelmente à serina do grupo hidroxila do centro ativo das β -lactamases, produzindo um intermediário acilado estável e assim inativando a enzima (Foulstone e Reading, 1982; Baggaley *et al.*, 1997).

O ácido clavulânico mostra uma grande afinidade por proteínas que se ligam a derivados da penicilina e isto facilita que freqüentemente seja utilizado em combinação com penicilinas semi-sintéticas, sendo a combinação com a amoxicilina a mais comercializada. Seu processo de obtenção industrial é pouco documentado na literatura, sendo uma premissa importante o conhecimento e melhoramento de seu processo de produção (Elander, 2003).

Considerando os aspectos acima comentados, este trabalho buscou investigar características morfológicas e bioquímicas de algumas linhagens mutantes obtidas por tratamento com luz UV e com metil metano sulfonato, objetivando assim, ao comparar com as características da linhagem selvagem, verificar quais as mudanças causadas pelo agente mutagênico aplicado e sua relação com a síntese de ácido clavulânico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Actinomicetos: O gênero *Streptomyces*

Streptomyces são microorganismos aeróbios obrigatórios (ou estritos) que desenvolvem micélios estáveis formado por filamentos ramificados denominado de hifas, que, ao seu final formam longas cadeias de esporos (Lechevalier, 1989; Loci, 1989).

A linhagem *Streptomyces clavuligerus* foi originalmente isolada de uma amostra do solo da América do Sul como produtora de cefalosporina, recebeu este nome por sua forma de bastões em suas ramificações onde se formam as cadeias de esporos (do Latin *clavula*, pequeno bastões, e *-igerus*, que forma).

Streptomyces clavuligerus está classificado dentro da série cinza da Categoria IV do gênero *Streptomyces*, com base na cor verde grisáleo escuro de seus esporos maduros (Locci, 1989). A cepa tipo é a cepa ATCC 27064 (=NRRL 3585; Higgins e Kastner, 1971).

Os Actinomicetos produzem ao redor de 61% de todos os metabólitos secundários conhecidos (Kieser *et al.*, 2000), dos quais 70 a 80% são produzidos por espécies do gênero *Streptomyces* (Challis e Hopwood, 2003). Os metabólitos secundários são compostos não essenciais para o crescimento e a sobrevivência do organismo, mostram um alto grau de diversidade de estruturas químicas complexas e são tipicamente produzidos depois de entrar na fase estacionária do crescimento (Martín e Demain, 1980). A maioria destes metabólitos secundários tem atividade antibiótica, de modo que 66% de todos os antibióticos conhecidos são produzidos por actinomicetos. Outros metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* incluem agentes antitumorais, promotores de crescimento de plantas, herbicidas e imunosupresores (Kieser *et al.*, 2000).

O grupo Actinomicetos foi elevado de classe para filo na última edição do Bergey's Manual (Garrity e Holt, 2001). A atual taxonomia do gênero *Streptomyces* é a seguinte (Garrity *et al.*, 2004):

Domínio *Bacteria*; Filo B XIV "*Actinobacteria*"; Classe I *Actinobacteria*; Subclasse V *Actinobacteridae*; Ordem I *Actinomycetales*; Subordem XIV *Streptomycineae*; Família I *Streptomycetaceae*; Gênero I *Streptomyces*.

Streptomyces são bactérias gram positivas. As bactérias gram positivas se dividem em dois grandes grupos: os organismos de baixo conteúdo G+C (*Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, etc) e os de alto conteúdo de G+C constituídos basicamente por actinomicetos. No grupo dos actinomicetos, o gênero *Streptomyces* é um dos mais pesquisados devido a sua alta produção de metabólitos secundários. Este gênero foi proposto por Waksman e Henrici em 1943 e descrito por eles como actinomicetos formadores de esporos e aeróbios. Os membros deste gênero são conhecidos por possuir variadas características fenotípicas e constituir distintas linhas filéticas, existindo hoje mais de 450 espécies descritas e validadas (William *et al.*, 1989; Embley e Stackebrandt, 1994).

Streptomyces é o principal gênero da família *Streptomycetaceae*, (Lechevalier e Lechevalier, 1981). Eles produzem micélio aéreo e vegetativo extensivamente ramificado. As hifas reprodutoras têm um diâmetro de 0.5-1.0 μm . O crescimento deles ocorre pelos ápices das hifas acompanhado da formação de ramificações. Ao amadurecer as colônias produzem o micélio aéreo (esporóforos) o qual se desenvolve dando origem a cadeias de esporos (conídias).

O gênero *Streptomyces* é definido por caracteres quimiotaxonômicos e fenotípicos. Atualmente maior ênfase para classificação é dada às homologias do RNA ribossomal 16S, além de análise da composição da parede celular, dos ácidos graxos e dos lipídeos. Um dos métodos mais rápidos para identificação preliminar a nível de gênero é a presença dos isômeros LL do ácido diaminopimérico (LL-DAP) (Williams *et al.*, 1989; Wellington *et al.*, 1992).

2.2. *Streptomyces* e o seu ciclo de vida

Streptomyces possui um complexo ciclo de vida. Seus esporos se encontram geralmente no solo e são muito resistentes a condições climáticas diversas. Quando as condições ambientais fornecem umidade e nutrientes, os esporos germinam usando a energia fornecida pelo dissacarídeo trealose, o principal componente do esporo. A germinação termina com o início da formação de um filamento, que requer fontes de nitrogênio e carbono como suprimentos (Ensign, 1978; Hardisson *et al.*, 1978).

O crescimento ocorre a partir da ponta dos filamentos, sendo frequentemente acompanhado pela formação de ramificações, de modo que a fase vegetativa consiste

em uma matriz complexa, fortemente entrelaçada, originando um micélio compacto e convoluto e, subsequentemente uma colônia. À medida que a colônia envelhece, formam-se filamentos aéreos característicos, denominados esporóforos, que se projetam acima da superfície da colônia. Os esporos dos streptomicetos são produzidos pela formação de paredes transversais no esporóforo multinucleado, seguido pela separação das células individuais, na forma de esporos (Flärdh, 2003).

2.3. *Streptomyces clavuligerus*: organismo produtor de ácido clavulânico

A contínua exposição de bactérias patogênicas aos primeiros antibióticos β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) semi-sintéticos acarretou na capacidade bacteriana de produzir β -lactamases altamente eficientes e, assim, o desenvolvimento da resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Desde então, a produção e os mecanismos de ação das β -lactamases têm sido amplamente estudados. Nesse contexto, na década de 1960 foram iniciados programas de triagem para a descoberta de substâncias com atividade inibidora de enzimas β -lactamases.

Em 1971, Higgens e Kastner do Lilly Research Laboratories, durante a realização de uma triagem com microorganismos para detectar estreptomicetos produtores de cefamicinas, descreveram uma nova espécie de actinomiceto que foi isolado de amostras do solo da América do Sul. Esta nova espécie foi nomeada *Streptomyces clavuligerus*, e a única linhagem isolada foi depositada no Northern Regional Research Laboratory Collection como NRRL 3585 e na American Type Culture Collection como ATCC 27064.

Dentre as características morfológicas da linhagem *Streptomyces clavuligerus* destacam-se a esporulação (esporóforos rectiflexíveis e superfície dos esporos lisa), a coloração do micélio verde-grisálea escura quando a esporulação é abundante e a coloração do verso da colônia de amarelo a amarelo-grisálea (William *et al.*, 1994).

A Smith Kline Beecham Farmacêutica adquiriu algumas culturas da ATCC (*S. lipmani*, *S. lactamdurans*, *S. griseus* e, *S. clavuligerus*) para testá-las quanto à capacidade de produção de inibidores de β -lactamases. Particularmente no caldo de cultura de *S. clavuligerus* foi observado um metabólito com pronunciada ação inibitória de β -lactamases. Este metabólito, diferente das cefamicinas que já tinham sido

descobertas pela Lilly e pela Merck, foi denominado ácido clavulânico (Brown *et al.*, 1976).

O ácido clavulânico é uma substância de ocorrência natural. Foi isolada e sua estrutura foi elucidada por Howarth *et al.* (1976). É um composto β -lactâmico resultante da fusão de dois anéis: o anel β -lactâmico e o anel oxazolidino, diferenciando-se das penicilinas e cefalosporinas por possuir um átomo de oxigênio no lugar de um átomo de enxofre (Buckland *et al.*, 1977), (Figura 1).

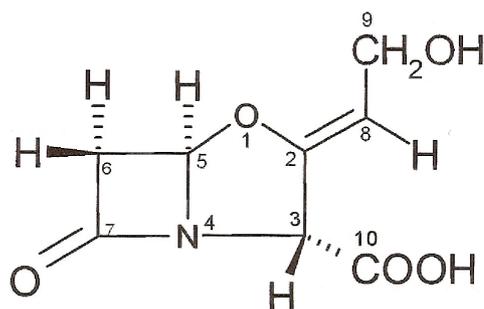


Figura 2.1. Estrutura do ácido clavulânico. (ácido Z-(2R, 5R)-3-(β -hidoxietilideno)-7-oxo-4oxa-1azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico) (Brown *et al.*, 1984).

Atualmente o medicamento cuja formulação contém ácido clavulânico e amoxicilina é comercializado no Reino Unido pelo nome de Augmentin (Beecham Research Laboratories, 1981), e no Brasil como Clavulin (Glaxo Smith Kline).

Além do ácido clavulânico, *S. clavuligerus* também produz Cefamicina C, uma molécula β -lactâmica do tipo cefalosporina (Whitney *et al.*, 1972), e uma família de compostos chamados de clavamas, com uma estrutura básica de anéis similares a do ácido clavulânico com uma configuração estereoquímica 5-S. Carecem de atividade inibidora de β -lactamases, porém alguns possuem atividade antifúngica (Brown *et al.*, 1979).

2.4. Biossíntese do ácido clavulânico e a regulação da sua produção

Streptomyces clavuligerus possui uma grande habilidade em produzir metabólitos secundários, sendo vinte e um ao todo, dentre eles a cefamicina C e cefalosporina (Liras e Rodríguez-Garcia, 2000), eventualmente isopenicilina N encontrada como intermediário na síntese de cefamicina (Lee e Ho, 1996),

desacetilcefalosporina C e também o ácido clavulânico, sendo este último o mais importante inibidor de β -lactamases conhecido.

Metabólitos secundários são compostos não essenciais para o crescimento e a sobrevivência do microrganismo, eles possuem uma alta diversidade e complexidade em suas estruturas químicas e são geralmente produzidos quando o microrganismo está na sua fase estacionária do crescimento (Martin e Demain, 1980). A maioria destes metabólitos secundários possui atividade antibiótica, sendo que 66% dos antibióticos conhecidos são produzidos por actinomicetos.

A biossíntese do ácido clavulânico vem sendo apenas recentemente entendida. O isolamento de intermediários metabólicos, os estudos com isótopos, a purificação e caracterização das enzimas que participam do processo, e os estudos genéticos, têm contribuindo para esclarecer as muitas lacunas existentes na compreensão desta rota biossintética.

Na biossíntese do AC a arginina e a ornitina exercem uma estimulação dependente da concentração (Romero *et al.*, 1986) e ambos os aminoácidos são efetivamente incorporados na molécula de ácido clavulânico (Townsend e Ho, 1985; Romero *et al.*, 1986). A incorporação destes dois aminoácidos acontece nos carbonos C-2, C-3, C-8 e C-10. A incorporação da arginina na molécula de AC não estabelece a ornitina como precursor direto, pois a enzima ornitina carbamil transferase de *S. clavuligerus* possui atividade arginase, que converte a arginina em ornitina (De la Fuente *et al.*, 1996). No entanto, Valentine *et al.* (1993) utilizaram mutantes interrompidos nos genes *argF* e *argG*, os quais foram incapazes de converter a ornitina em arginina e assim mesmo encontraram uma boa incorporação da arginina marcada isotopicamente na molécula de AC e uma pobre incorporação de ornitina. Isto demonstra que a arginina é o precursor direto do AC e indica que a atividade arginase não produz suficiente ornitina para incorporar no AC.

Outros estudos apontam que o glicerol, glicerato, propionato e β -hidroxipropionato são incorporados nos carbonos C-5 a C-7 da molécula de ácido clavulânico. Também que a não incorporação do hidrogênio presente no C-2 do lactato ou glicerato sugere que ambos os componentes sejam metabolizados a piruvato antes de serem incorporados ao ácido clavulânico (Pitlik e Townsend, 1997; Thirkette *et al.*, 1997).

A primeira reação da biossíntese de AC implica na condensação de L-arginina e D-gliceraldeído-3-fosfato para formar a N²-(2-carboxietil)-arginina (CEA). A reação é

catalisada pela enzima CEA sintetase (CEAS), codificada pelo gene *ceaS2* (Khaleeli *et al.*, 1999). Este gene havia sido previamente clonado e chamado *pyc* (Pérez-Redondo *et al.*, 200), e posteriormente *orf2* (Jensen *et al.*, 2000) e *ceaS* (Liras e Rodríguez-García, 2000; Tahlan *et al.*, 2004).

No seguinte passo, a enzima β -lactâmica sintetase (β -LS) fecha o anel β -lactâmico para dar lugar ao ácido deoxiguanidino-proclavamínico (DGPC). A β -LS é codificada pelo gene *bls* (Hodgson *et al.*, 1995; Bachmann *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 2000). Posteriormente, a enzima dependente do oxigênio molecular clavaminato sintetase (CAS, codificada por *cas2*) catalisa a introdução de um grupo hidroxila em DPGC, originando o ácido guanidino-proclavamínico (Marsh *et al.*, 1992; Hodgson *et al.*, 1995; Paradkar e Jensen, 1995).

A eliminação do grupo amidino por proclavaminato amidinohidrolase (PAH) produz o ácido proclavamínico (Élson *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1995; Elkins *et al.*, 2002). PAH é codificada pelo gene *pah* (Aidoo *et al.*, 1994; Hodgson *et al.*, 1995; Jensen *et al.*, 2000). A reação conduzida por PAH é essencial para permitir a CAS catalisar o ciclo do ácido proclavamínico para formar o anel oxazolidínico (Wu *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2000), e na reação subsequente a ligação entre o radical C-2 produz ácido clavamínico, último intermediário comum entre o ácido clavulânico e outras clavamas (Egan *et al.*, 1997), (Figura 2).

Os últimos passos da biossíntese de AC são pobremente conhecidos. O clavaldeído (clavulanato-9-aldeído) é o último intermediário conhecido. O grupo aldeído do C-9 é reduzido por uma redutase dependente de NADPH a clavaldeído redutase (CAR), também chamada de ácido clavulânico deidrogenase (CAD) (Nicholson *et al.*, 1994), e codificada pelo gene *car* (Pérez-Redondo *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 2000). A transformação do ácido clavamínico em clavaldeído não está totalmente elucidado, se sabe que compreende uma desaminação oxidativa dependente de oxigênio molecular, e a mudança da estereoisomeria do grupo carboxilo do C-3 e do hidrogênio de C-5 para dar lugar a uma estereoquímica 3R, 5R, essencial para a atividade inibidora da β -lactamase (Liras e Rodríguez-García, 2000).

Diferentes modificações da cadeia no C-2 do ácido clavamínico e a eliminação do grupo carboxílico em C-3 conduzem à diversidade de clavamas 3S, 5S produzidas por *S. clavuligerus* (Liras e Rodríguez-García, 2000). Recentemente, foi descrito um novo intermediário, o ácido N-glicil-clavamínico, formado pela condensação de glicina e ácido clavamínico e catalisado pela enzima codificada pela *orf17* (Arulanantham *et*

al., 2005). Este intermediário estaria de acordo com a acumulação de um novo metabólito tipo clavama, o ácido N-acetilglicilclavamínico, em mutantes interrompidos para *oppA2* e *orf16* (Jensen *et al.*, 2004a; Lorenzana *et al.*, 2004).

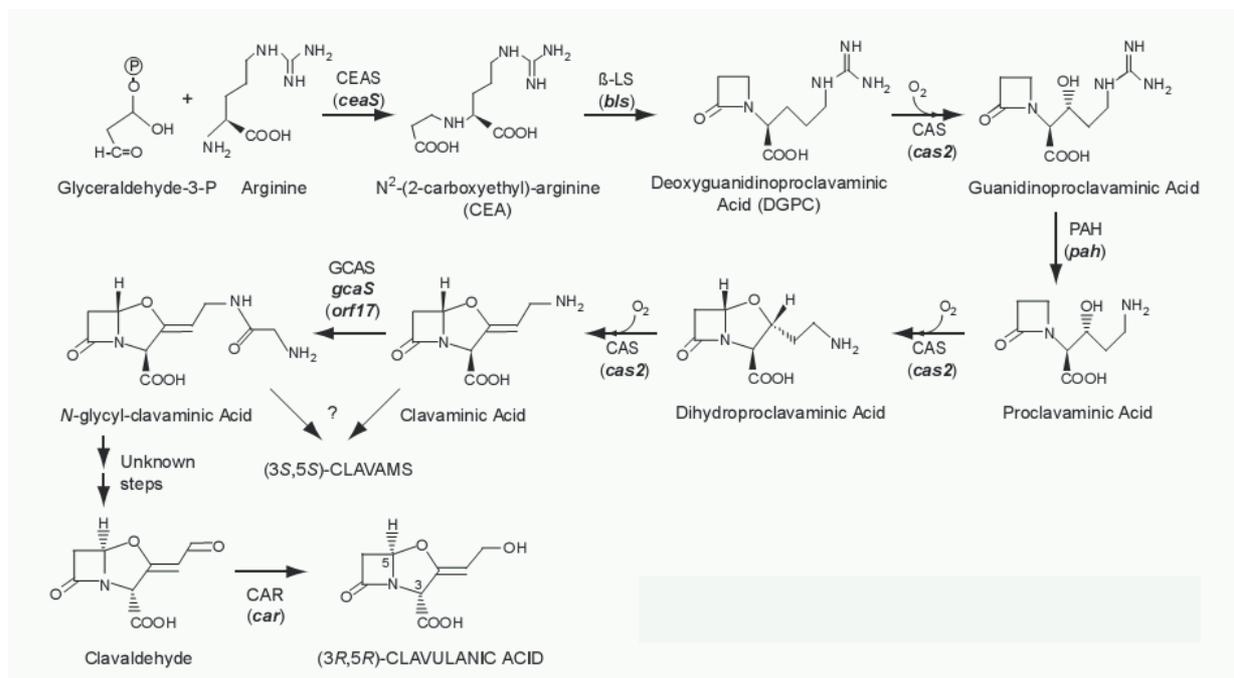


Figura 2.2. Via biossintética da produção de ácido clavulânico em *S. clavuligerus* (Liras e Rodriguez-Garcia, 2000).

Pouco ainda se conhece sobre a regulação da produção de ácido clavulânico, existindo controvérsias a serem elucidadas sobre os substratos que favorecem ou não a produção de ácido clavulânico. Romero *et al.* (1984) mostraram que o ácido glutâmico afeta negativamente a produção de ácido clavulânico. Em trabalho posterior estes autores demonstraram que a ornitina e a arginina exercem um efeito estimulatório na síntese de ácido clavulânico (Romero *et al.*, 1986). Jones *et al.* (1997) verificaram que *S. clavuligerus* produziu ácido clavulânico em fermentações em batelada sob condições de concentração de glicerol e fosfato limitantes de crescimento, mas não houve produção quando o microorganismo cresceu em meio deficiente em fonte de nitrogênio.

Ives e Bushell, (1997) identificaram os metabólitos intermediários que influenciam na biossíntese do ácido clavulânico, observando que a adição ao meio de cultura de determinados aminoácidos (leucina, isoleucina, serina e valina) mantidos a uma concentração constante de 10 mM resultou no aumento da velocidade de produção de ácido clavulânico. Ainda nesse trabalho verificou-se que a alimentação com arginina (considerada precursor do ácido clavulânico) não alterou a velocidade de produção de

AC. Segundo Romero *et al.* (1984), a alimentação com arginina e/ou valina levam ao acúmulo de glutamato que por sua vez diminui a produção de AC.

Quanto à regulação pelo fosfato, alguns estudos são relatados. Os íons fosfato são essenciais para todas as reações que requerem energia, como síntese de DNA, RNA, proteínas, metabolismo de carbono e nitrogênio e processos de multiplicação celular (Spizek e Tichy, 1995). Especificamente no processo de produção de AC o excesso de fosfato exerce um efeito negativo. Neste caso, o mecanismo de ação do fosfato na produção de AC não foi estudado, mas os resultados experimentais confirmaram que o fosfato controla a síntese de AC por repressão do sistema da enzima ácido clavulânico sintase (Romero *et al.*, 1984).

2.5. Melhoramento da produção de antibióticos por mutagênese clássica

A produtividade e outros aspectos econômicos de um processo fermentativo para a obtenção de antibióticos podem ser otimizados através do desenvolvimento de linhagens mais produtivas (obtenção de mutantes) e/ou da otimização do ambiente físico-químico no qual o organismo é exposto. Os programas de melhoramento genético de microrganismos de aplicação industrial visam principalmente à obtenção de mutantes com maior capacidade de produção do composto de interesse, utilizando-se para estes fins técnicas de mutagênese clássica, fusão de protoplastos e tecnologias de DNA recombinante.

Durante muitas décadas a mutagênese induzida eficientemente utilizando agentes físicos e químicos têm sido de crucial importância nos programas de melhoramento de linhagens para produção de antibióticos (Baltz, 1986). Um exemplo clássico é o da produção de penicilina, que de 20 unidades/ml do antibiótico produzidas em 1943, sua produção incrementou-se para 85.000 unidades/ml (~50g/L) em 1984 através de programas de desenvolvimento empírico das linhagens produtoras. Estes procedimentos combinam o uso de mutagênese com sistemas de seleção de linhagens altamente produtivas (Crueger e Crueger, 1984). Outros métodos também utilizados com sucesso tais como a fusão de protoplastos e métodos de engenharia genética têm sido pouco divulgados e não se conhecem metodologias devido ao fato de constituírem segredos comerciais (Chater, 1990).

Apesar do grande impacto econômico que o melhoramento genético por mutagênese tem trazido a indústria, ainda pouco se conhece sobre os mecanismos de mutação, replicação e reparo de DNA em linhagens de *Streptomyces* de interesse industrial. Com relação ao processo de produção do ácido clavulânico são poucos os trabalhos que descrevem o melhoramento do processo através da obtenção de mutantes (Kieser *et al.*, 2000).

A indução de mutagênese por radiação UV não é muito eficaz em linhagens produtoras de antibióticos, incluindo-se neste grupo alguns representantes do gênero *Streptomyces*, que apresentam uma resistência natural ao processo de mutagênese devido ao alto conteúdo de bases nitrogenadas C+G no seu genoma. Apenas algumas linhagens de *Streptomyces* mostram-se sensíveis ao efeito da radiação UV por não possuírem mecanismos de reparo por fotorreativação. Salienta-se, porém a utilização com sucesso de luz UV na mutagênese de espécies de *S. clavuligerus* e *S. coelicolor* que tem demonstrado serem sensíveis a este tipo de radiação (Singer e Ames, 1970; Baltz, 1986).

Os trabalhos iniciais sobre mecanismos de mutagênese induzida e/ou espontânea em *Streptomyces* remetem aos estudos de Grein (1960) sobre a indução de mutações em *Streptomyces peucetius* empregando ácido nitroso, NTG, nitrosometiluretano e radiação UV. Tais experimentos visavam o isolamento de mutantes com maior produtividade do antibiótico daunorubicina, além da produção de novos compostos antraciclínicos. Estudos semelhantes com o objetivo de aperfeiçoar as condições de mutagênese por tratamento com NTG em *S. coelicolor* A3(2), foram realizados por Delic e colaboradores (1970).

No entanto, os trabalhos mais extensivos visando uma melhor compreensão dos efeitos de diferentes agentes genotóxicos foram realizados por Baltz (1986) em *S. fradiae*. Com estes estudos, Baltz verificou que nem todos os agentes mutagênicos são capazes de induzir níveis altos de mutação em *Streptomyces*. Além disso, ficou demonstrado que o agente químico que melhor atuou na indução de mutantes e apresentou um maior número de sobreviventes em *S. fradiae* foi o NTG, enquanto que a radiação UV apresentou-se como um baixo indutor.

É sabido que o efeito de agentes genotóxicos sobre microrganismos depende da capacidade de interação destes agentes com o DNA e dos próprios mecanismos de reparo do microrganismo, os quais promovem a recuperação dos danos causados pela interação. As células procarióticas durante o processo de evolução desenvolveram uma

série de mecanismos de reparo de lesões do DNA, sendo alguns destes sistemas o reparo por excisão, o reparo por fotorreativação e o sistema SOS. No caso do gênero *Streptomyces*, pouco se conhece a respeito destes mecanismos de reparo e da constituição do genoma, sendo o fenômeno de mutação em *Streptomyces* uma questão ainda muito complexa (Kelner, 1949; Baltz, 1986).

2.6. *Streptomyces* e a estrutura do seu cromossomo

As hifas de *Streptomyces* possuem múltiplas cópias de um cromossomo linear ao redor de 8 Mb e um conteúdo médio de 72% de G+C (Volf e Altenbuchner, 1998). A replicação é bidirecional a partir do ponto *oriC* localizado no centro do cromossomo (Musialowski *et al.*, 1994; Jakimowicz *et al.*, 1998). A replicação do cromossomo linear é auxiliada por proteínas que se encontram na extremidade 5' que também proporcionam a replicação (Chang e Cohen, 1994). A espécie melhor caracterizada é *S. coelicolor*, seu cromossomo está organizado em um núcleo central que compreende cerca da metade do cromossomo total. Este núcleo possui a maioria dos genes para o metabolismo primário e para a biossíntese de macromoléculas (replicação do DNA, maquinaria para a transcrição e tradução), enquanto os braços terminais do cromossomo possuem genes que codificam enzimas secretoras e para a biossíntese de metabólitos secundário (Bentley *et al.*, 2002; Redenbach *et al.*, 1996).

Os extremos dos braços do cromossomo são formados por seqüências repetidas e invertidas, com 24 a 550 kb, chamadas de “repetições invertidas terminais” (TIRs sigla em inglês). Vizinho aos TIRs se encontram múltiplas repetições diretas e elementos transponíveis e de inserção. Acredita-se que estes elementos são responsáveis pela circulação espontânea do cromossomo e de grandes deleções e ampliações do DNA, provocando assim a conhecida instabilidade genética do cromossomo de *Streptomyces* (Volf e Altenbuchner, 1998).

Streptomyces possui também vários elementos extracromossomais, como plasmídeos circulares e lineares, que vão de 12 a várias centenas de kb (Chater e Hopwood, 1993; Chang e Cohen, 1994). Em *S. coelicolor*, o plasmídeo linear de 356 kb SCP1 contém os genes da biossíntese de metilenomicina (Chater e Hopwood, 1993; Bentley *et al.*, 2004). Um plasmídeo circular transferível, chamado SCP2, e um plasmídeo normalmente integrado no cromossomo, SLP1, estão também presentes em

S. coelicolor (Bibb, 1996). *Streptomyces* possui também múltiplos plasmídeos de pequeno tamanho e de alto número de cópias, que tem sido utilizado para o desenvolvimento de técnicas de manipulação genética (Kieser *et al.*, 1982, 2000). Uma característica freqüente dos plasmídeos de *Streptomyces* é a conjugação intra e inter-específica (Kieser *et al.*, 1982; Flett *et al.*, 1997).

2.7. Regulação da expressão gênica em *Streptomyces*

Os genes em *Streptomyces* estão organizados em operons que permitem uma regulação transcricional comum. Os genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários se encontram agrupados formando clusters, e frequentemente são co-regulados por proteínas ativadoras específicas chamadas SARP – sigla do inglês “Proteína Reguladora de Antibióticos de *Streptomyces*” – (Aharonowitz *et al.*, 1992; Bibb, 1996, 2005; Martín, 1998; Challis e Hopwood, 2003). O primeiro cluster descoberto foi o responsável pela biossíntese de actinorodina em *S. coelicolor* (Malpartida e Hopwood, 1984), que continha o gene ativador de rota específico *actll-ORF4* (Fernández-Moreno *et al.*, 1991). A tradução de *actll-ORF4* requer a presença de um tRNA de leucina que reconheça o raro códon UUA. Este tRNA é codificado pelo gene *bldA*.

Os promotores em *Streptomyces* são de dois tipos: 1) promotores com – 10 e – 35 boxes, similares aos promotores de *E. coli* reconhecidos pelo fator sigma-70, que são típicos dos genes essenciais e do metabolismo primário, conhecido com “house keeping genes”, e 2) promotores com estruturas diferentes para o quais ainda não foram totalmente elucidados (Strohl, 1992; Bourn e Babb, 1995). O genoma de *Streptomyces* possui uma pletera de fatores sigma e possíveis reguladores de transcrições diferentes que permitem o controle da diferenciação morfológica e fisiológica (Bentley *et al.*, 2002; Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003).

2.8. Regulação da diferenciação morfológica e fisiológica

A diferenciação em *Streptomyces* e sua regulação têm sido extensamente investigadas mediante estudos de mutantes interrompidos em diferentes passos do seu ciclo de vida (Bibb, 1996; Chater, 1993, 2001; Chater e Hopwood, 1993; Kelemen e Buttner, 1998). As mutações se agrupam em duas principais classes: mutantes *bld* (do inglês “bald”) afetados na formação do micélio aéreo e esporulação, e mutantes *whi* (do inglês “white”), que são capazes de desenvolver micélio aéreo, mas não produzem esporos maduros pigmentados (Chater, 2001).

Mutantes *bld* possuem efeitos pleiotrópicos que geralmente impedem a produção de antibióticos, causa irregularidades na repressão catabólica de carbono e na sinalização célula-célula, além de bloquear a diferenciação (Chater, 2001).

Quando cultivados em meio sólido, *Streptomyces* produz metabólitos secundários coordenadamente com a diferenciação morfológica (Challis e Hopwood, 2003). A regulação simultânea da diferenciação morfológica e fisiológica foi descoberta investigando mutantes interrompidos em ambos os processos. Diversos mecanismos de sinalização estão implicados na iniciação da diferenciação, tanto intracelulares como extracelulares (Kelemen e Buttner, 1998; Chater e Horinouchi, 2003).

Igualmente como em espécies de *Bacillus* (Kroos *et al.*, 1999), uma cascata reguladora de genes governa os processos de diferenciação e múltiplos fatores sigma estão implicados na expressão espaço temporal dos genes, por exemplo, o gene *whiG* codifica um fator sigma responsável pela fase inicial da diferenciação (Chater, 2001; Flårdh, 2003). A sequência do genoma de *S. coelicolor* revelou a existência de 65 possíveis fatores sigma (Bentley *et al.*, 2002).

Um dos primeiros genes com efeitos pleiotrópicos que foi caracterizados em *S. coelicolor* foi o *bldA*. Este gene é essencial tanto para a diferenciação morfológica como para a biossíntese de antibióticos (Bibb, 1996; Kelemen e Buttner, 1998) e codifica o tRNA para o códon de leucina UUA. Devido ao alto conteúdo de G+C do DNA de *Streptomyces*, este códon é muito raro e têm sido encontrado somente em genes para metabólitos secundários e, desenvolve a ativação específica para a rota de actinorodina *actII-ORF4* (Fernández-Moreno *et al.*, 1991), cuja tradução depende da presença de tRNA de leucina codificado por *bldA*.

Os genes *bld* e *whi* são responsáveis por codificar várias proteínas regulatórias envolvidas diretamente na morfologia e fisiologia. A maioria desses genes já foram descobertos e tiveram a sua função elucidada em *S. coelicolor*, são eles:

Genes *bld*

- *bldA* – codifica tRNA para o códon de leucina UUA (Campness, 2000).
- *bldB* – codifica uma proteína regulatória (Campness, 2000).
- *bldC* – função desconhecida (Campness, 2000).
- *bldD* – codifica uma proteína regulatória (Elliot e Leskiw, 1999; Elliot *et al.*, 2001).
- *bldG* – provável anti-fator sigma (Bignell *et al.*, 2000)
- *bldH* – função desconhecida (Campness, 2000).
- *bldI* – função desconhecida (Campness, 2000).
- *bldJ* – função desconhecida (Nodwell *et al.*, 1996)
- *bldK* – codifica proteínas envolvidas no transporte de oligopeptídeos (Nodwell *et al.*, 1996; Nodwell e Losick 1998).
- *bldL* – função desconhecida (Nodwell *et al.*, 1999)
- *bldM* – codifica uma proteína de resposta regulatória (igualmente como o gene *whiK*), (Molle e Buttner, 2000).
- *bldN* – codifica um fator sigma de função extracitoplasmática (igualmente como o gene *whiN*), (Bibb *et al.*, 2000).

Os genes *whi* estão classificados em genes iniciais (do inglês “early”), genes tardios (do inglês “late”) e genes indeterminados.

Os genes iniciais são:

- *whiA* – com função desconhecida e muito conservado em bactérias gram-positivas. É essencial para esporulação em *S. coelicolor* A3(2) (Ainsa *et al.*, 2000).
- *whiB* – pequena proteína regulatória com cerca de 76-112 resíduos (peculiar em actinomicetos), (Molle *et al.*, 2000; Chater, 2000)
- *whiG* – fator sigma (homólogo de σ^{FliA} de *E. coli*), (Chater, 2000; Tan *et al.*, 1998).
- *whiH* – proteína regulatória (tal como GntR), (Ryding *et al.*, 1998).
- *whiI* – resposta regulatória anormal (Ainsa *et al.*, 1999).

Os genes tardios são:

- *whiD* – homólogo de *whiB* (Nystrom, 1999).

- *whiE* – codifica enzimas para a síntese da pigmentação dos esporos (Kelemen *et al.*, 1998).

- *whiF* – alelo de *whiG*

- *whiL* – função desconhecida (Ryding *et al.*, 1999).

- *whiM* – função desconhecida (Ryding *et al.*, 1999).

- *whiO* – função desconhecida (Ryding *et al.*, 1999).

Os genes intermediários são:

- *whiK* – codifica uma proteína de resposta regulatória, cuja eliminação por mutação resulta em um fenótipo “bald”, igualmente como o gene *bldM* (Molle e Buttner, 2000).

- *whiN* – codifica um fator sigma com função extracitoplasmática, cuja eliminação por mutação resulta em um fenótipo “bald”, igualmente como o gene *bldN*. *bldN* é transcrito na formação do micélio aéreo (Bibb *et al.*, 2000).

Quando cultivados em meio de cultura submerso, *Streptomyces* geralmente exibe duas formas morfológicas: filamentos e pellets. Estudos demonstraram que filamentos livres se agregam durante o cultivo resultando em uma alta concentração celular e/ou uma alta viscosidade do meio, podendo assim afetar a transferência de calor, nutrientes, oxigênio e a produtividade (Van Suijdan e Metz, 1981).

2.9. Os genes parálogos em *Streptomyces clavuligerus*

Em *Streptomyces clavuligerus* os genes envolvidos na biossíntese do ácido clavulânico e das 5S-clavamas residem em três distintos agrupamentos de genes – chamado em inglês de “gene clusters” – que não estão fisicamente unidos (Tahlan *et al.*, 2004). O agrupamento de genes para a biossíntese do ácido clavulânico está situado imediatamente a jusante do agrupamento de genes para a biossíntese de cefamicina, e juntos eles formam um extenso agrupamento de genes chamado de β -lactâmico supercluster (Aidoo *et al.*, 1994; Hodgson *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1993).

Esse agrupamento de genes codifica enzimas envolvidas no estágio inicial da rota do ácido clavulânico e das 5S-clavamas, como também codifica proteínas do estágio tardio da biossíntese do ácido clavulânico (Jensen *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2004; Li e Townsend, 2000).

Inicialmente foram isoladas duas isoenzimas de clavaminato sintetase (CAS) e seus respectivos genes foram clonados e sequenciados (Marsh *et al.*, 1992). Somente um dos genes, *cas2*, está presente na agrupação de ácido clavulânico (Hodgson *et al.*, 1995; Paradkar e Jensen, 1995). O fenótipo condicional de mutantes interrompidos em genes essenciais para a biossíntese de ácido clavulânico conduz a hipótese de que outros genes deviam existir, que codificam proteínas de função similar (Pérez-Redondo *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 2000).

Uma agrupação de genes parálogos possui os genes *ceas1*, *bls1*, *pah1* e *oat1* (Jensen *et al.*, 2004; Tahlan *et al.*, 2004). Estes genes são expressos diferencialmente dependendo do meio de cultivo, de modo que enquanto a agrupação de genes para ácido clavulânico são expressos em meio SA, os genes parálogos se expressam preferencialmente em meio TSB.

O segundo gene de CAS, chamado *cas1*, foi localizado dentro da chamada agrupação de clavamas, que contém genes específicos de biossínteses de 5s-clavamas, de modo que até o momento foram identificados os genes *cvm1*, *cvm2*, *cvm3*, *cvm4*, *cvm5* e *cvm6* (Mosher *et al.*, 1999). Só se conhece a seqüência destes genes, ainda não foram realizados estudos bioquímicos sobre suas possíveis funções.

2.10. A resposta estrigente

A resposta estrigente é um complexo conjunto de mudanças fisiológicas em resposta a condições de escassez de nutrientes que permitem a sobrevivência da célula com um metabolismo basal. A falta de qualquer aminoácido ou uma mutação que afete qualquer aminoacil-tRNA-sintetase é suficiente para iniciar a resposta estrigente. A principal característica do processo é uma redução massiva na síntese de RNA quando o suprimento de aminoácidos não é suficiente. O sinal que desencadeia toda uma série de eventos é a presença de um tRNA descarregado no sítio A do ribossomo. Vários estudos foram realizados sobre este mecanismo em *E. coli* (Cashel e Rudd, 1987; Chatterji e Ojha, 2001; Magnusson *et al.*, 2005).

Os efeitos da resposta estrigente incluem: 1) inibição do acúmulo de RNA estável, 2) inibição da biossíntese de proteínas ribossomais e fatores de tradução, 3) inibição da replicação de DNA, da biossíntese de ácidos graxos, lipídeos e componentes da parede celular. Em conjunto, a resposta estrigente é um mecanismo bem

coordenado que permite a sobrevivência da célula em condições de falta de nutrientes ou stress, impedindo o crescimento e a síntese de componentes estruturais, e direcionando todos os recursos da célula para sua sobrevivência (Lewin, 2001).

A resposta estrigente causa o acúmulo de dois nucleotídeos incomuns, ppGpp é a guanosina-tetrafosfato, com dois fosfatos ligados às posições 5' e 3', pppGpp é a guanosina-pentafosfato, com um grupo trifosfato 5' e um grupo difosfato 3'. Estes nucleotídeos são pequenas moléculas efetoras típicas que funcionam ligando-se a proteínas-alvo para alterar-lhe as atividades. Às vezes, elas são coletivamente chamadas de (p)ppGpp (Cashel e Rudd, 1987).

A síntese de (p)ppGpp através de ATP e GTP em *E. coli* é realizado por duas enzimas, ppGpp sintetase e ppGpp sintetase/hidrolase (Metzger *et al.*, 1989). A ppGpp sintetase (RelA) catalisa a síntese de ppGpp sob condições de aminoácidos limitado, em associação com ribossomos (Haseltine e Block, 1973). A (p)ppGpp sintetase/hidrolase (SpoT) é uma enzima bifuncional que sintetiza (p)ppGpp sob limitação de carbono de modo independente de ribossomos e também degrada (p)ppGpp, ação dependente de manganês, (p)ppGpp atividade pirofosfohidrolase. (Gentry e Cashel, 1996).

Em actinomicetos, a acumulação de (p)ppGpp após a falta de aminoácidos foi primeiramente demonstrado em *S. hygroscopicus* (Riesenberg *et al.*, 1984). Ochi (1986) concluiu que estes organismos iniciam uma resposta estrigente tanto com a falta de aminoácidos como de glicose como fonte de carbono, com acumulação de pppGpp e de ppGpp e com redução concomitantemente de GTP intracelular (Ochi, 1986).

A redução da síntese de RNA, especialmente desde os promotores de rRNA, é devido a ligação não competitiva à RNA polimerase (RNAPol) de concentrações crescente de ppGpp concernente de GTP ou GDP (Reddy *et al.*, 1995). O sítio de ligação foi localizado na região amino-terminal da subunidade β' - codificada por *rpoC* - e na região carboxi-terminal da subunidade β - codificada por *rpoB* - (Toulokhonov *et al.*, 2001). Artsimovitch *et al.* (2004) tem relatado que o sítio de ligação de ppGpp está localizado próximo do centro ativo da holoenzima RNAPol de *Thermus thermophilus*.

2.11. Proteases e produção de pigmentos

As proteases, também denominadas de proteinases, peptidases ou enzimas proteolíticas, são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácidos das proteínas. O processo é chamado de clivagem proteolítica, podendo inclusive ser um mecanismo de ativação ou inativação de enzimas. As proteases são encontradas em todos os sistemas biológicos, de vírus a vertebrados e compreendem aproximadamente 2% dos genes expressos (Sajid e Mackerrow, 2002).

Várias espécies do gênero *Streptomyces* produzem moléculas bioativas, incluindo enzimas com valores comerciais como lipases, celulasas e proteases (Piepersberg, 1994). Essa última classe de proteínas tem sido aplicada em produtos farmacêuticos, detergentes e na indústria de alimentos, como também em práticas laboratoriais (Etok e Eka, 1996).

Muitas das proteínas extracelulares obtidas pelo gênero *Streptomyces* têm sido caracterizadas como metalo e serina proteases (Kitadokoro *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 1995; Kim e Lee, 1996). Provavelmente estas proteínas estão envolvidas na nutrição, degradação do micélio aéreo e no processo de esporulação. Em adição, algumas espécies do grupo actinomicetos possuem a capacidade de sintetizar e excretar pigmentos escuros, melanina ou pigmentos melanóides, que são considerados como um importante critério em estudos taxonômicos (Arai e Mikami, 1972; Williams *et al.*, 1983). Além do mais, a caracterização de compostos secretados por actinomicetos podem ser úteis em muitos campos biotecnológicos.

2.12. Atividade lipolítica e o metabolismo dos açúcares

Lipídeos e óleos são considerados componentes essenciais na indústria de antibióticos porque possuem propriedades aintiespumante, são uma fonte de carbono barata quando comparado com carboidratos e podem aumentar a taxa de metabolismo secundário. Pan *et al.*(1959) foram os primeiros a relatar que o uso de óleo como suplemento da fonte de carbono em cultivos de *Penicillium chrysogenum* aumenta a produção de penicilina quando comparado com carboidrato como única fonte de carbono. Mais recentemente, o aumento da biossíntese de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* usando óleo de soja foi comprovado por Ortiz *et al.*(2007).

Lipases (triacilglicerol acidolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres de gliceróis na interface lipídio/água. A atividade das lipases é promovida por efeito indutivo, pela presença de óleos.

Lipídeos correspondem a ésteres de glicerol e ácidos graxos. Os microrganismos utilizam os lipídeos somente após a hidrólise da ligação éster, reação realizada pela lipase e, como resultado final, há a produção de glicerol e ácidos graxos livres. Os ácidos graxos são oxidados por meio de um processo denominado β -oxidação, em que há a clivagem sucessiva de dois carbonos do ácido graxo. Primeiramente, aos ácidos graxos são ativados pela coenzima A; a oxidação resulta na liberação de acetil-CoA e na formação de um ácido graxo com dois carbonos a menos. O processo de β -oxidação é em seguida repetido promovendo a liberação de outra molécula de acetil-CoA. Nesse processo, ocorrem duas reações distintas de desidrogenação. Na primeira reação, os elétrons são transferidos para a flavina-adenina dinucleotídeo (FAD), enquanto a segunda, estes são transferidos ao NAD^+ (Berk, 1996).

A maioria dos ácidos graxos possui um número par de átomos de carbono e, quando oxidados completamente, geram apenas acetil-CoA. Esse acetil-CoA formado é oxidado por intermédio do ciclo do ácido cítrico ou é convertido à hexose e a outros componentes celulares por meio do ciclo do glioxilato (Brock *et al.*, 1994).

Em *Streptomyces clavuligerus* a atividade lipolítica foi detectada quando o meio de cultura continha óleo complementando a fonte de carbono, sendo assim, a atividade lipolítica em *S. clavuligerus* é induzida pela presença de óleo no meio (Large *et al.*, 1999).

O interesse em lipases tem sido marcadamente aumentado devido a sua potencial aplicação na indústria (Lotrakul e Dharmstithi, 1997). E em particular, muitos trabalhos têm sido realizados na produção de lipases para sua utilização em indústrias de detergentes e alimentos (Tamerler e Keshavarz, 2000). Essas enzimas também têm sido estudadas em animais, plantas e microrganismos (Odibo *et al.*, 1995). São enzimas específicas de considerável significância fisiológica e potencial industrial.

Para o metabolismo de açúcares, as bactérias apresentam componentes enzimáticos fixos, denominados de enzimas constitutivas, direcionadas ao metabolismo da glicose. No entanto, os microrganismos bacterianos exibem habilidades enzimáticas latentes para utilizar uma grande variedade de outros açúcares como a sacarose, maltose, lactose, frutose e álcoois-açúcares como sorbitol, manitol e glicerol. No

entanto, essas enzimas são sintetizadas apenas quando estes açúcares estão presentes, sendo denominadas de enzimas indutíveis (Wen *et al.*, 2001).

Se um microrganismo é submetido em meio de cultivo contendo dois açúcares em altas concentrações, inicialmente, apenas o açúcar para o qual há enzimas constitutivas, será utilizado. Esse tipo de regulação denomina-se repressão catabólica e relaciona-se, intimamente, com as concentrações dos carboidratos (Cote e Honeyman, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Estudar características bioquímicas e morfológicas de mutantes já obtidos por mutagênese com luz UV e mutagênese química com metil metano sulfonato.

3.2. Objetivos específicos

- Verificar as características morfológicas gerais em meio sólido (Meio ISP2) dos mutantes e comparar com as características da linhagem selvagem ATCC 27064.

- Verificar as características morfológicas específicas em meio sólido como hifas e esporóforos através de três métodos: inoculação cruzada em placa de petri, cultivo em bloco de ágar colocado em lamínula e cultivo em placas de ágar com lamínula inclinada.

- Verificar a produção de pigmentos hidrossolúveis e lipossolúveis.

- Verificar as classes morfológicas em meio líquido (formação de filamentos livres, ramificados, filamentos agrupados (clump) e pellets).

- Comparar o crescimento e produção de AC utilizando os meios GSPG, GSPA e GSPO em mesa incubadora rotativa dos mutantes em relação à linhagem selvagem.

- Avaliar o consumo de aminoácidos como fonte de carbono e nitrogênio (ácido glutâmico, asparagina, lisina, ornitina, histidina, arginina e prolina) em meio mínimo sólido.

- Avaliar o consumo de aminoácidos como fonte de carbono e nitrogênio (arginina, ornitina, lisina, ácido glutâmico e prolina) em meio mínimo líquido.

- Estudar a atividade da enzima lipase.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens bacterianas

Utilizou-se como linhagem padrão *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. As linhagens mutantes estudadas foram: AC13a, AC17a, AC 116, MMS 150 e MMS 54, sendo que as linhagens AC13a, AC17a e AC116 foram submetidas à mutação física por UV e as linhagens MMS 150 e MMS 54 foram mutadas quimicamente por MMS.

4.2. Meios de cultura

Meio de Reativação da Cultura Estoque (MR) utilizado para a reativação da cultura estoque (Rosa, 2002).

Tampão MOPS	21 g
Glicerol	15 g
Peptona bacteriológica	10 g
Extrato de malte	10 g
Extrato de levedura	1 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75 g
Água destilada	1000 mL
Solução de sais	1 mL
pH ajustado em 6,8	

Solução de sais para 1 Litro

MnCl ₂ .4H ₂ O	1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 g

Meio de Cultura Mínimo utilizado para o estudo dos aminoácidos como fonte de carbono, modificado com a adição de MOPS (Aharonowitz *et al.*, 1977)

MgSO ₄	0,06%
K ₂ HPO ₄	0,35%
Ágar	20 g
MOPS	21 g
Solução de sais	1 mL

Solução de sais para 100 mL

FeSO ₄ . 7H ₂ O	100 mg
MnCl ₂ . 4H ₂ O	100 mg
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	100 mg
CaCl ₂	100 mg

Meio semi-sintético GSPG utilizado para o estudo da produção de AC (Romero *et al.*, 1986).

Glicerol	15 g
Sacarose	20 g
Prolina	2,5 g
Ácido glutâmico	1,5 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
CaCl ₂	0,4 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,1 g
ZnCl ₂	0,05 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
MOPS	21 g
Água destila	1000 mL
pH ajustado em 7	

Meio semi-sintético GSPO utilizado para o estudo da produção de AC (Romero *et al.*, 1986).

Glicerol	15 g
Sacarose	20 g
Prolina	2,5 g
Ornitina	1,5 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
CaCl ₂	0,4 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,1 g
ZnCl ₂	0,05 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
MOPS	21 g
Água destila	1000 mL
pH ajustado em 7	

Meio semi-sintético GSPA utilizado para o estudo da produção de AC (Romero *et al.*, 1986).

Glicerol	15 g
Sacarose	20 g
Prolina	2,5 g
Arginina	1,5 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
CaCl ₂	0,4 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,1 g
ZnCl ₂	0,05 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g

MOPS	21 g
Água destila	1000 mL
pH ajustado em 7	

Meio de cultura Soytone utilizado para a produção de AC (Lavarda, 2003).

Glicerol	15 g
Extrato de malte	10 g
Extrato de levedura	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75 g
K ₂ HPO ₄	0,8 g
Soytone	15 g
MOPS	21 g
Solução de sais	1mL
Água destilada	1000 mL
pH ajustado em 6,8	

Solução de sais para 1 Litro

MnCl ₂ .4H ₂ O	1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 g

Meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal utilizado para o estudo da produção de AC (Maranesi *et al.*, 2005).

Farinha de soja	20 g
Glicerol	10 g
K ₂ HPO ₄	1,2 g
Óleo de soja	23 g
MOPS	21 g
Solução de sais	10 mL
Água destilada	1000 mL

pH ajustado em 6,8

Solução de sais para 1 Litro

MnCl ₂ .4H ₂ O	1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 g

Meio de produção de cefamicina C utilizado para o bioensaio qualitativo para cefamicina C (Aharonowitz *et al.*, 1978).

Maltose	10 g
L-Asparagina	2 g
K ₂ HPO ₄	3,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,23 g
MOPS	21 g
CaCl ₂	0,001 g
Solução de sais	1mL
Água destilada	1000 mL
pH ajustado em 6,8	

Solução de sais para 1 Litro

MnCl ₂ .4H ₂ O	1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 g

Meio Peptone – yeast extract iron ágar utilizado para detectar pigmentos melanóides (Petinate *et al.*, 1999).

Bacto – Peptone Iron Agar	36 g
Bacto – Yeast Extract	1 g
Água destilada	1000 mL
pH ajustado entre 7,0 – 7,2	

Meio Tirosina ágar utilizado para detectar pigmentos melanóides (Petinate *et al.*, 1999).

Glicerol	15 g
L-tirosina	0,5 g
L-asparagina	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Bacto – Agar	20 g
Água destilada	1000 mL
pH ajustado entre 7,2 – 7,4	

Solução de sais para 100 mL

FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g

Meio Gly Pep utilizado para detectar atividade proteolítica extracelular (Petinate *et al.*, 1999).

Glicerol	2 g
Peptona	0,45 g
KCl	0,03 g
MgSO ₄	0,05 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
Ágar	5 g
Gelatina	1 g
Água destilada	100 mL

solução de sais para 100 mL

CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0001 g
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,0001 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0001 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0001 g

Meio BHI – Brain Heart Infusion utilizado para detectar atividade proteolítica extracelular (Petinate *et al.*, 1999).

Brain Heart Infusion	3 g
Agar	5 g
Gelatina	1 g
Água destilada	100 mL

4.3. Condições de cultura e manutenção

Para a repicagem, manutenção e estudos morfológicos das linhagens utilizou-se o meio de cultura sólido ISP2, que favorece o crescimento, a esporulação e consequentemente a caracterização morfológica das linhagens.

Para os estudos em mesa incubadora rotativa as linhagens foram armazenadas em criotubos a uma temperatura de – 70°C, tendo como solução crioprotetora glicerol na concentração de 10%.

4.4. Esterilização de equipamentos e materiais

Todos os equipamentos, meios de cultura e vidrarias foram esterilizados em autoclave vertical por 15 minutos a 121°C a 1 atm de pressão. A incidência de luz ultravioleta por 20 minutos em capela de fluxo laminar e o uso do álcool à 70% foram utilizados no processo de assepsia.

4.5. Cultivos em mesa incubadora rotativa

Os cultivos em batelada para a produção de AC por *S. clavuligerus* foram realizados em mesa incubadora rotativa modelo G25, da New Brunswick Scientific Co. Os ensaios foram realizados em três etapas: reativação, crescimento do microrganismo e produção.

Na etapa de reativação 3,5 ml de suspensão de células vegetativas de *S. clavuligerus* mantidos em criotubos foram inoculados em Erlenmeyer de 500ml contendo 50ml de meio de reativação e estes incubados por 24 horas a 28°C e 250rpm.

Na etapa de crescimento (Etapa 2, figura 4.1) 5mL de suspensão foram transferidos para Erlenmeyers de 500mL contendo 45mL de meio de cultura de inóculo, de mesma composição do meio de cultura principal. Esta etapa teve duração de 24 horas e foi realizada a 28°C e 250rpm.

Na etapa de produção, foi transferido o volume da suspensão de inóculo para erlenmeyers contendo o meio de produção, dando início à etapa principal do processo de produção de AC (Figura 4.1).

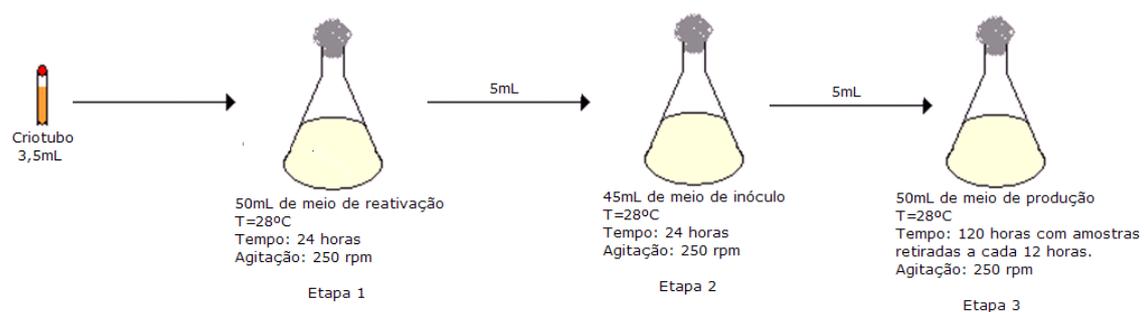


Figura 4.1. Procedimento dos cultivos em mesa incubadora rotativa.

4.6. Caracterização morfológica

4.6.1. Caracterização morfológica em meio de cultura sólido

Para o estudo das características morfológicas, foram feitos cultivos em placas de Petri utilizando o meio de cultura sólido ISP2. Foram analisadas características

como: morfologia das colônias; formação de hifas, ramificações e micélios aéreos; crescimento do micélio no substrato e formação de esporos.

As imagens obtidas pelo sistema de inoculação cruzada, bloco de ágar e lamínula inclinada foram adquiridas através de um microscópio Olympus BX 50, com uma câmera acoplada utilizando o programa Image Pro-Plus. Todas as fotos foram registradas com um aumento de 400 vezes.

4.6.2. Caracterização morfológica pela técnica de esgotamento por estrias

Para o estudo das características morfológicas das colônias em meio sólido foram feitos inóculos da linhagem selvagem e das linhagens mutantes pela técnica de esgotamento por estrias, onde com o auxílio de uma alça de platina, esgota-se o material por meio de estrias na superfície do meio. Na etapa 1 após esterelizar a alça de platina no bico de Bunsen, é realizado o inóculo da cultura em forma de estrias, preenchendo cerca de $\frac{1}{4}$ da placa. Na etapa 2, após esterelizar novamente a alça, novos movimentos formando estrias serão realizados, sendo que esse movimento irá espalhar parte do primeiro inóculo, formando um ângulo de 90 graus em relação ao primeiro inóculo. Na etapa 3 é repetido o mesmo procedimento da etapa 2, sendo que dessa vez as novas estrias serão feitas sobre parte das estrias da etapa 2, e assim sucessivamente. Após a etapa 4, toda a placa já foi preenchida e após a incubação por cerca de 12 dias a 28°C , são adquiridas colônias isoladas (Figura 4.2).

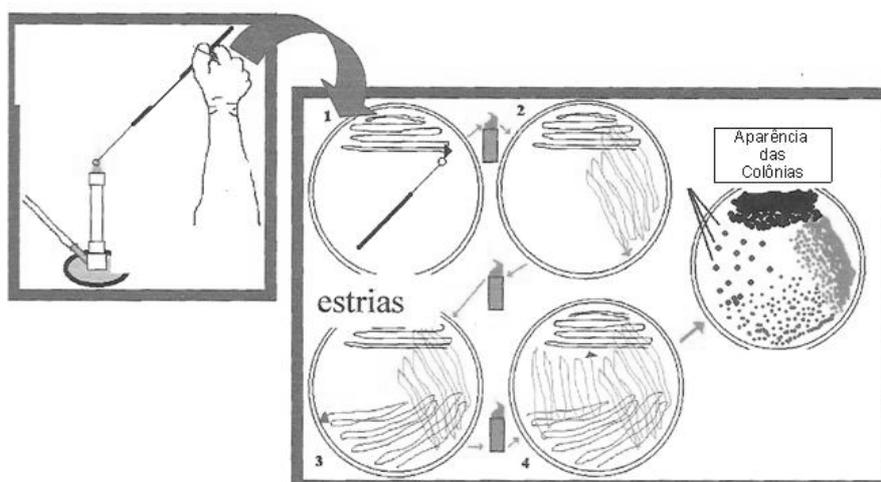


Figura 4.2. Técnica de esgotamento por estrias.

4.6.3. Caracterização morfológica pela técnica de inoculação cruzada

A inoculação cruzada foi feita com o auxílio da alça de platina sobre o meio de cultura, onde foi possível fazer inóculos com estrias se cruzando e após o crescimento do microrganismo por cerca de 15 dias à 28°C, as regiões de cruzamento onde formam ângulos de 90 graus são os melhores locais para a observação de hifas aéreas e esporos maduros (Goodfellow, 1994). A Figura 4.3 permite visualizar o procedimento de como é feita à inoculação e os locais estratégicos para a observação estão assinalados pelas setas.

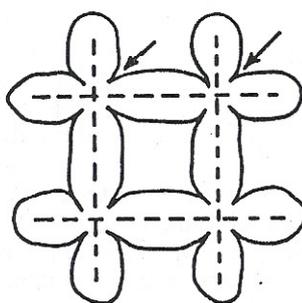


Figura 4.3. Inoculação cruzada.

4.6.4. Caracterização morfológica pela técnica de inoculação em bloco de ágar

No sistema bloco de ágar, o inóculo foi feito em blocos do meio sólido ISP2 sob uma lamínula e sobre um filtro umedecido com água glicerinada para evitar o ressecamento do ágar (Figura 4.4), permitindo assim, após o crescimento por cerca de 15 dias em incubadora com temperatura controlada à 28°C, a visualização de micélios aéreos que crescem livremente pelas laterais do bloco de ágar e do micélio que cresce no substrato.

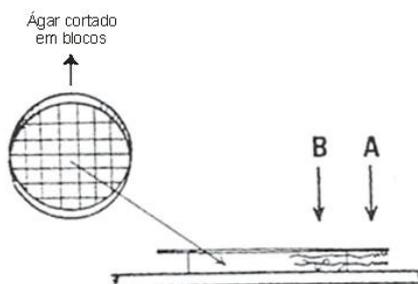


Figura 4.4. Inoculação em bloco de ágar. A região (A) permite a visualização do micélio aéreo após o crescimento, enquanto a região (B) permite a visualização do micélio que cresce dentro do ágar.

4.6.5. Caracterização morfológica pela técnica de inoculação em lamínula inclinada

No sistema de lamínula inclinada, com auxílio da alça de platina foram feitos inóculos retilíneos sobre o meio de cultura sólido ISP2. Após o inóculo, lamínulas foram colocadas inclinadas formando um ângulo de 45 graus em relação ao meio e as placas foram incubadas por 15 dias à 28°C (Figura 4.5), permitindo assim, que parte do crescimento permaneça sobre as lamínulas. Antes da observação no microscópio, as lamínulas foram colocadas sobre lâminas contendo o agente umidificador Cotton Blue.

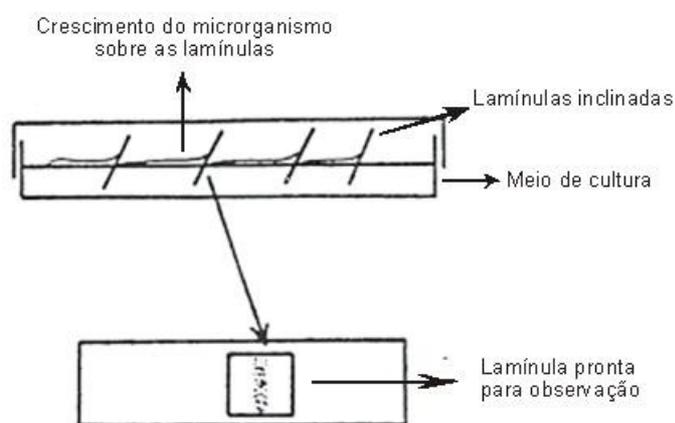


Figura 4.5. Inoculação com lamínula inclinada.

4.6.6. Caracterização morfológica em meio de cultura líquido

Para o estudo morfológico em meio líquido foram utilizados os mesmos equipamentos usados nos estudos em meio sólido, sendo que o aumento utilizado para registrar as fotos foi de 40 vezes (Yang *et al.*, 1995), e o meio de cultura utilizado foi o GSPG (Romero *et al.*, 1986).

A linhagem mutante escolhida foi a MMS 150 juntamente com a selvagem, que após um cultivo de 120 horas, amostras coletadas a cada 12 horas foram diluídas entre 5 a 50 vezes em água destilada. Uma alíquota de 20µL da amostra diluída foi pipetada sobre uma lâmina de vidro, secada e fixada sobre o bico de Bunsen, e corada com o azul de metileno (0,3 g de azul de metileno, 30 mL de álcool etílico 95% em 100 mL de água destilada), (Yang *et al.*, 1996).

De cada amostra foram feitas 5 lâminas e de cada lâmina foram obtidas entre 3 a 6 fotos. As imagens foram fotografadas com um aumento de 40 vezes (Yang *et al.*, 1995) usando o microscópio Olympus BX 50 com uma câmera acoplada utilizando o programa Image Pro-Plus. As imagens foram capturadas e registradas no formato de imagens binárias na escala de cinza. As imagens foram classificadas como filamentos livres ramificados, filamentos emaranhados (clumps) e pellets, de acordo com a aglomeração das hifas observadas (Figura 4.6).

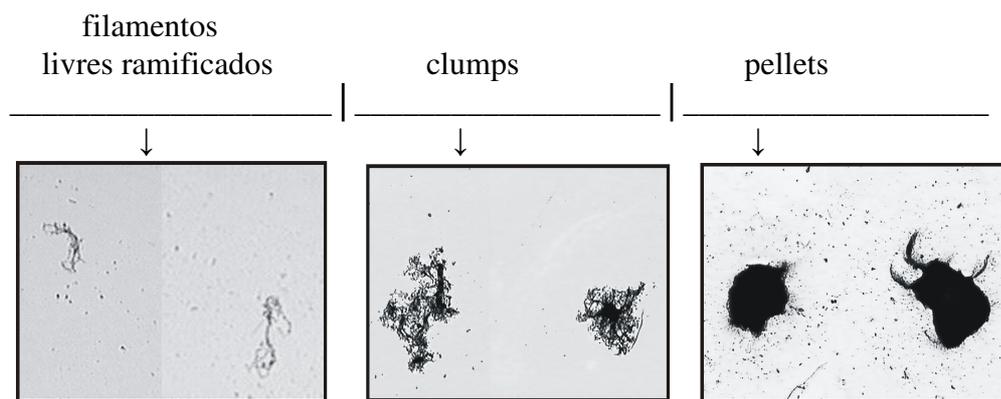


Figura 4.6. Classificação morfológica em meio de cultura líquido. Filamentos livres ramificados, clumps e pellets.

4.7. Caracterização bioquímica

4.7.1. Produção de pigmentos

Para detectar a produção de pigmentos hidrossolúveis, foi retirado um fragmento da linhagem do meio de cultura contendo ágar e colocado em água destilada. Após alguns minutos de agitação manual, observou-se se havia ocorrido alguma mudança na coloração da água.

Para detectar especificamente pigmentos melanoides foram usados os meios de cultura Peptone (Yeast Extract Iron Agar) e Tyrosine agar (Petinate *et al.*, 1999). As linhagens foram inoculadas diretamente aos meios com o auxílio da alça de platina e incubadas por cerca de 15 dias com temperatura controlada a 28°C.

4.7.2. Atividade proteolítica

Para detectar a atividade proteolítica extracelular foram usados os meios Gly Pep e BHI (Petinate *et al.*, 1999). Estes meios também podem induzir a produção de pigmentos. Foram preparados dois meios BHI, um com gelatina e outro com soro de albumina bovina. Após o preparo e a solidificação dos meios as linhagens foram inoculadas em placas de Petri com o auxílio da alça de platina e incubadas a 28°C por cerca de 15 dias.

4.7.3. Bioensaio qualitativo para AC

Para o bioensaio foi utilizada a bactéria teste *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665. Foi utilizado também o meio de cultura ágar nutriente (g/L: peptona 5,0; extrato de carne 3,0; ágar bacteriológico 20,0; pH 6,8) juntamente com 50 mg de amoxicilina por litro de Ágar (Romero *et al.*, 1988).

A bactéria teste *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 foi utilizada na forma de suspensão bacteriológica na concentração de 1mL (DO = 1,0 a 600 nm) por litro de ágar nutriente. A bactéria cresceu em slante com 10mL de ágar nutriente por cerca de 12 a 18 horas na temperatura de 37°C. Em Erlenmeyers contendo 100 mL de ágar nutriente a uma temperatura de 45°C foi adicionada a solução de amoxicilina e 1mL da suspensão de bactérias (Lavarda, 2003).

A mistura de meio, células e amoxicilina foi vertida sobre placas de Petri (90 mm de diâmetro) e após a solidificação da mesma, o ágar foi perfurado com um tubo de aço esterelizado para formar poços de 4 mm de diâmetro. Placas de petri incubadas por 15 dias a 28 °C, cada uma contendo as linhagens mutantes UV13a, UV17a, UV 116, MMS 150, MMS 54 e a linhagem selvagem *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 foram usadas para retirar amostras de 4mm de diâmetros para preencher os furos nas placas contendo a bactéria teste. As culturas foram incubadas a 37°C por 8 a 10 horas.

4.7.4. Bioensaio com extração em meio de cultura sólido

Para o bioensaio com extração em meio sólido, o procedimento com a bactéria teste foi o mesmo realizado com o bioensaio qualitativo para AC. As modificações foram que as linhagens mutantes AC 13a, AC 17a, AC 116, MMS150, MMS 54 e a linhagem selvagem *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 foram inoculadas em placas de petri com 140 mm de diâmetro, contendo o meio de cultura sólido ISP2 e incubadas por 15 dias a 28°C. Após este período três extrações consecutivas foram feitas em cada placa, sendo que a cada extração 10ml de metanol era inoculado em cada placa por 15 minutos, um bastão de vidro foi utilizado para a raspagem nas placas. O solvente orgânico metanol foi escolhido devido sua boa polaridade e sua alta volatilidade. Após as três extrações, as soluções foram levadas para o SpeedVac para obtenção do extrato seco e concentrado, e, em seguida suspensas com água ultra pura (Milli Q).

4.7.5. Bioensaio qualitativo para Cefamicina C

Para a realização deste bioensaio utilizou-se a bactéria *Escherichia coli* ESS 3035, que foi utilizada na forma de suspensão bacteriológica na concentração de 1mL (DO = 1,0 a 600 nm) por litro de ágar nutriente.

A bactéria foi cultivada no meio de cultura ágar nutriente por 24 horas a 37°C. Para suspender os microrganismos utilizados no bioensaio, adicionou-se 10 mL de solução salina na concentração de 0,9%. A DO da suspensão resultante foi lida a 600 nm em espectrofotômetro.

A suspensão obtida foi misturada ao meio ágar nutriente de tal forma que 1 mL da solução com DO₆₀₀ igual a 1 foi adicionado em Erlenmeyers com 100 mL de ágar. Nesta parte do procedimento, tomou-se o cuidado de controlar a temperatura do ágar de tal forma que ele não seja muito quente para matar o microrganismo e ao mesmo tempo não tão frio a ponto de solidificar. Após a homogeneização, alíquotas de 20 mL de ágar foram despejadas em cada placa de Petri com 140 mm de diâmetro.

Após solidificação do meio, poços de 4 mm de diâmetro foram feitos (cerca de 8 por placa), nos quais foram adicionados 20 µL das amostras. As placas foram incubadas a 37°C por cerca de 8 a 24 horas para análises posteriores.

4.7.6. Cromatografia em camada delgada

As amostras obtidas pela técnica de extração em meio sólido também foram utilizadas no teste para detectar a presença do antibiótico cefamicina C nas linhagens mutantes e na linhagem selvagem, usando a técnica da cromatografia em camada delgada. As extrações foram suspensas com metanol e inoculadas em placas de sílicas em pontos marcados. Nas placas também foi inoculada a cefalosporina C (cerca de 5 gramas dissolvida em 10mL de água) que foi usada como padrão por ser um composto com uma fórmula estrutural similar a cefamicina C, sendo que esse último não possui um padrão específico. As placas foram colocadas em uma cuba onde a fase eluente na quantidade de 20 mL era formada por EtOH/AAc/NaOH na proporção de 6:3:1, respectivamente. As marcações tracejadas foram feitas sob a luz com comprimento de onda de 254nm e em seguida o revelador ninhidrina foi aplicado. As placas foram então secadas numa estufa de 100°C por 5 minutos e observadas sob a luz com comprimento de onda de 365nm.

4.7.7. Ensaio em meio de cultura mínimo sólido

Para o teste em meio de cultura mínimo, foi utilizado o meio mínimo basal proposto por Aharonowitz *et al.* (1977), modificado com a adição de ágar e enriquecido com aminoácidos separadamente. Os aminoácidos utilizados na concentração de 1mM foram: Histidina, Ácido glutâmico, Prolina, Ornitina, Arginina, Asparagina e Lisina. O meio de cultura mínimo foi preparado e autoclavado e antes da sua solidificação com sua temperatura por volta de 40°C os aminoácidos foram adicionados separadamente através de uma filtração, utilizando filtros millipore 22µm de diâmetro para sua esterilização, evitando assim sua degradação em altas temperaturas. Para a inoculação nas placas foram utilizados palitos estéreis, transferindo assim as linhagens em locais pontuais.

4.7.8. Ensaio em meio de cultura mínimo líquido

Um segundo ensaio foi realizado com o meio mínimo proposto por Aharonowitz *et al.* (1977), dessa vez no estado líquido e seguindo a mesma concentração de 1 mM para cada aminoácido a ser estudado. A duração desse ensaio realizado em mesa incubadora rotativa foi de 120 horas com amostras retiradas a cada 12 horas. Foram determinados a partir de amostras do caldo fermentativo as seguintes variáveis: concentração de ácido clavulânico, massa seca e a quantificação dos aminoácidos utilizados que foram: ácido glutâmico, prolina, arginina, lisina e ornitina.

4.7.9. Cultivo em mesa incubadora rotativa pelo método alimentação com pulso

A linhagem estudada por esse método foi à mutante MMS 150 juntamente com a linhagem selvagem para comparação utilizando o meio de cultura complexo proposto por Maranesi *et al.* (2005). O cultivo com 120 horas de duração foi alimentado com glicerol em dois momentos, as 36 e 72 horas. Os Erlenmeyers foram abertos em câmara de fluxo laminar e alimentados com 5 ml de solução de glicerol esterilizada à concentração de 10g/L⁻¹. A cada 12 horas foram coletadas amostras para estudos posteriores.

4.7.10. Atividade da enzima lipase

O meio de cultura complexo proposto por Maranesi *et al.* (2005) foi utilizado nesses ensaios. Foram realizados dois ensaios em duplicata, no primeiro com 80 horas de duração, uma única amostra foi retirada ao final do cultivo e estocada em três temperaturas; 4°C, -20°C e -80°C. Posteriormente foi dosada a atividade lipolítica do extrato (meio de cultura centrifugado) e do pellet. Também foram realizados estudos quantitativos das proteínas totais e AC. Antes de estudar a atividade enzimática no pellet foi realizado o rompimento das células utilizando um sonicador da marca Sonics Vibra Cell, por 2 x 10 minutos em um recipiente com gelo (Large *et al.*, 1999).

No segundo ensaio de 120 horas de duração, foi utilizado o meio de cultura complexo proposto por Maranesi e um segundo meio modificado sem adição de

glicerol. O cultivo foi realizado em um único Erlenmeyer de 500 ml contendo 100 ml do caldo, e amostras de 2ml foram coletadas a cada 12 horas. Ao final foi estudada a atividade lipolítica do extrato, proteínas totais, ácido clavulânico, atividade específica da lipase e biomassa, onde, nesse último estudo foram realizadas três lavagens devido à complexidade do meio de cultura.

4.8. Métodos Analíticos

4.8.1. Determinação da concentração celular

Foi realizada pelo método tradicional da massa seca, onde as amostras foram centrifugadas em tubos Falcon e o “pellet” foi então lavado duas vezes com água destilada e colocado em formas previamente pesadas. As formas foram deixadas em estufa a 65°C até peso constante.

4.8.2. Determinação da Concentração de Glicerol

O glicerol constitui o substrato limitante na produção de AC tanto nos bioprocessos em batelada como em batelada alimentada (Chen *et al.*, 2003), portanto se faz necessária a determinação da concentração do mesmo durante a produção de AC. Nos experimentos realizados o glicerol foi quantificado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), empregando-se coluna Shodex KS-801 e como eluente água destilada desionizada.

4.8.3. Determinação da Concentração de Ácido Clavulânico

A concentração de AC foi determinada por HPLC pelo método de Foulstone e Reading (1982). Para a realização da análise cromatográfica utilizou-se coluna C-18 μ -Bondapack, tendo uma mistura de tampão fosfato e metanol como fase móvel. A vazão utilizada para estes procedimentos foi de 2,5 mL/min⁻¹. A temperatura de análise foi mantida em 28°C e o comprimento de onda utilizado foi de 311 nm. Uma curva de

calibração foi previamente preparada a partir de uma mistura de amoxicilina e clavulanato de potássio contido no medicamento Clavulin 250 mg da Smith Kline-Beecham do Brasil Ltda.

4.8.4. Atividade lipolítica

A atividade da enzima lipase foi medida com um ensaio espectrofotométrico a 37°C, com para-nitrofenilpalmitato (pNPP) como substrato, de acordo com a técnica descrita por Gupta *et al.*(2002).

4.8.5. Determinação de proteínas totais

Foi utilizado o método de Bradford (1976). É uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (Compton *et al.*, 1985).

4.8.6. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas para a comparação dos resultados das amostras da análise de lipase foi utilizado o programa XLSTAT versão 5.2, onde foram aplicados o teste *t* de “Student” e o teste exato de Fisher.

4.8.7. Análise de aminoácidos

Foi utilizado o TCA (ácido tricloro acético) para a desproteinização das amostras (Henrikson *et al.*, 1984). Os seguintes passos foram realizados:

- Mistura na proporção de 1:1 da amostra e solução de ácido tricloro acético 2 M.
- Centrifugação da amostra à temperatura de 4°C com frequência de rotação de 10.000 rpm durante 10 minutos.
- Retirada do sobrenadante e filtragem com filtros de 0,45 µm para análise de aminoácidos.

Para a análise dos aminoácidos foi utilizado o protocolo descrito pelo fabricante (Waters Co.), compreende a derivatização com o PITC (*phenylisothiocyanate*) e a separação dos produtos por meio da HPLC.

Para a derivatização dos aminoácidos foram realizados os seguintes passos:

- Secagem da amostra com ar (ca. de 20 µl).
- Reidratação com 10 µl de solução de etanol:água:triethylamine na proporção de 2:2:1 respectivamente.
- Agitação com vortex.
- Secagem da solução resultante.
- Adição de 20 µl de solução de derivatização composto por etanol:água:triethylamine:PITC na proporção de 7:1:1:1 respectivamente.
- Agitação com vortex.
- Reação durante 20 minutos.
- Secagem com ar.
- Adição de 500 µl de tampão diluente.

Tampões, fase estacionária e fases móveis.

Tampão diluente

Para o preparo do tampão diluente foi realizado o seguinte procedimento:

- Pesagem de 710 mg de fosfato monoácido de sódio (Na_2HPO_4).
- Adição de 1 litro de água Milli-Q.
- Ajuste do pH em 7,0 com solução 10% de ácido fosfórico (H_3PO_4).
- Adição de 50 mL de acetonitrila em 950 ml da solução preparada.

Fase móvel A

Para o preparo da fase móvel A foi realizado o seguinte procedimento:

- Pesagem de 19 g de acetato de sódio trihidratado ($\text{NaCH}_3\text{COO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$).
- Adição de 1 litro de água.
- Adição de 0,5 mL de triethylamine.
- Adição de 0,2 mL de EDTA $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.000 ppm).

- Ajuste do pH para 6,4 com solução de ácido acético.
- Filtragem do eluente com filtro de 0,45 μm .
- Mistura de 940 mL da solução filtrada com 60 ml de acetonitrila.
- Sonificação da solução em vácuo por 20 segundos.

Fase móvel B

Para o preparo da fase móvel B foi adotado o seguinte procedimento:

- Mistura de 600 mL de acetonitrila em 400 mL de água Milli-Q.
- Adição de 0,2 mL de solução de EDTA 1 g/L^{-1} .
- Sonificação sob vácuo por 20 segundos.

Fase estacionária

Para separar os compostos foi utilizada a coluna pico-tag de 300 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro.

Condições cromatográficas:

Para a separação dos compostos foi utilizado um sistema cromatográfico Waters Co. composto por:

- Sistema de bombeamento (2 Bombas HPLC W515).
- Injetor automático com refrigeração (W717).
- Módulo de controle de temperatura da Waters Co.
- Detector de UV (W486).

Condições de operação dos equipamentos:

Temperatura do injetor: 4°C.

Temperatura de separação: 36°C.

Detecção dos compostos: $\lambda=254$ nm.

Operação do sistema de bombeamento: gradiente de acordo com a Tabela abaixo.

Tabela 4.1. Gradiente utilizado para separar os compostos derivatizados e determinar a concentração dos aminoácidos.

Tempo (min.)	Vazão (mL.min ⁻¹)	%A	%B	Número da curva*
0	1,0	100	0	*
3	1,0	100	0	6
20	1,0	93	7	6
26	1,0	42	58	6
26,5	1,0	54	46	6
27	1,0	0	100	6
30	1,0	0	100	6
35	1,5	0	100	6
43	1,5	100	0	6
45	1,0	100	0	6

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características morfológicas

5.1.2. Características morfológicas das linhagens após os cultivos em placas de Petri

Foram observadas características fenotípicas que permitiram diferenciar as linhagens mutantes obtidas por tratamento com luz UV e também por aplicação do mutagênico químico MMS na linhagem selvagem. Os mutantes são agrupados em duas principais classes: *bld* mutantes (do inglês “bald” calvo), que não formam micélio aéreo e esporos; e *whi* mutantes, (do inglês “white” branco), que formam micélio aéreo mas seus esporos maduros não possuem pigmentação (Chater, 2001). Os mutantes que apresentaram maiores diferenças na coloração das colônias foram o AC116, o MMS 150 e o MMS 54, possuindo ausência de pigmentação, sendo classificados então como *whi* mutantes (Figura 5.1). A tabela 5.1 descreve os resultados obtidos.

Tabela 5.1. Características fenotípicas de mutantes obtidos por tratamento com luz UV e MMS a partir de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064.

Cepas	Caraterísticas da colônia.	Cor do reverso da colônia.	Formação de micélio aéreo
<i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064	Cor verde acinzentada escura, anéis concêntricos regulares de cor cinza.	Bege escuro	Sim
Mutante AC116	Cor branca e anéis concêntricos de cor branca.	Bege claro	Sim
Mutante AC13a	Cor verde acinzentada escura, anéis concêntricos de cor cinza claro.	Bege escuro	Sim
Mutante AC17a	Cor verde acinzentada escura, anéis concêntricos regulares de cor verde acinzentado.	Bege escuro	Sim
Mutante MMS 150	Cor branca com anéis concêntricos de cor verde acinzentado claro.	Bege claro	Sim
Mutante MMS 54	Cor da colônia branca com anéis concêntricos brancos.	Bege claro	Sim

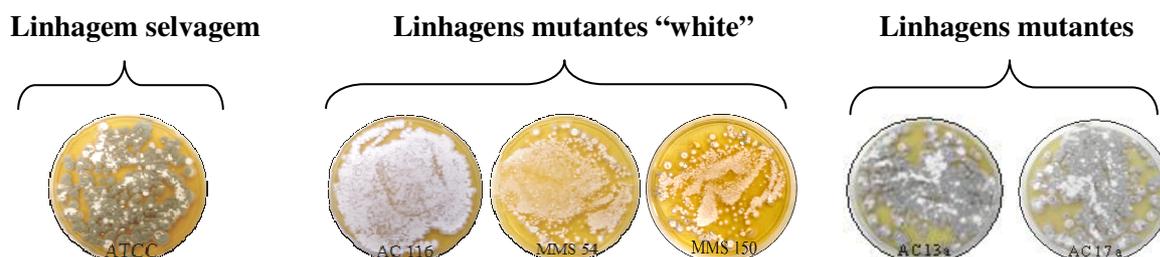


Figura 5.1. Linhagem selvagem, linhagens mutantes “white” AC116, MMS 54, MMS 150 e linhagens mutantes AC13a e AC17a.

Existem poucos estudos envolvendo a regulação morfológica em *S. clavuligerus* e os genes envolvidos em tal fenômeno. As linhagens AC116, MMS 150 e MMS 54 sofreram alguma alteração no cluster de genes *whi*, mais precisamente no locus *whiE*, que é o locus responsável por codificar enzimas para a síntese da pigmentação dos

esporos, como comprova os estudos realizados em *S. coelicolor*. Existe essa possibilidade devido aos estudos de Blanco *et al.* (1993), que demonstraram que a região do locus *whiE* é uma região do genoma muito conservada e possui uma alta homologia entre as espécies de *Streptomyces*.

5.1.3. Características morfológicas das linhagens mutantes e da selvagem pelo sistema de inoculação cruzada

Esse sistema de cultivo é utilizado para a observação do crescimento de hifas e suas estruturas como ramificações e formação de esporos. As linhagens mutantes não apresentaram diferenças na formação de hifas e suas ramificações com relação à linhagem selvagem, apenas as linhagens MMS 54 e AC116 apresentaram um maior número de esporóforos (Figura 5.2) (aumento de 400x).

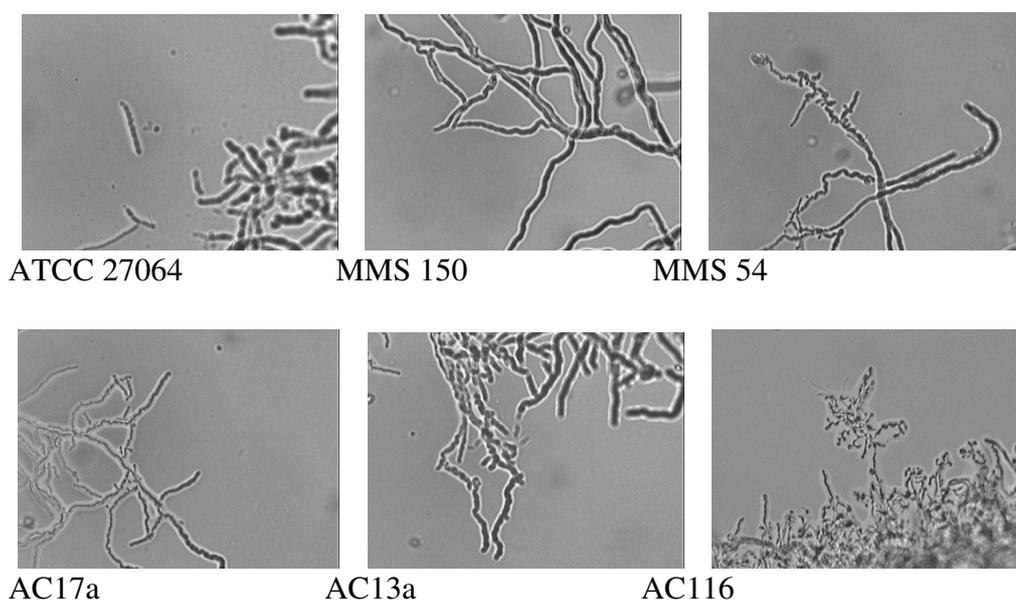


Figura 5.2. Hifas e suas estruturas da linhagem selvagem e das linhagens mutantes fotografadas pelo sistema de inoculação cruzada.

5.1.4. Características morfológicas das linhagens mutantes e da selvagem pelo sistema bloco de ágar

Nesse sistema, utilizado para observação de micélios aéreos e micélios que crescem no substrato, as linhagens AC13a, AC17a e MMS 54 apresentaram um grande número de ramificações em seus micélios aéreos em comparação com a linhagem selvagem e as mutantes MMS 150 e AC116. A linhagem AC 116 apresentou formação de esporóforos em suas hifas como mostra a Figura 5.3. Comparando os resultados, não houve diferenças significativas entre as linhagens. Em relação ao crescimento micelial no substrato, os resultados foram equivalentes em todas as linhagens (aumento de 400x).

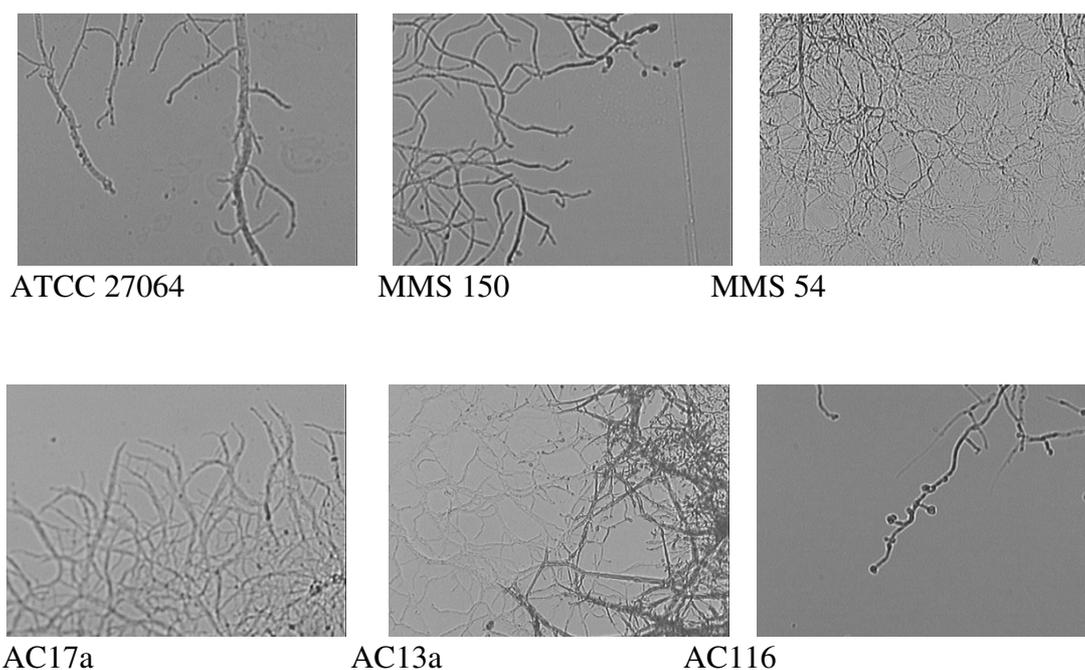


Figura 5.3. Micélios aéreos da linhagem selvagem e das linhagens mutantes fotografadas após o crescimento pelo sistema de bloco de ágar.

5.1.5. Características morfológicas das linhagens mutantes e da selvagem pelo sistema de lamínula inclinada

Nesse sistema que permite que possamos observar as hifas diretamente sob as lamínulas, todas as linhagens apresentaram muitas ramificações não havendo diferenças significativas entre as linhagens mutantes com a selvagem nessa característica, apenas as linhagens AC 116 e MMS 54 apresentaram formação de esporos, indicado pelas setas (Figura 5.4) (aumento de 400x).

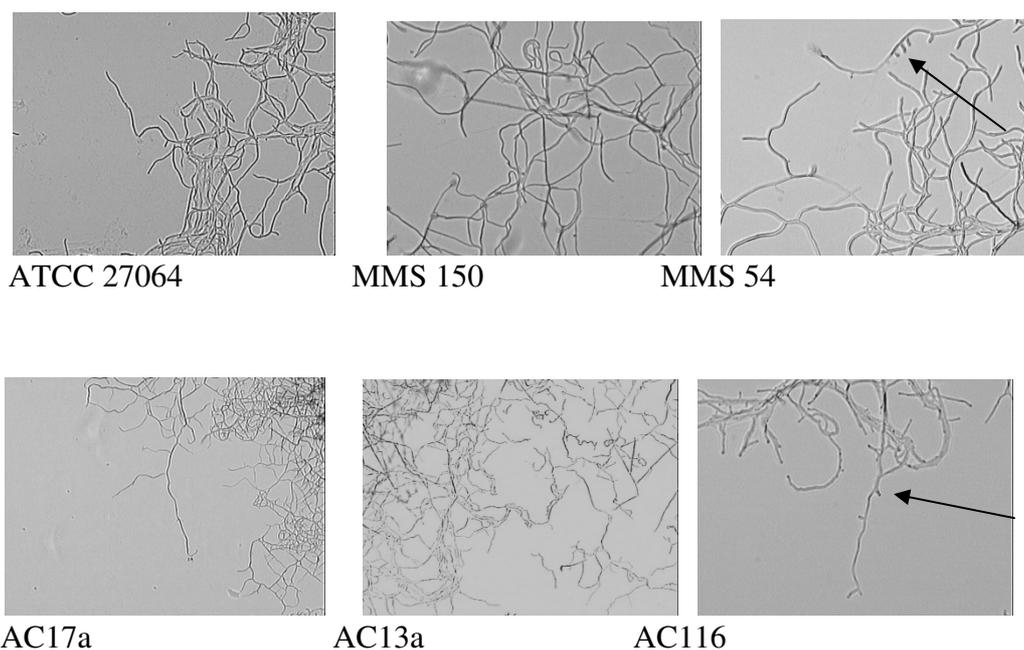


Figura 5.4. Hifas da linhagem selvagem e das linhagens mutantes fotografadas pelo sistema de lamínula inclinada.

5.1.6. Estudo das características morfológicas em meio líquido

Após o cultivo de 120 horas, nas primeiras 12 horas de cultivo a morfologia que predominou foi de filamentos livres ramificados entre as duas linhagens que foram analisadas, MMS 150 e a selvagem. Em 24 horas de cultivo iniciou a formação de clumps entre as linhagens, sendo que a linhagem mutante apresentou um maior número. Em 60 horas de cultivo a morfologia que predominou foi a de pellets entre as duas linhagens, com um maior número na linhagem mutante. Estes resultados assemelham-se com estudos de Yang *et al.* (1995), onde a mudança morfológica é causada pela redução

de um ou mais componentes do meio, e esse fenômeno pode estar associado com a secreção de substâncias autorreguladoras pelas células.

Nesse caso, o componente limitante foi o glicerol, como revela a figura 5.5, onde a linhagem mutante obteve seu total consumo por volta de 80 horas de cultivo e a linhagem selvagem por volta de 110 horas, confirmando assim uma mudança morfológica mais cedo na linhagem mutante, já que essa consumiu o glicerol mais rapidamente. A partir de 96 horas de cultivo houve um aumento no número de filamentos livres, possivelmente devido à lise celular e a exaustão de nutrientes.

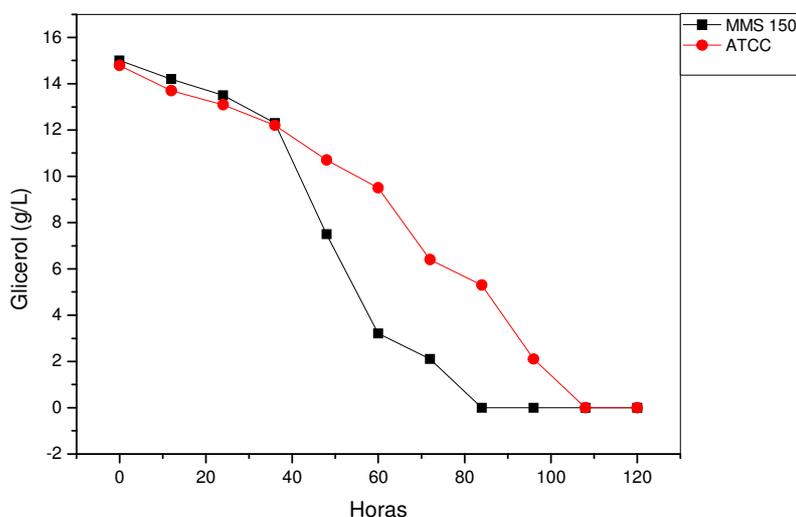


Figura 5.5. Quantificação de glicerol entre a linhagem selvagem e a mutante MMS 150 utilizando o meio GSPG.

5.2. Características Bioquímicas

5.2.1 Produção de pigmentos e atividade proteolítica extracelular

Com o intuito de caracterizar a produção de pigmentos e a atividade proteolítica extracelular da linhagem *Streptomyces clavuligerus* e suas mutantes, e prováveis mudanças das mutantes nessas características diante a selvagem, foram realizados cultivos utilizando os meios de cultura BHI e Gly Pep, citado por Petinate *et al.* (1999) em seu trabalho com *Streptomyces cyaneus*. Os meios Peptone – Yeast Extract Iron Agar e Tyrosine Agar foram utilizados especificamente para detectar produção de pigmentos (Shirling *et al.*, 1966).

No primeiro teste realizado para detectar a produção de pigmentos hidrossolúveis não foi observada nenhuma mudança na coloração da água, não havendo assim a produção do pigmento.

No segundo teste realizado para detectar pigmentos melanóides foram usados os meios de cultura Peptone (yeast extract iron agar) e Tyrosine agar. Meios de cultura contendo tirosina são usados porque quando a síntese de melanina ocorre a enzima fenoloxidase tirosinase transforma L-tirosina em L-DOPA e essa em dopacroma, que é auto-oxidada para indol-5,6-quinona, que mais tarde é polimerizada espontaneamente em DOPA-melanina. (Coelho e Linhares, 1993).

Em todos os meios utilizados houve crescimento das linhagens, porém não houve a detecção da produção de pigmentos melanóides e nem de enzimas proteolíticas extracelulares, sendo que quando ocorre à atividade proteolítica acontece um clareamento do meio ao redor do inóculo. Esse resultado revela que a espécie *Streptomyces clavuligerus* possui uma fisiologia diferente nessa característica, quando utilizado os meios citados diante a espécie *Streptomyces cyaneus*, e que as mutações não causaram mudanças nas linhagens mutantes nessas características em comparação com a linhagem selvagem.

5.2.2 Bioensaio qualitativo para ácido clavulânico

Essa metodologia se tornou uma maneira eficiente de verificar a produção de ácido clavulânico das linhagens, onde pequenas amostras (4 mm de diâmetro) retiradas por sucção de cultivos em meio sólido foram usadas para inocular placas contendo a bactéria teste *Klebsiella pneumoniae*, que é uma bactéria resistente a antibióticos β -lactâmicos como a amoxicilina, porém na presença do ácido clavulânico seu crescimento é inibido. Após a incubação de aproximadamente 10 horas já era possível verificar a formação de halo de inibição. Essa metodologia também é mais rápida para teste qualitativo como esse, onde culturas mantidas em estoque podem ser usadas, não precisando assim, fazer um cultivo em meio líquido onde o procedimento é mais laborioso. A Figura 5.6 revela que todas as linhagens formaram halo de inibição, comprovando assim a produção de AC.

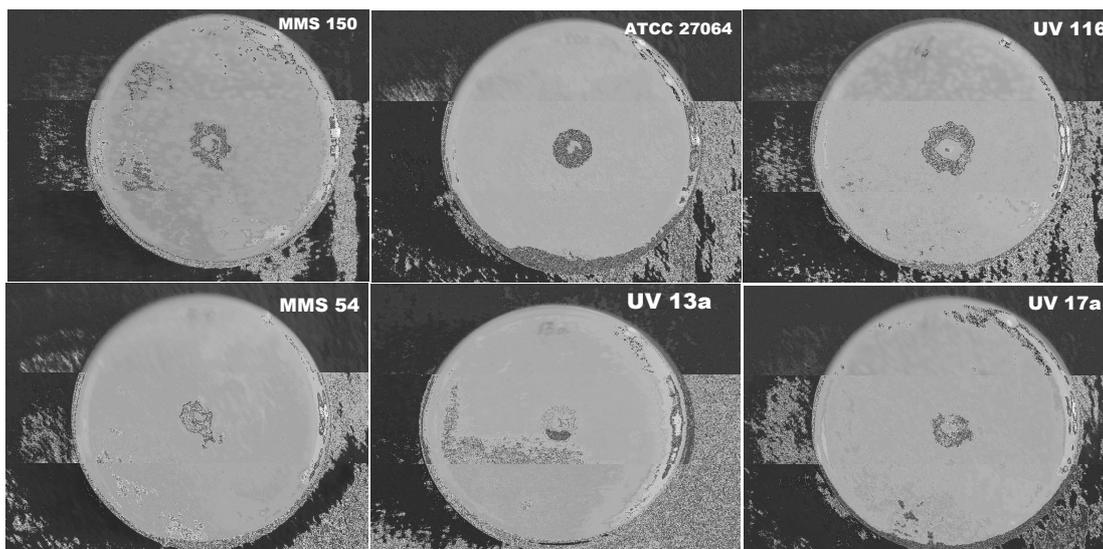


Figura 5.6. Bioensaio qualitativo para AC.

5.2.3 Ensaio em meio de cultura mínimo sólido

As placas de Petri contendo os aminoácidos asparagina, ornitina, histidina e arginina apresentaram o crescimento de todas as linhagens, sendo esses aminoácidos utilizados como fonte de carbono e nitrogênio, já os aminoácidos prolina, lisina e ácido glutâmico não foram metabolizados pelas linhagens, não havendo assim o crescimento. Não houve diferenças entre as linhagens mutantes e a selvagem de acordo com o cultivo realizado e os aminoácidos utilizados. A Tabela 5.2 descreve os resultados e quais aminoácidos proporcionaram um maior crescimento.

Tabela 5.2. Resultado do teste de crescimento em meio de cultura mínimo suplementado com aminoácidos separadamente.

Cepas ↓	Aminoácidos →	Ácido Glutâmico	Asparagina	Lisina	Ornitina	Histidina	Arginina	Prolina	ISP2	Meio Mínimo
AC 116		-	++	-	+	++	+	-	++	-
MMS 54		-	++	-	+	++	+	-	++	-
MMS 150		-	++	-	+	++	+	-	++	-
AC 13a		-	++	-	+	++	+	-	++	-
AC 17a		-	++	-	+	++	+	-	++	-
ATCC		-	++	-	+	++	+	-	++	-

(-) sem crescimento; (+) pouco crescimento; (++) maior crescimento.

O ácido glutâmico necessita de uma transformação, ou seja, é necessário uma aminotransferase para o metabolismo deste aminoácido. Esta reação foi primeiramente

descrita em *Bacillus megaterium* (Wilcox e Nirenberg, 1968), e foi subsequentemente proposta ocorrer em outras eubactérias, archae e algumas organelas (Lenhard *et al.*, não publicado), devido a falta de uma funcional aminoacil-tRNA sintetase. Em bactérias gram-positivas, a aminoacil-tRNA sintetase para tRNA^{Gln} não fixa uma glutamina ao seu tRNA, em vez disso, ela fixa ácido glutâmico. Esse erro é corrigido por uma segunda enzima (uma aminotransferase) que substitui o grupamento –O– do ácido glutâmico por um grupamento –NH₂ convertendo-o em glutamina, e essa rota é energeticamente mais custosa (Ibba *et al.*, 1997). Portanto, a hipótese é que devido essa necessidade de modificação do aminoácido ácido glutâmico para obter glutamina, sendo essa a única fonte de nitrogênio e por estar em um meio de cultura sem fonte de carbono, não houve o metabolismo do aminoácido devido à resposta estrigente, e consequentemente a falta de enzimas necessárias para tal transformação.

Possivelmente pode também ter ocorrido à resposta estrigente e consequentemente o não metabolismo dos aminoácidos lisina e prolina, porém, seriam necessários estudos bioquímicos para corroborar essa hipótese, já que não existem dados na literatura sobre essa característica.

Após este resultado foi realizado um segundo ensaio com os aminoácidos ácido glutâmico, lisina e prolina em meio mínimo com adição de glicerol, havendo o crescimento das linhagens, não ocorrendo assim uma resposta estrigente devido ao suplemento de uma fonte de carbono.

Mesmo no meio mínimo suplementado apenas com glicerol, houve um pequeno crescimento das linhagens, provavelmente devido ao fato de ter ocorrido uma proteólise intracelular, incrementando assim a disponibilidade de aminoácidos (Cashel *et al.*, 1996) (Tabela 5.3).

Tabela 5.3. Resultado do teste de crescimento em meio de cultura mínimo suplementado com aminoácidos separadamente e modificado com adição de glicerol.

Cepas ↓	Aminoácidos →	Ácido Glutâmico	Lisina	Prolina	Meio Mínimo
AC 116		++	++	++	+
MMS 54		++	++	++	+
MMS 150		++	++	++	+
AC 13a		++	++	++	+
AC 17a		++	++	++	+
ATCC		++	++	++	+

(+) pouco crescimento; (++) maior crescimento

5.2.4 Bioensaio com extração em meio sólido

A Tabela 5.4 revela que esta técnica se mostrou eficiente com relação à extração do ácido clavulânico em meio sólido, e que as linhagens MMS 150, MMS 54 e AC 116 apresentaram um maior halo de inibição em relação à linhagem selvagem, evidenciando assim uma maior concentração de AC por essa metodologia.

Tabela 5.4. Resultado do bioensaio com a bactéria teste *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 pela técnica de extração em meio sólido.

Linhagens	Diâmetro dos halos em centímetros
AC 13a	2,2
AC 116	2,8
AC17a	1,7
MMS 54	3,0
MMS 150	3,1
ATCC 27064	2,3

5.2.5. Cromatografia em camada delgada

As amostras extraídas do meio de cultura sólido foram submetidas a um teste qualitativo para cefamicina C, sabendo assim se a mutação provocou mudanças nessa

característica fisiológica. Todas as linhagens produziram cefamicina C de acordo com o padrão (última amostra a direita na figura), com exceção da linhagem AC 116, que após a aplicação do revelador produziu uma coloração quase que imperceptível (Figura 5.7).

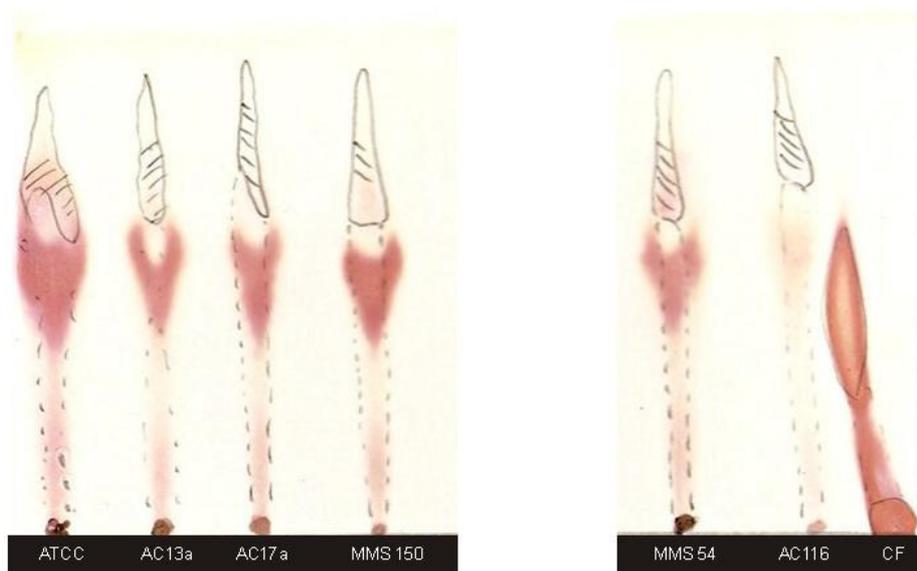


Figura 5.7. Teste qualitativo para cefamicina C pelo método de cromatografia em camada delgada.

5.2.6. Bioensaio qualitativo para cefamicina C

Por apresentar uma baixa, ou até mesmo a não produção de cefamicina C após a análise realizada pela cromatografia em camada delgada, a linhagem mutante AC 116, juntamente com a linhagem selvagem, foram submetidas a um bioensaio qualitativo, para comprovar assim se houve mudanças fisiológicas nessa característica, a biomassa e o pH também foram estudados nesse ensaio. O bioensaio comprovou que a linhagem mutante AC116 produziu cefamicina C em todas as amostras coletadas nos diferentes horários, sendo assim, a mutação não anulou essa característica fisiológica, porém sua produção foi menor em comparação a linhagem selvagem de acordo com o diâmetro dos halos de inibição (Tabela 5.5).

Tabela 5.5. Resultado do bioensaio qualitativo para cefamicina C.

Cepas ↓	Tempo →	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	Média do diâmetro dos halos
AC 116		+	+	+	+	1,2 cm
ATCC		++	++	++	++	2,5 cm

(+) menor halo de inibição; (++) maior halo de inibição.

A figura 5.8 revela que a linhagem mutante obteve um maior crescimento celular, porém sua produção de cefamicina C foi inferior a produção da linhagem selvagem, possivelmente parte da energia que seria gasta na produção de metabólitos secundários como a cefamicina C foi utilizada no crescimento celular devido a alterações provocadas pela mutação.

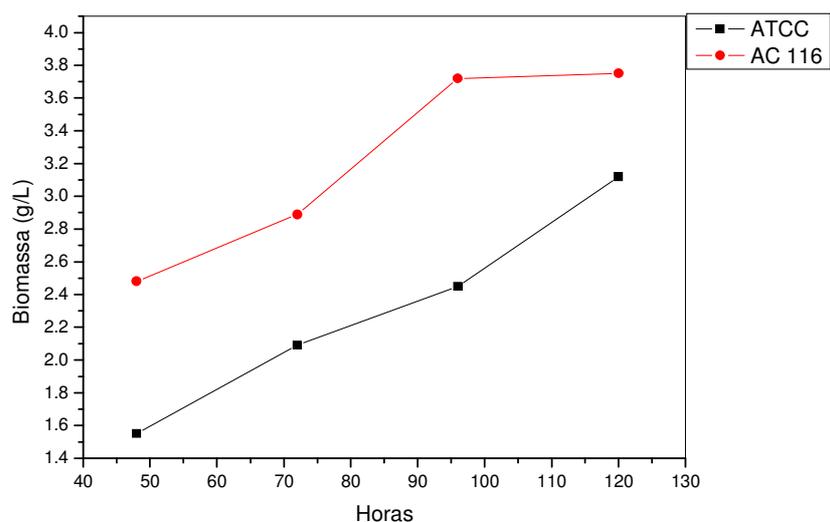


Figura 5.8. Comparação da biomassa entre as linhagens AC 116 e selvagem.

O pH se manteve relativamente estável entre as duas linhagens durante todo o cultivo, obtendo apenas uma variação entre 6,75 e 6,95 (Figura 5.9).

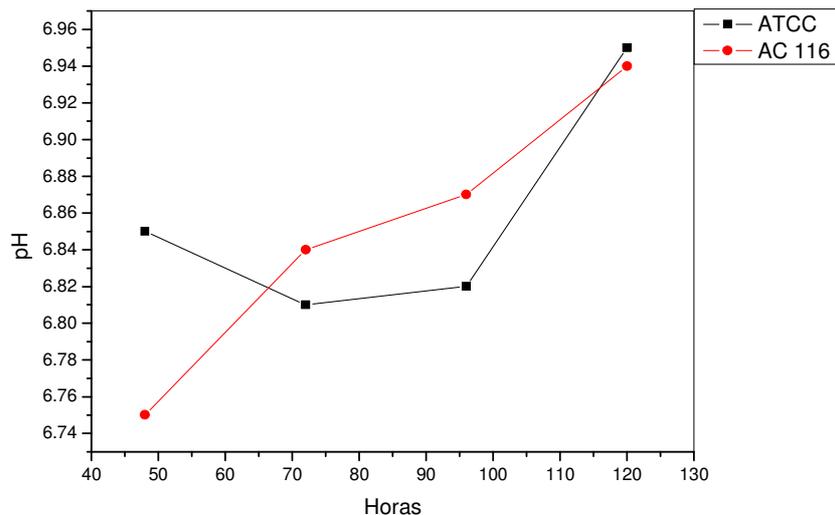


Figura 5.9. Perfil do pH entre as linhagens AC 116 e selvagem.

5.2.7. Ensaio utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal.

Por apresentarem um maior halo de inibição após o bioensaio com extração em meio sólido, as linhagens mutantes MMS 54, MMS 150 e AC 116, foram selecionadas juntamente com a selvagem para o cultivo utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal.

Entre as linhagens mutantes, a MMS 150 obteve uma boa produção de ácido clavulânico, menor que a da linhagem selvagem usando o meio de cultura complexo, mas, a quantidade produzida (~700 mg/L) em torno das 60 horas supera valores relatados na literatura obtidos por Lee *et al.* (2002) com mutantes produtores de ácido clavulânico (Figura 5.10).

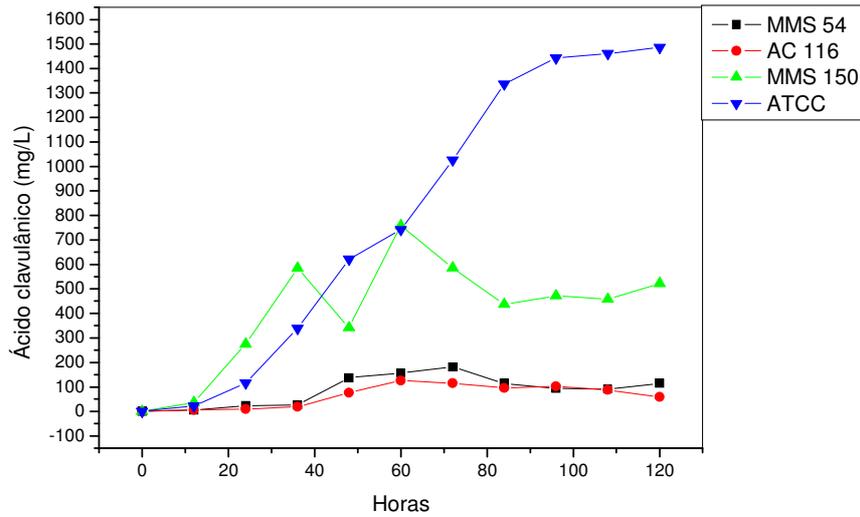


Figura 5.10. Comparação da concentração de AC entre as linhagens mutantes e a linhagem selvagem utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal.

Entre todas as linhagens mutantes e a linhagem selvagem, o glicerol foi totalmente consumido antes de completar 60 horas de cultivo, usando o meio de cultura complexo. (Figura 5.11).

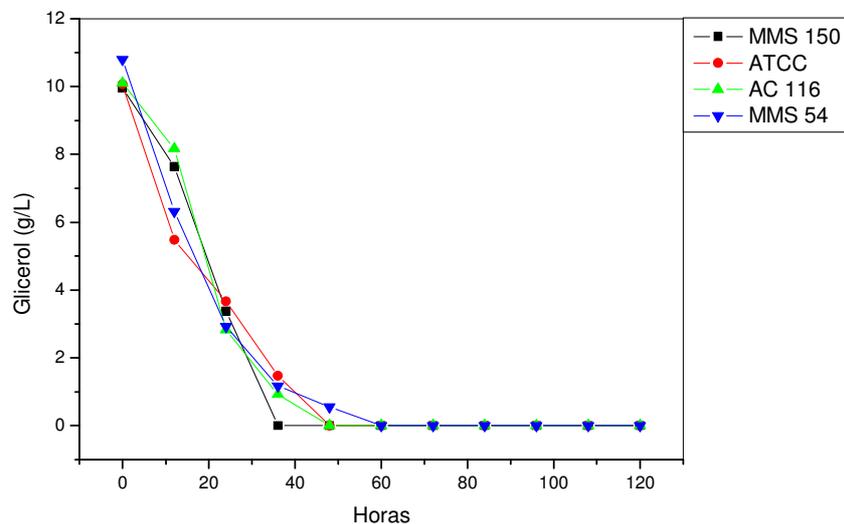


Figura 5.11. Quantificação de glicerol entre as linhagens mutantes e a linhagem selvagem utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal.

O pH se manteve estável entre todas as linhagens usando o meio complexo, exceto a linhagem mutante AC 116 que após 84 horas de cultivo obteve um pH acima de 7, possivelmente devido ao aumento de derivados de nitrogênio (Figura 5.12).

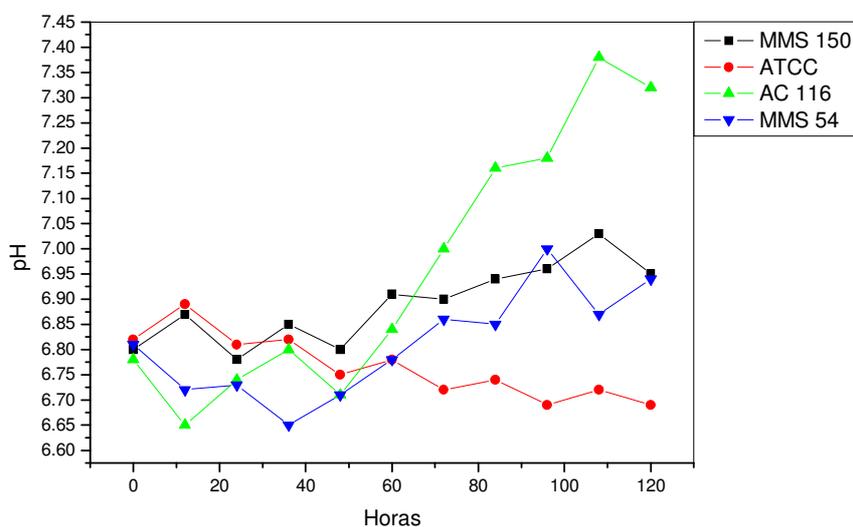


Figura 5.12. Perfil do pH entre as linhagens mutantes e a linhagem selvagem utilizando um meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal.

5.2.8. Ensaio utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal pelo método batelada com pulso.

Por ter ocorrido uma queda na produção de AC com a linhagem MMS 150 coincidentemente com o término do consumo de glicerol às 36 horas de cultivo, foi realizado uma batelada com pulso utilizando o glicerol na tentativa de suprir tal necessidade energética e verificar uma possível mutação em sua atividade enzimática. Após as duas alimentações de glicerol, uma às 36 horas e a segunda às 72 horas, a linhagem mutante continuou obtendo uma queda na produção de AC, sendo dessa vez às 48 horas de cultivo, 12 horas após a primeira alimentação com glicerol, e uma segunda queda às 84 horas de cultivo, não evidenciando assim qualquer mudança com relação à falta de glicerol. A produção de AC foi menor com as duas linhagens, podendo ter havido uma repressão catabólica com relação ao consumo do óleo vegetal devido à alta concentração de glicerol. (Figura 5.13).

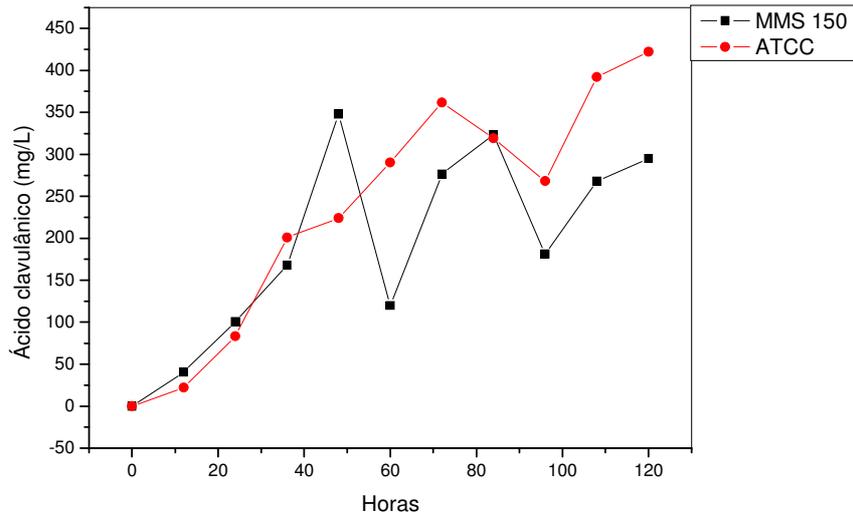


Figura 5.13. Comparação da concentração do AC entre as linhagens mutantes MMS 150 e a linhagem ATCC pelo método batelada com pulso.

O pH se manteve relativamente estável entre as duas linhagens no cultivo pelo método batelada com pulso, ocorrendo as maiores variações ao final do cultivo, possivelmente devido ao aumento de derivados de nitrogênio ao final do cultivo (Figura 5.14).

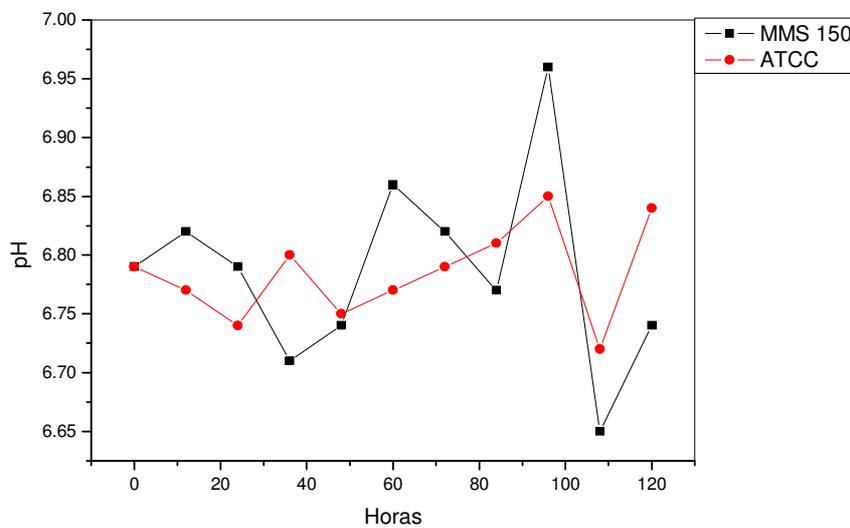


Figura 5.14. Perfil do pH entre a linhagem MMS 150 e a selvagem utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal pelo método batelada com pulso.

5.2.9. Ensaio utilizando os meios GSPA, GSPG e GSPO

Por apresentar uma maior produção de AC entre as linhagens mutantes, a linhagem MMS 150 foi selecionada para a realização dos cultivos subsequentes, juntamente com a selvagem para comparação. A linhagem mutante MMS 150 obteve uma maior produção de ácido clavulânico em comparação com a selvagem utilizando os meios de cultura GSPA, GSPG e o GSPO. A produção de AC foi baixa por ser tratar de um meio de cultura semi-sintético, porém em todos eles a linhagem mutante obteve uma maior produção, principalmente quando utilizado o meio GSPA, onde a produção de AC foi cerca de seis vezes mais com 60 horas de cultivo em comparação a linhagem selvagem, provavelmente a mutação fez com que essa linhagem mutante produza mais AC quando utilizado meios semi-sintéticos. (Figura 5.15).

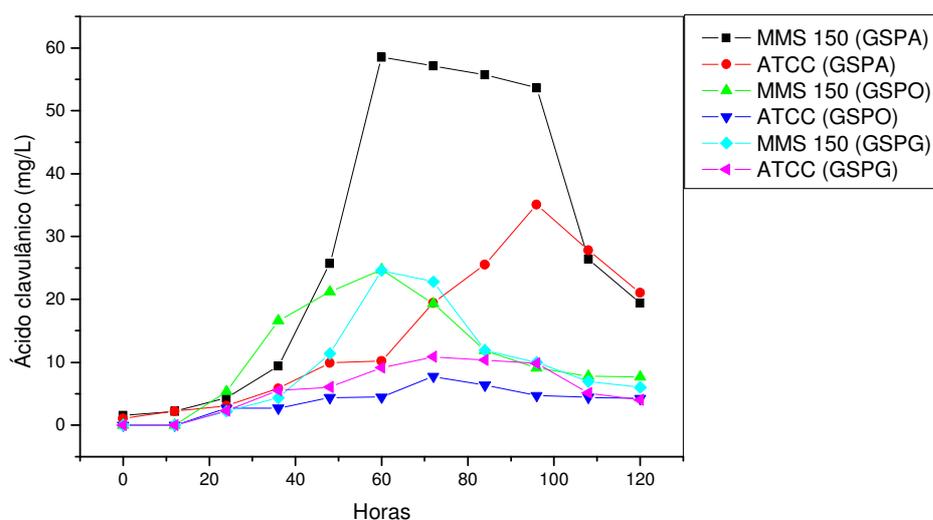


Figura 5.15. Comparação da concentração de AC entre a linhagem selvagem e a mutante MMS 150 utilizando os meios GSPA, GSPO e GSPG.

Entre os meios GSPA, GSPG e GSPO, o GSPG que é suplementado com o aminoácido ácido glutâmico evidenciou um maior consumo de glicerol pelas duas linhagens, tendo o seu término por volta de 84 horas de cultivo com a linhagem mutante e 108 horas com a linhagem selvagem (Figura 5.16).

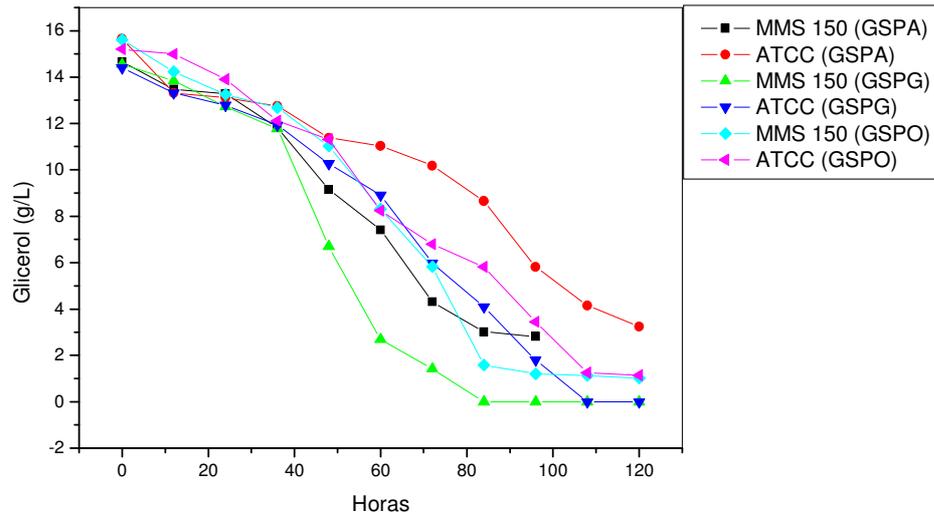


Figura 5.16. Quantificação de glicerol entre a linhagem selvagem e a mutante MMS 150 utilizando os meios GSPA, GSPG e GSPO.

O pH se manteve relativamente estável durante todos os cultivos com os meios GSPA, GSPG e GSPO, havendo pouca variação devido à modificação do meio de cultura com a adição do tampão MOPS. (Figura 5.17).

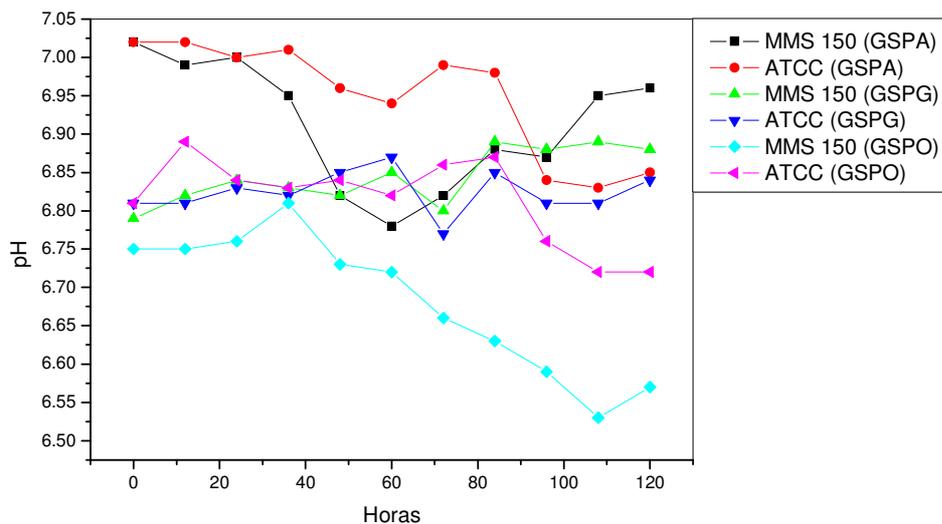


Figura 5.17. Perfil do pH entre a linhagem selvagem e a mutante MMS 150 utilizando os meios GSPA, GSPG e GSPO.

O meio de cultura GSPO, suplementado com o aminoácido ornitina, evidenciou um menor crescimento celular entre as linhagens selvagem e a mutante MMS 150, juntamente com uma menor produção de AC (Figura 5.18).

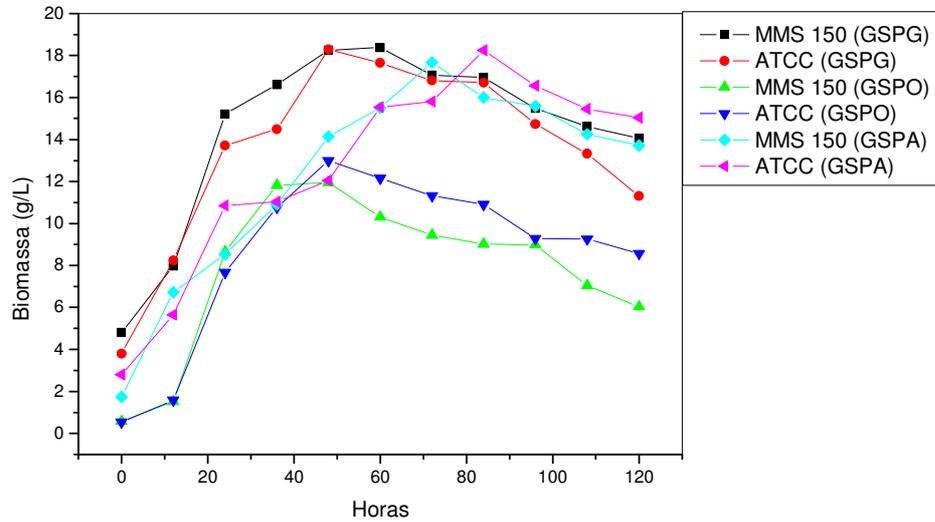


Figura 5.18. Comparação da biomassa entre a linhagem selvagem e a mutante MMS 150 utilizando os meios GSPA, GSPG e GSPO.

5.2.10. Ensaio utilizando o meio de cultura Soytone

Utilizando o meio de cultura soytone, a linhagem mutante MMS 150 obteve uma menor produção de AC em comparação com a selvagem, porém ambas as linhagens obtiveram uma produção equivalente, não havendo diferenças significativas. (Figura 5.19).

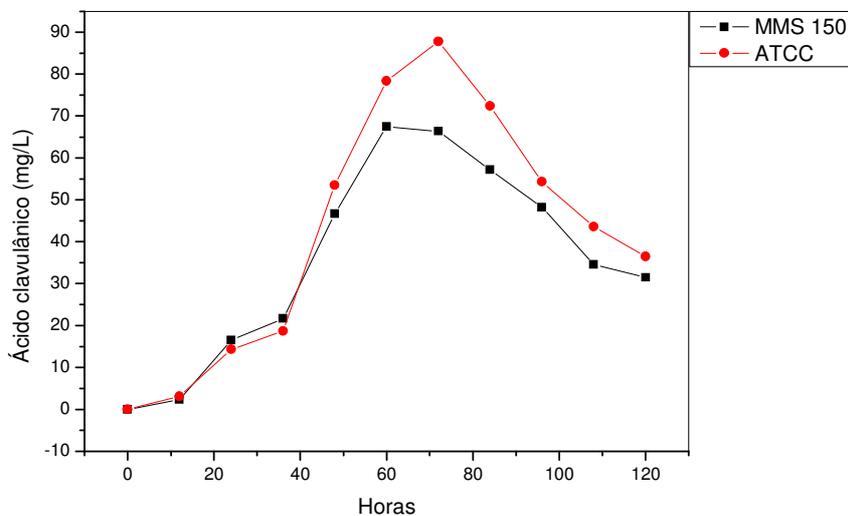


Figura 5.19. Comparação da concentração de AC entre as linhagens selvagem e MMS 150 utilizando o meio de cultura soytone.

O consumo de glicerol foi contínuo entre as linhagens MMS 150 e a selvagem usando o meio de cultura a base de soytone, tendo praticamente todo o seu consumo durante as 120 horas de cultivo (Figura 5.20).

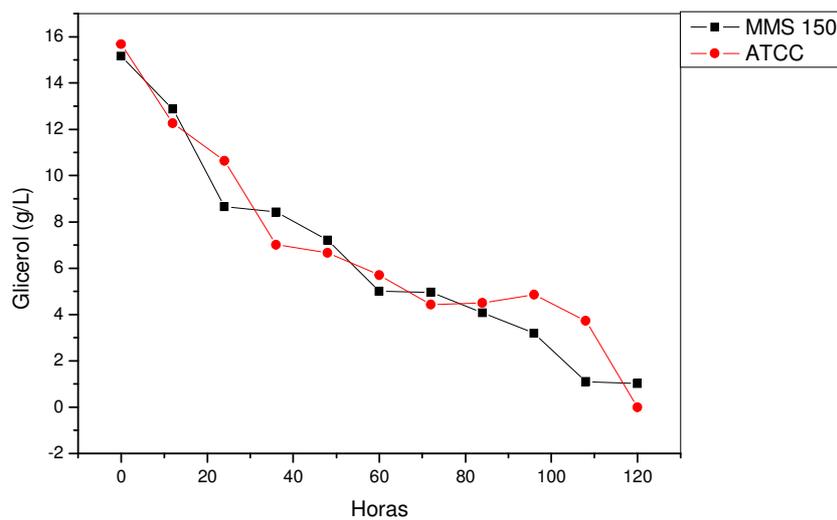


Figura 5.20. Quantificação de glicerol entre as linhagens MMS 150 e selvagem utilizando o meio de cultura soytone.

O pH sofreu algumas variações no decorrer do cultivo com o meio a base de soytone , obtendo valores ao redor de 7,5 com as linhagens MMS 150 e selvagem ao final do experimento (Figura 5.21).

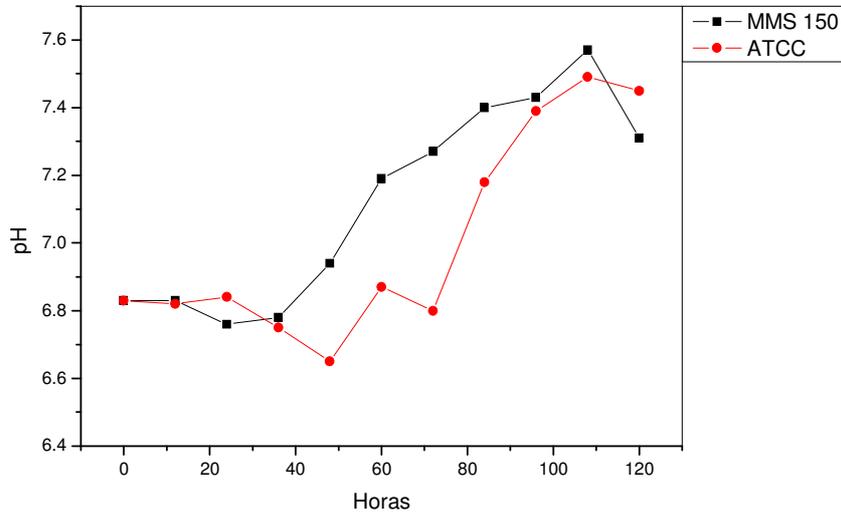


Figura 5.21. Perfil do pH entre as linhagens selvagem e MMS 150 utilizando o meio de cultura soytone.

O ápice do crescimento celular usando o meio a base de soytone entre as linhagens MMS 150 e a selvagem foi por volta das 48 horas do cultivo entre as duas linhagens, não havendo praticamente diferenças entre elas. (Figura 5.22).

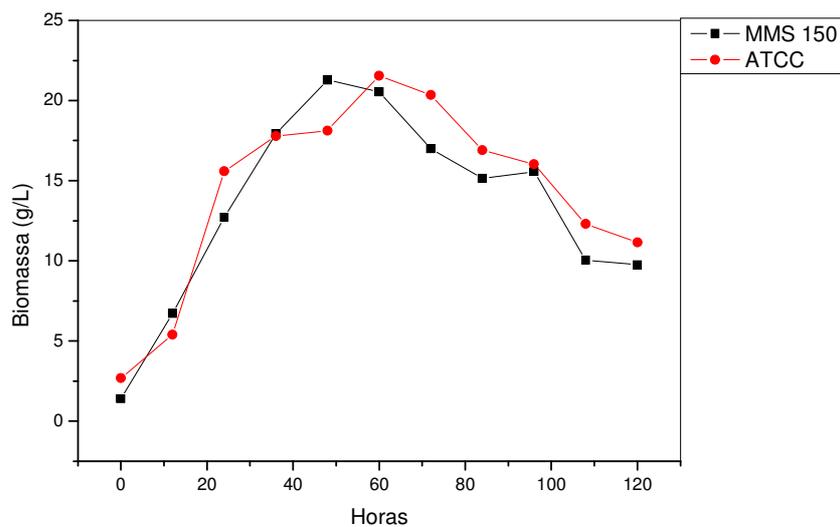


Figura 5.22. Comparação da biomassa entre as linhagens selvagem e a MMS 150 utilizando o meio de cultura soytone.

5.2.11. Ensaio utilizando o meio de cultura mínimo líquido suplementado com os aminoácidos ácido glutâmico, prolina, arginina, lisina e ornitina

O aminoácido ácido glutâmico foi o primeiro e o único a ser totalmente consumido entre as duas linhagens, seguido pela prolina, sendo que esse último não foi totalmente consumido ao final de 120 horas de cultivo. Ao final de 24 horas a linhagem selvagem havia consumido todo o ácido glutâmico, já a linhagem mutante obteve seu total consumo ao final de 36 horas. Essa linhagem também obteve uma absorção mais lenta com todos os outros aminoácidos em relação à linhagem selvagem. (Figuras 5.23 e 5.24).

Diferentemente de quando usado como única fonte de carbono e nitrogênio em meio de cultura sólido, onde não houve nenhuma absorção e conseqüentemente nenhum crescimento das linhagens, o ácido glutâmico foi o aminoácido mais consumido pela linhagem selvagem e a mutante MMS 150, isso devido à presença de outros aminoácidos que foram metabolizados inicialmente ou concomitantemente.

O aminoácido ácido glutâmico foi o primeiro a ser totalmente consumido devido esse servir de esqueleto para várias reações biossintéticas, gerando todos os 20 aminoácidos necessários à síntese de proteínas (Brock *et al.*, 1994).

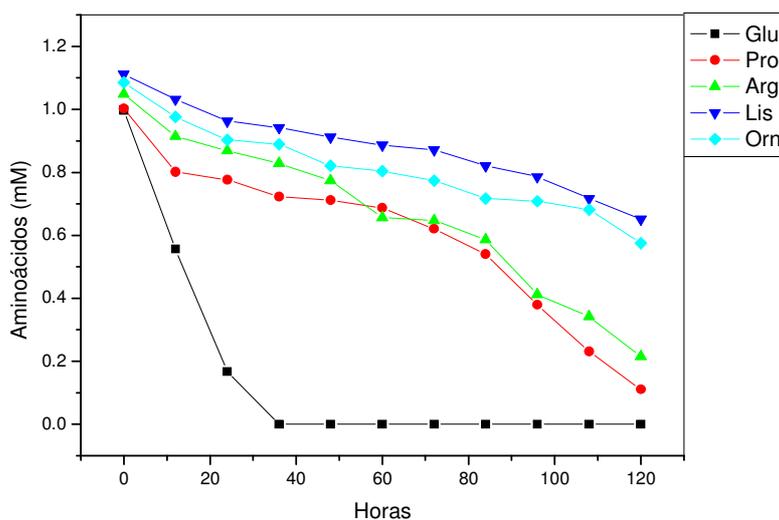


Figura 5.23. Linhagem selvagem e o seu consumo de aminoácidos utilizando o meio de cultura mínimo suplementado com aminoácidos.

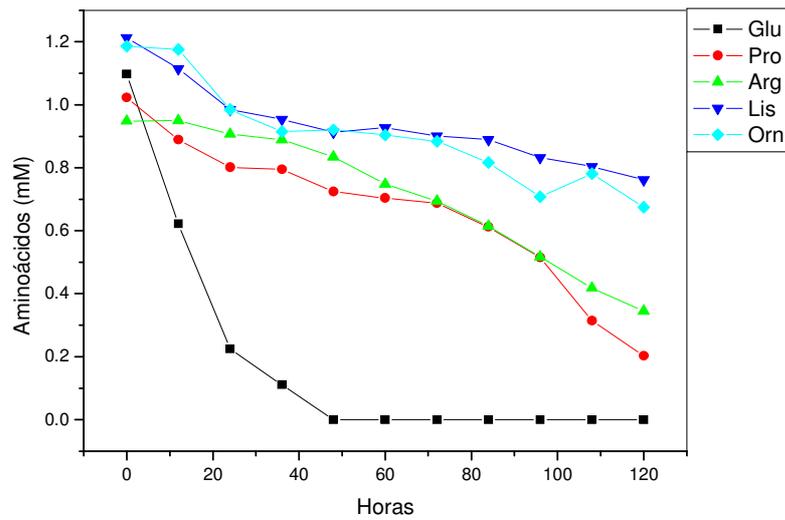


Figura 5.24. Linhagem MMS 150 e o seu consumo de aminoácidos utilizando o meio de cultura mínimo suplementado com aminoácidos.

A maior produção de AC entre as linhagens selvagem e a MMS 150 utilizando o meio mínimo coincidiu com o consumo do aminoácido ácido glutâmico, havendo uma queda na produção logo após o término do mesmo (Figura 5.25).

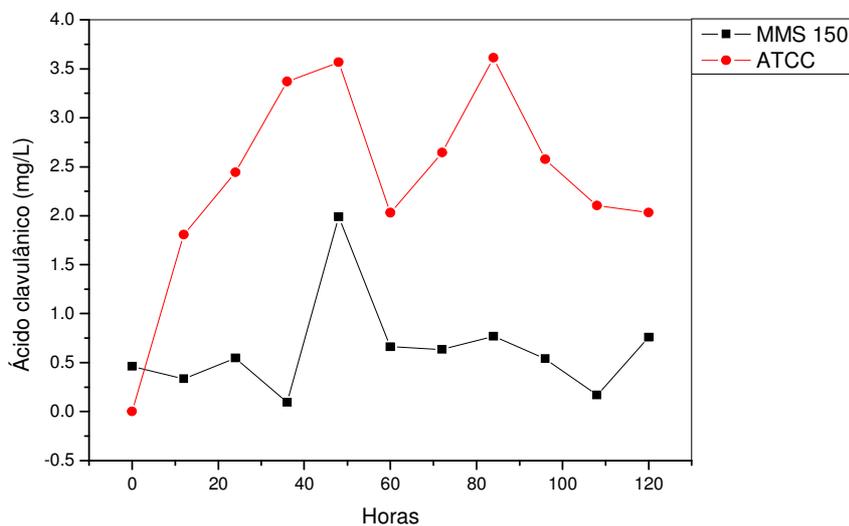


Figura 5.25. Comparação da concentração do AC entre as linhagens selvagem e MMS 150 utilizando o meio de cultura mínimo suplementado com aminoácidos.

A linhagem selvagem apresentou um maior crescimento celular em comparação com a linhagem mutante (Figura 5.26).

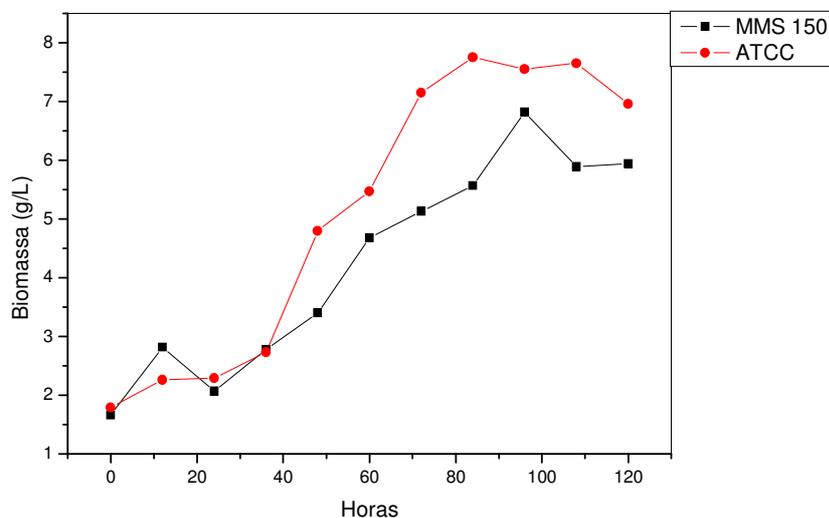


Figura 5.26. Comparação da biomassa entre a linhagens selvagem e a MMS 150 utilizando o meio de cultura mínimo suplementado com aminoácidos.

5.2.12. Estudo da atividade lipolítica intracelular e extracelular, das proteínas totais e de AC após o cultivo de 80 horas

O resultado no primeiro ensaio com 80 horas de cultivo revelou uma maior atividade enzimática no extrato (meio de cultura centrifugado), evidenciando assim uma maior atividade lipolítica extracelular em relação à atividade intracelular, já que o meio de cultura continha óleo de soja como indutor. As melhores temperaturas de estoque foram 4°C e -80°C para as amostras coletadas no sobrenadante (Figura 5.27). Já para as amostras coletadas no pellet, a melhor temperatura de estoque foi -80 °C para a linhagem selvagem. Aplicando as análises estatísticas entre as médias da atividade lipolítica no pellet entre a linhagem selvagem e a mutante MMS 150, os resultados revelaram diferenças significativas ($P = 0,004$), podendo concluir assim, que a mutação aplicada na linhagem MMS 150 provocou mudanças na enzima lipase intracelular, apresentando uma maior fragilidade diante a estocagem nas temperaturas de -20 e -80 °C, que são as temperaturas mais usuais em estocagem de amostras (Figura 5.27).

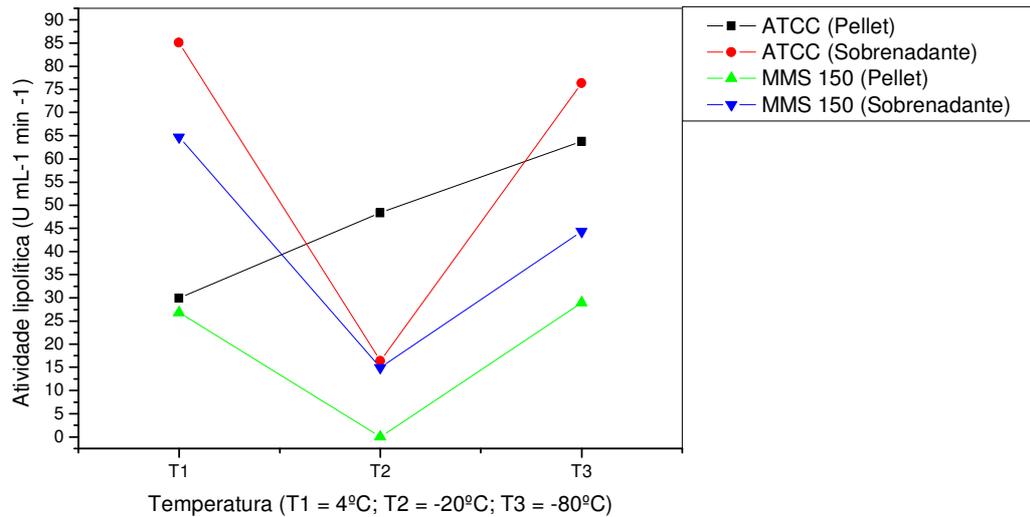


Figura 5.27. Perfil da atividade lipolítica do pellet e do sobrenadante entre as linhagens selvagem e a MMS 150.

As figuras 5.28 e 5.29 revelam os resultados obtidos do estudo de AC e proteínas totais ao final do cultivo de 80 horas e após a estocagem em diferentes temperaturas. A temperatura de -80 °C foi melhor para o armazenamento de AC para as duas linhagens, as duas outras temperaturas apresentaram uma maior degradação de AC.

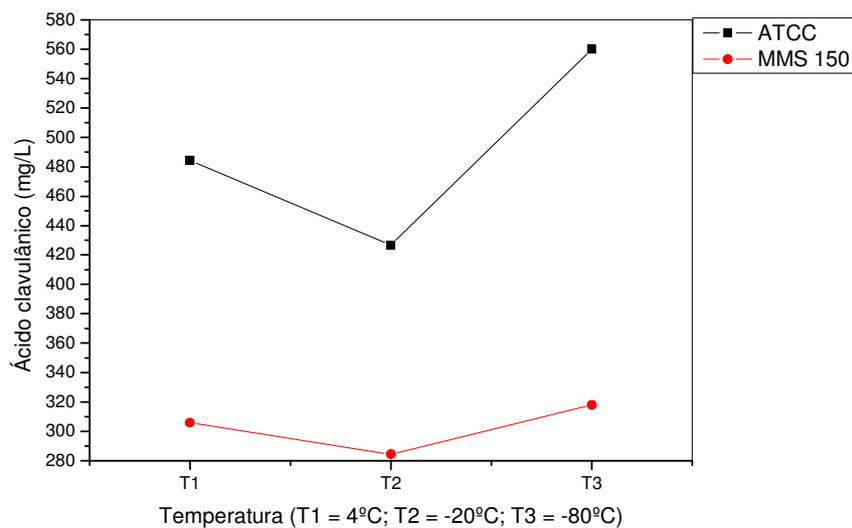


Figura 5.28. Comparação da concentração do AC entre as linhagens selvagem e MMS 150 utilizando diferentes temperaturas de estoque.

O estudo de proteínas totais revelou que a temperatura de -80°C também foi à melhor para o estoque das amostras.

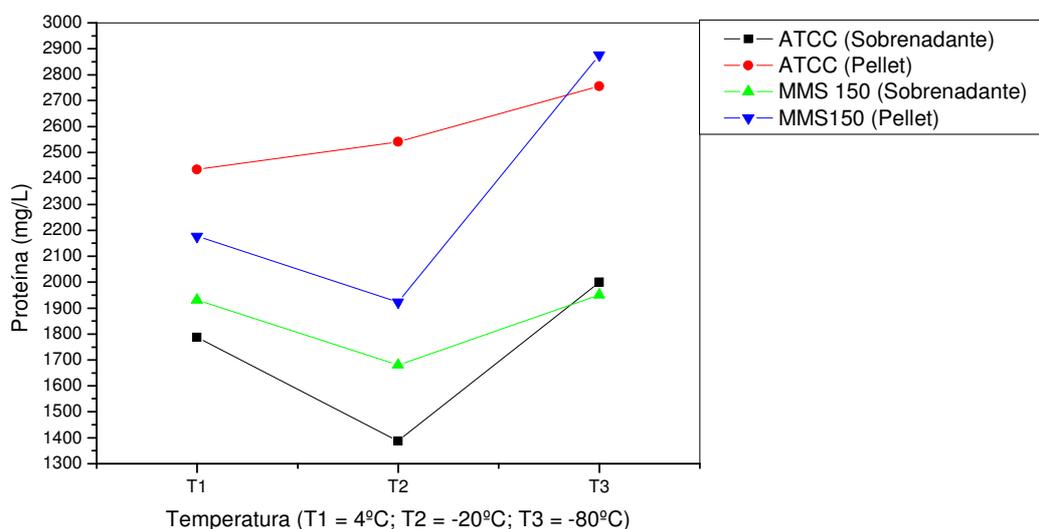


Figura 5.29. Comparação de proteínas totais entre as linhagens selvagem e MMS 150 utilizando diferentes temperaturas de estoque.

5.2.13. Perfil da atividade lipolítica, proteínas totais, biomassa, AC e atividade lipolítica específica utilizando o meio de cultura complexo após o cultivo de 120 horas

O cultivo de 120 horas de duração revelou que a produção da atividade lipolítica extracelular iniciou-se nas primeiras horas, não havendo uma total inibição enzimática devido à presença do glicerol, já que esse é consumido primeiramente. A linhagem mutante MMS 150 apresentou uma queda na atividade lipolítica após as 36 horas de cultivo (Figura 5.30), coincidindo com logo após a queda na produção de AC (Figura 5.33), podendo assim levar em conta que a mutação causou mudanças enzimáticas, tanto na sua atividade lipolítica quanto na atividade enzimática necessária para a absorção do glicerol, como revelou o cultivo realizado pelo método batelada com pulso.

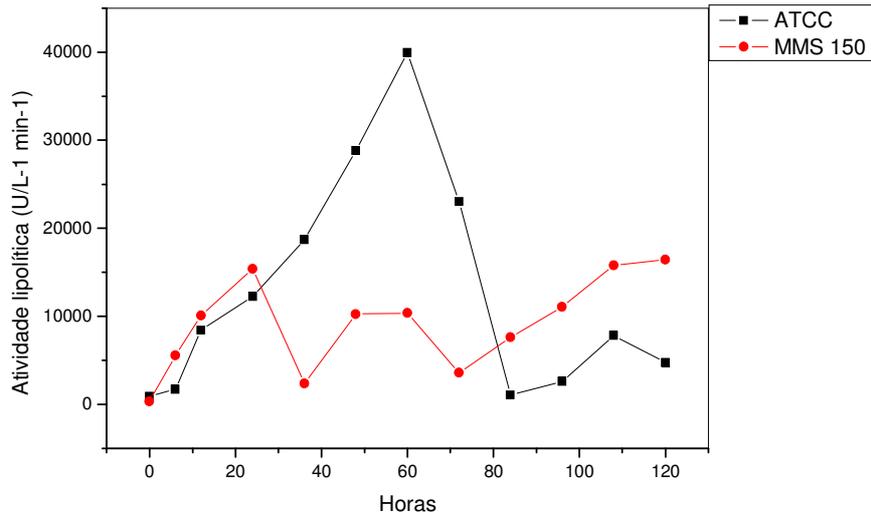


Figura 5.30. Perfil da atividade lipolítica entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo.

A comparação de proteínas totais revelou um consumo praticamente idêntico entre as duas linhagens, não havendo diferenças significativas entre elas (Figura 5.31).

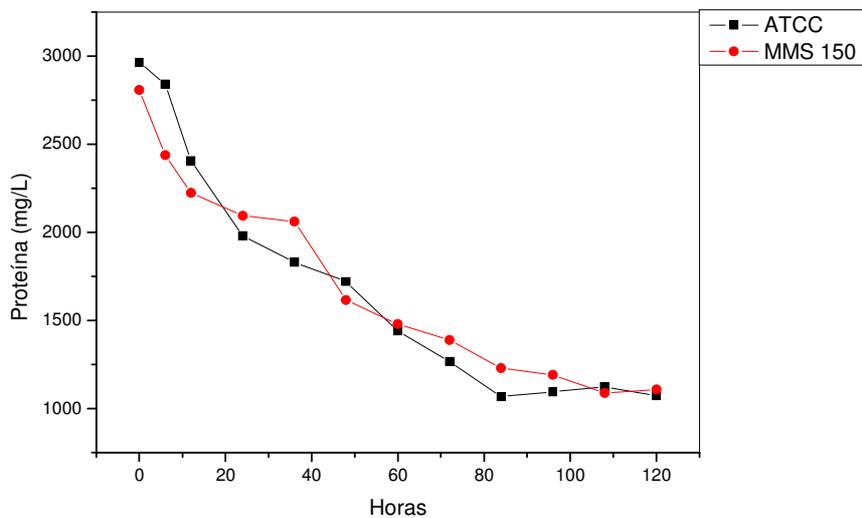


Figura 5.31. Comparação da concentração de proteínas totais entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo.

Apesar da complexidade do meio, após três lavagens das amostras foi possível ter uma estimativa do crescimento celular das linhagens, onde as duas apresentaram uma biomassa equivalente (Figura 5.32).

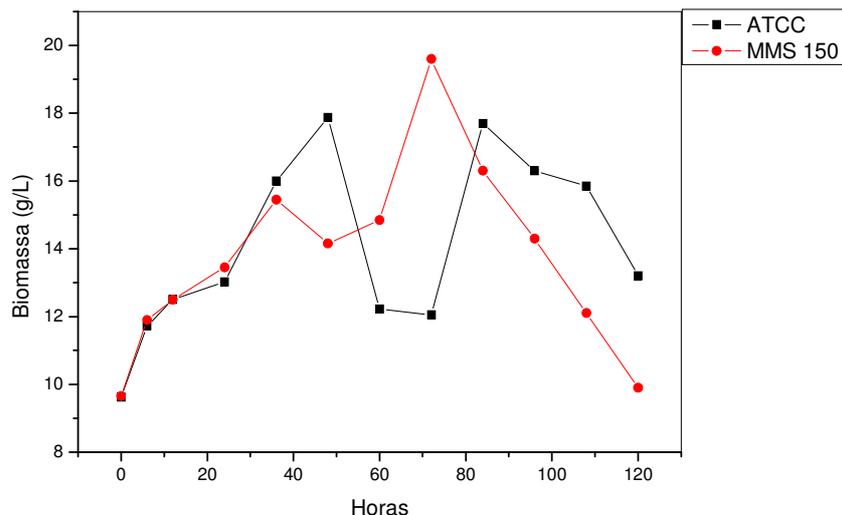


Figura 5.32. Comparação da biomassa entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo.

A linhagem mutante continuou apresentando uma queda na produção de AC logo após a diminuição da sua atividade lipolítica, esse estudo indica uma correlação entre a queda na produção de AC com a diminuição da atividade lipolítica. A produção de AC foi menor entre as duas linhagens devido os cultivos terem sido realizados em Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio, havendo assim uma menor transferência de oxigênio (Figura 5.33).

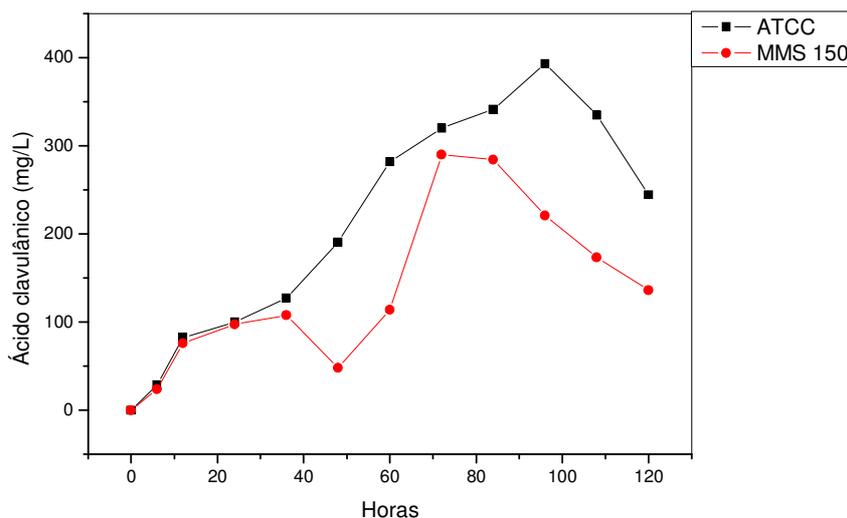


Figura 5.33. Comparação da concentração de AC entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo.

A figura 5.34 revela o perfil da atividade específica da enzima lipase, onde a linhagem selvagem obteve uma maior atividade específica nas 60 horas de cultivo, sendo essa cerca de 5 vezes maior em comparação com a linhagem mutante nesse ponto.

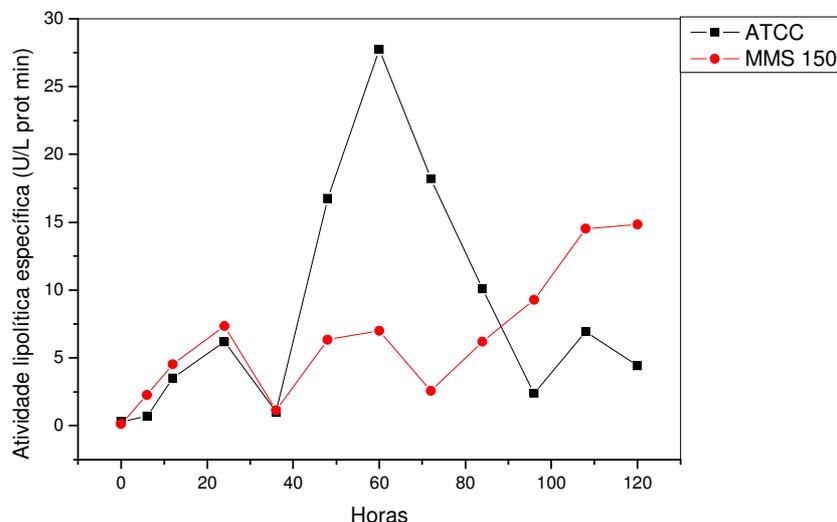


Figura 5.34. Perfil da atividade lipolítica específica utilizando o meio de cultura complexo.

5.2.14. Estudo da atividade lipolítica, proteínas totais, biomassa, AC e atividade lipolítica específica utilizando o meio de cultura complexo modificado sem adição de glicerol

Utilizando o meio de cultura complexo modificado sem glicerol, foi possível revelar uma maior indução da atividade lipolítica nas primeiras horas de cultivo, a linhagem mutante continuou apresentando uma queda na atividade lipolítica por volta de 36 horas de cultivo, porém houve uma maior produção enzimática quando comparado com o meio contendo glicerol, como foi apresentado na figura 5.30. Aplicando análises estatísticas, os resultados comprovaram diferenças significativas na linhagem mutante diante a atividade lipolítica quando cultivada em meio de cultura sem glicerol em comparação com o meio contendo glicerol, onde a produção da enzima lipase foi cerca de 2,4 vezes maior ($P = 0,014$). Pode-se assim constatar que a mutação aplicada na linhagem MMS 150 causou mudanças na sua atividade lipolítica de acordo com o meio de cultura utilizado, havendo uma maior indução quando utilizado o meio complexo sem glicerol em comparação com a selvagem. Já com a linhagem selvagem não houve mudanças significativas.

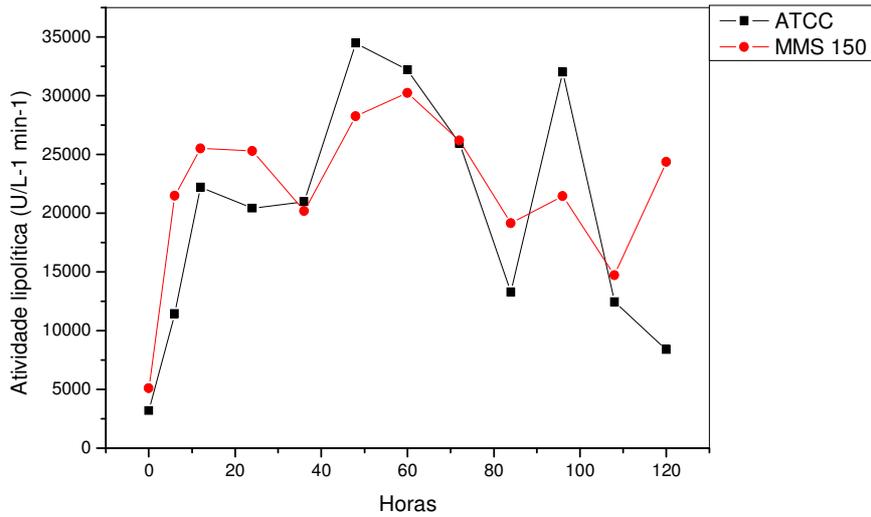


Figura 5.35. Perfil da atividade lipolítica entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo modificado.

A comparação de proteínas totais revelou um consumo praticamente idêntico entre as duas linhagens, não havendo diferenças significativas entre elas (Figura 5.36).

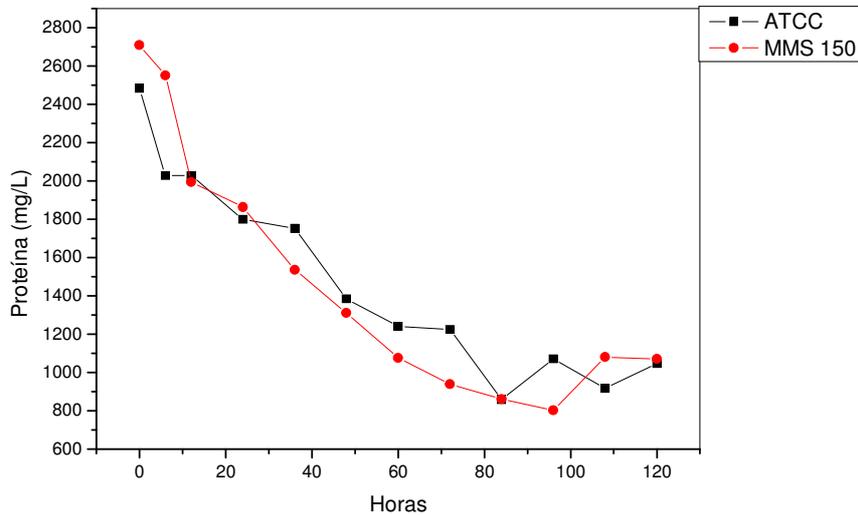


Figura 5.36. Comparação da concentração de proteínas totais entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo modificado.

A estimativa do crescimento celular das linhagens apresentou um crescimento maior na linhagem selvagem durante o cultivo (Figura 5.37).

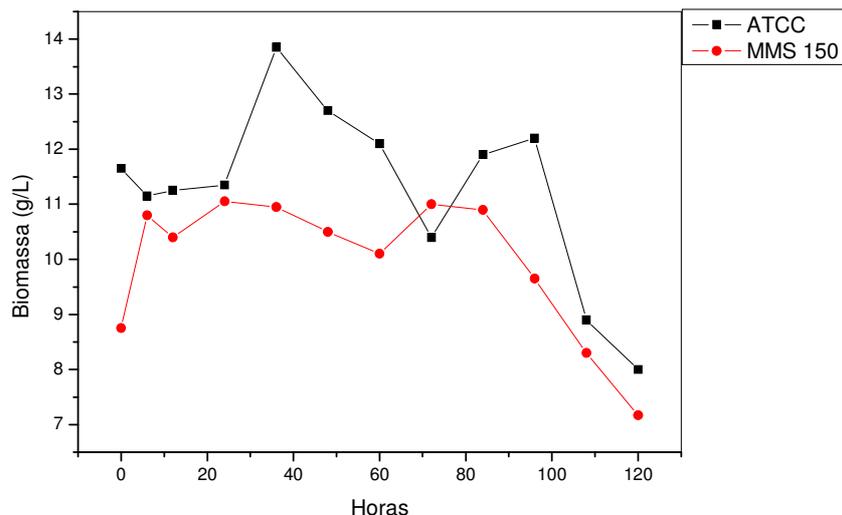


Figura 5.37. Comparação da biomassa entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo modificado.

Obtemos com a linhagem mutante uma ligeira maior produção de AC por volta das 72 horas de cultivo diante a linhagem selvagem, quando utilizado o meio complexo modificado. Havendo assim uma relação de uma maior indução da atividade lipolítica devido à ausência de glicerol no meio, com uma maior produção de AC (Figura 5.38).

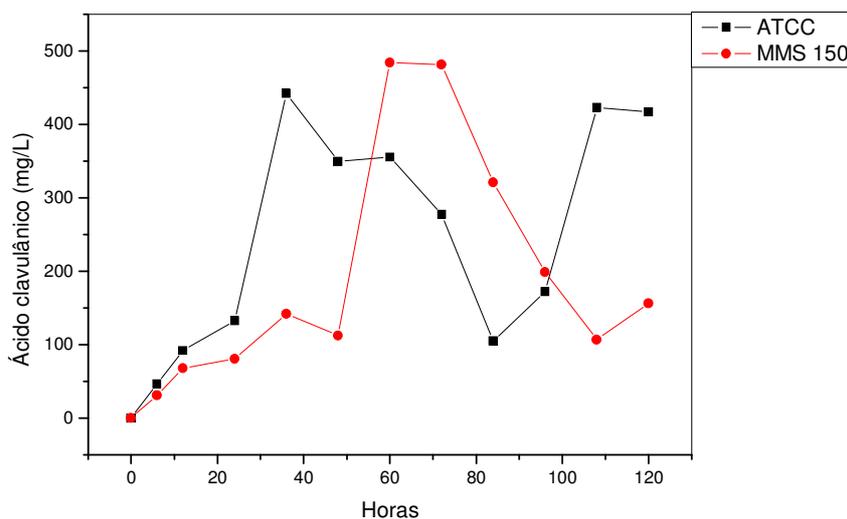


Figura 5.38. Comparação da concentração de AC entre as linhagens selvagem e mutante utilizando o meio de cultura complexo modificado.

A figura 5.39 revela o perfil da atividade específica da enzima lipase utilizando o meio de cultura complexo modificado.

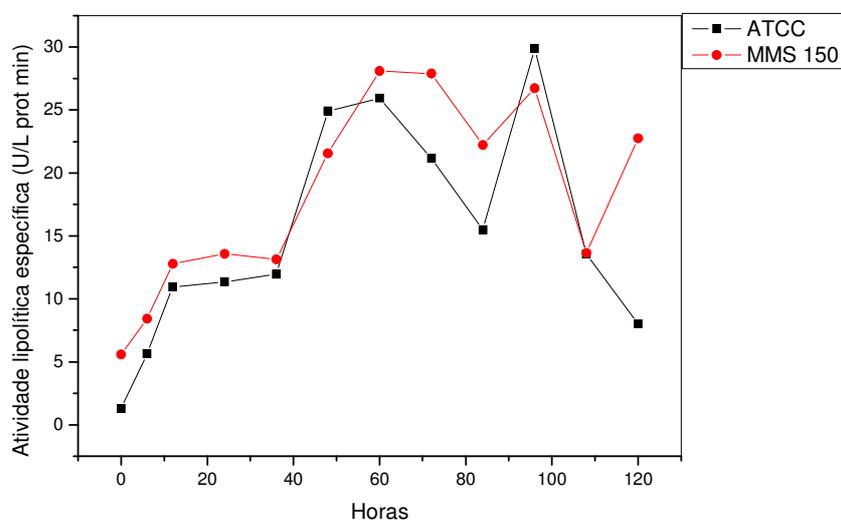


Figura 5.39. Perfil da atividade lipolítica específica utilizando o meio de cultura complexo modificado.

6. CONCLUSÕES

- As mutações de origem física e química aplicada na linhagem selvagem deram origem a linhagens fenotipicamente diferentes, sendo que as maiores diferenças foram apresentadas pelas linhagens mutantes AC 116, MMS 150 e MMS 54.
- Não foi detectado a produção de pigmentos melanóides e nem da atividade proteolítica extracelular em meio sólido, tanto na linhagem selvagem quanto nas linhagens mutantes, portanto não houve mudanças nessas características.
- O bioensaio qualitativo comprovou que todas as linhagens mutantes, e a selvagem, produziram ácido clavulânico.
- A linhagem AC 116 obteve frente aos demais uma baixa revelação na cromatografia em camada delgada para detectar cefamicina C. O bioensaio qualitativo comprovou que a linhagem produziu cefamicina C, porém menos que a linhagem selvagem de acordo com a média dos halos produzidos.

- O teste em meio mínimo sólido suplementado apenas com aminoácidos separadamente revelou que os aminoácidos asparagina, ornitina, histidina e arginina foram utilizados tanto como fonte de carbono como de nitrogênio e proporcionaram o crescimento das linhagens. Já os aminoácidos ácido glutâmico, lisina e prolina não foram metabolizados pelas linhagens para o crescimento.
- O bioensaio com extração em meio sólido revelou que as linhagens mutantes MMS 150, MMS 54 e AC 116 produziram maiores halos de inibição, evidenciando assim uma maior concentração de AC destas linhagens em relação à selvagem por este método.
- No cultivo em mesa incubadora rotativa utilizando o meio de cultura complexo a base de farinha de soja, glicerol e óleo vegetal proposto por Maranesi *et al.* (2005), a linhagem mutante MMS 150 foi a que mais produziu entre as mutantes selecionadas, obtendo uma produção de aproximadamente 700 mg/L de ácido clavulânico nas 60 horas de cultivo, superior aos outros mutantes relatados na literatura, porém inferior ao obtido com a linhagem selvagem.
- Nos cultivos em mesa incubadora rotativa pelo método batelada com pulso, a linhagem mutante MMS 150 obteve também menor produção de AC, não evidenciando assim qualquer mudança com relação à falta de glicerol.
- Os cultivos realizados com os meios GSPG, GSPA e GSPO a linhagem mutante MMS 150 apresentou uma maior produção de ácido clavulânico frente às outras mutantes e a selvagem, possivelmente a mutação proporcionou essa maior produção.
- Os cultivos realizados utilizando o meio de cultura soytone, as linhagens MMS 150 e selvagem obtiveram uma baixa produção de AC e também não houve diferenças entre elas na produção.
- No ensaio utilizando o meio de cultura mínimo líquido suplementado com os aminoácidos ácido glutâmico, prolina, arginina, lisina e ornitina com a linhagem MMS 150 e a selvagem, não houve diferenças significativas entre as linhagens com relação ao consumo dos aminoácidos.

- As análises lipolíticas evidenciaram uma maior atividade extracelular em relação à atividade intracelular. A linhagem MMS 150 apresentou uma maior fragilidade da enzima lipase intracelular diante a estocagem nas temperaturas -20 e -80 °C em comparação com a selvagem.
- Quando utilizado o meio complexo proposto por Maranesi, à linhagem mutante apresentou uma menor atividade lipolítica, porém, após realizar o ensaio com o meio complexo modificado, a linhagem mutante produziu uma atividade lipolítica cerca de 2,4 vezes maior, confirmando assim, que a mutação aplicada na linhagem MMS 150 causou mudanças na sua atividade lipolítica de acordo com o meio de cultura utilizado. Sua produção de AC também foi maior em comparação com a linhagem selvagem quando utilizado o meio modificado, havendo assim uma relação de uma maior indução da atividade lipolítica com uma maior produção de AC.

7. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Todas as linhagens analisadas foram mutantes de primeira geração, portanto uma segunda mutação nas linhagens seria importante, principalmente usando o mutagênico químico MMS, já que a *S. clavuligerus* possui um alto conteúdo de bases C+G.

Realizar um trabalho de fusão de protoplastos entre as linhagens mutantes e entre as linhagens mutantes e a selvagem, proporcionando assim uma recombinação do DNA e possibilitando assim linhagens com uma maior produção de AC.

Realizar um trabalho de biologia molecular, podendo assim proporcionar recombinações no genoma de uma maneira direcionada.

Realizar um trabalho específico com a enzima lipase, pois a *Streptomyces clavuligerus* apresentou uma alta produção, em comparação com alguns trabalhos recentes citados na literatura temos:

Domingues *et al.* (2005), atividade lipolítica = 167 U/L com o microrganismo *Thermus thermophilus*, trabalho realizado em biorreator.

Silva *et al.* (2005), atividade lipolítica = 4.540 U/L com o microrganismo *Metarhizium anisopliae*.

Nossos resultados obtidos com *S. clavuligerus*: Atividade lipolítica entre 16.390,00 a 85.092,60 U/L, trabalho realizado em mesa incubadora rotativa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHARONOWITZ, Y.; DEMAIN, A. L. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 14, p. 159-164, 1978.

AHARONOWITZ, Y.; DEMAIN, A. L. Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *S. clavuligerus*. **Archives of Microbiology**, v. 115, p. 169-173, 1977.

AIDOO, K. A.; WONG, A.; ALEXANDER, D. C.; RITTAMMER, R. A.; JENSEN, S. E. Cloning sequencing and disruption of a gene from *Streptomyces clavuligerus* involved in clavulanic acid biosynthesis. **Gene**, v.147, n. 1, p. 41-46, 1994.

AINSA, J. A.; RYDING N. J.; HARTLEY, N.; FINDLAY, K. C.; BRUTON C. J.; CHATER, K. F. WhiA, a protein of unknown function conserved among Gram-positive bacteria, is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Journal of Bacteriology**, v.182, p. 5470-5478, 2000.

AINSA, J. A.; PARRY, H. D.; CHATER, K. F. A response regulator-like protein that functions at an intermediate stage of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Molecular Microbiology**, v. 34, p. 607-619, 1999.

ANDERSON, A. S.; WELLINGTON, E. M. H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 797-814, 2001.

ARAUJO, M. L. G. C. **Estudo cinético do processo de produção da cefalosporina C com células livres e imobilizadas de *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272.** 1996. 189 f. Tese (Doutorado em Engenharia Bioquímica) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

ARULANANTHAM, H.; KERSHAW, N. J.; HEWITSON, K. S.; HUGHES, C. E.; THIRKETTLE, J. E.; SCHOFIELD, C. J. ORF17 from the clavulanic acid biosynthesis gene cluster catalyses the ATP dependent formation of N-glycyl-clavaminic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 1, p. 279-287, 2006.

ATKINSON, B.; MAVITUNA, F. **Biochemical engineering and biotechnology handbook.** 2nd ed. Canadá: Sttockton Press, 1992. p. 867-870.

BACHMANN, B. O.; LI, R.; TOWNSEND, C. A. beta-Lactam synthetase: a new biosynthetic enzyme. **PNAS USA**, v. 95, n. 16, p. 9082-9086, 1998.

BAGGALEY, K.H., BROWN, AG.; SCHOFIELD, C.J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and others clavams. **Natural Products Reports**, v.14, p.309-333, 1997.
BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals** 2nd ed. New York: MacGraw-Hill, 1986.

Baltz, R.H. Mutation in *Streptomyces* In: The Bacteria, Queener and L.E.Day (eds), v.9. Antibiotic –producing. **Academic Press**, p. 61-94, 1986.

BENTLEY, S. D.; BROWN, S.; MURPHY, L. D.; HARRIS, D. E.; QUAIL, M. A.; PARKHILL, J.; BARRELL, B. G.; MCCORMICK, J. R.; SANTAMARIA, R. I.; LOSICK, R.; YAMASAKI, M.; KINASHI, H.; CHEN, C. W.; CHANDRA, G.; JAKIMOWICZ, D.; KIESER, H. M.; KIESER, T.; CHATER, K. F. SCP1, a 356,023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Molecular Microbiology**, v. 51, p. 1651-1628, 2004.

BENTLEY, S. D.; CHATER, K. F.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A.; CHALLIS, G. L.; THOMSON, N.R.; JAMES, K. D.; HARRIS D. E.; QUAIL, M. A.; KIESER, H.; HARER, D.; BATEMAN, A.; BROWN, S.; CHANDRA, G.; CHEN, C. W.; COLLINS, M.; CRONIN, A.; FRASER, A.; GOBLE, A.; HIDALGO, J.; HORNSBY, T.; HOWARTH, S.; HUNG, C.; KIESER, T.; LARKE, L.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M.; RUTHERFORD, K.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SAUNDERS, D.; SHARP, S.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAYLOR, K.; WARREN, T.; WIETZORREK, A.; WOODWARD, J.; BRREL, B. G.; PARKNILL, J.; HOPWOOD, D. A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v. 417, n. 6885, p. 141-147, 2002.

BEPPU, T. Signal Transduction and secondary metabolism: prospects for controlling productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 13, p. 264-269, 1995.

BIBB, M. J.; MOLLE, V.; BUTTNER, M. J. σ^{bldN} , an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Journal of Bacteriology**, v.182, p.4606-4616, 2000.

BIBB, M. 1995 Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Microbiology**, v. 142, pt 6, p. 1335-1344, 1996.

BIGNELL, D. R.; WARAWA, J. L.; STRAP, J. L.; CHATER, K. F.; LESKIW, B. K. Study of the *bldG* locus suggests that an anti-anti-sigma factor and an anti-sigma factor may be involved in *Streptomyces coelicolor* antibiotic production and sporulation. **Microbiology**, v.146, p. 2161-2173, 2000.

BIRD, E.A.; BELLIS, M.J.; GASSON, C. Spectrometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. **Analyst**, v.107, p.1241-1245, 1982.

BLANCO, G.; BRIAN, P.; PEREDA, A.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A.; CHATER, F. Hybridization and DNA sequence analysis suggest an early evolutionary divergent of related biosynthetic gene sets encoding polyketide antibiotics and spore pigments in *Streptomyces* spp. **Gene**, v.130, p. 107-116, 1993.

BRADFORD, M. M. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248, 1976.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 7th ed. London: Prentice Hall, 1994.

BROWN, A.G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, G.; READING, C. Naturally-Occurring β -lactamase inhibitor with antibacterial activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, p. 668-669, 1976.

BROWN, D.; EVANS, J. R.; FLETTON, R. A. Structures of three novel beta-lactams isolated from *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Chemical Society, Chem. Commun**(6), p. 282-283, 1979.

BUCKLAND, B.C. The translation of scale in fermentation processes control. **Biotechnology**, v. 2, p.875-883, 1984.

BUCKLAND, B.C.; OMSTEAD, D.R.; SANTAMARINA, V. Novel β -lactam antibiotics. **Comprehensive Biotechnology**, v.3, p.49-67, 1977.

BUSH, K. Characterization of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p. 259-263, 1989.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis and fermentation. In: VANDAME, E. J. **Biotechnology of industrial antibiotics**. New York: Marcel Dekker, 1984. v. 22, p. 225-235.

CASHEL, M.; RUDD, K. The Stringent Response. in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Neidhard, F. C.; Ingraham, J. L.; Low,

B. L.; Magasanik, B.; Schaechter, M.; And Umbarger, H. E. eds. **American Society for Microbiology**. Washington, DC, p. 1410-1438, 1987.

CASHEL, M., GENTRY, D. R., HERNANDEZ, V. J.; VINELLA, D. The stringent response. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. **American Society for Microbiology**. 2nd ed p. 1458-1496, 1996.

Challis, G. L.; Hopwood, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **PNAS**, p. 14555-14561, Supplement 2, 2003.

CHANG, P. C.; COHEN, S. N. Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid. **Science**, v. 265, n. 5174, p. 952-954, 1994.

CHATER, K.F. Genetic regulation of secondary metabolic pathways in *Streptomyces* In: Secondary Metabolites: Their Function and Evolution. **Ciba Found Symp**, v. 171, p.144-156, 1992.

CHATER, K. F. Developmental decisions during sporulation in the aerial mycelium in *Streptomyces*. In Prokaryotic Development. Edited by Brun YV, Shimkets LJ. Washington, DC: **American Society for Microbiology**, p. 33-48, 2000.

CHATER, K. F. Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex?. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n.6, p. 667-673, 2001.

CHATER, K. F. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. **Annul Review of Microbiology**, v. 47, p. 685-713, 1993.

CHATER, K. F.; HOPWOOD, D. A. *Streptomyces*, in *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: **Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics**. Sonenshein, A. L.; Hoch, J. A.; Losick, R. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993. p. 83-99.

CHATER, K. F.; HORINOUCI, S. Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. **Molecular Microbiology**, v. 48, p. 9-15, 2003.

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

CHEN, K.; LIN, Y.; WU, J.Y., JOHN HWANG, S. Enhancement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 152-156, 2003.

COELHO, R. R. R.; LINHARES, R. F. Melanogenic actinomycetes (*Streptomyces* spp.) from Brazilian soils, **Biology and Fertilit of Soils**, v. 15, p. 220-224, 1993.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. **Analytical Biochemistry**, v. 151, p. 369, 1985.

COTE C. K.; HONEYMAN, A. L. The transcriptional regulation of the *Streptococcus mutans* bgl regulon. **Oral Microbiol Immunol**, v. 17, p. 1-8, 2002.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology, a textbook of industrial microbiology**. Suderland: Sinauer Associates. 1984. p. 308.

DE LA FUENTE, J.L.; MARTÍN, J.F.; LIRAS, P. New type of hexameric ornithine carbamoyltransferase with arginase activity in the cephamycin producers *Streptomyces clavuligerus* and *Nocardia lactamdurans*. **Biochemical Journal**, v. 320, p. 173-179, 1996.

DÉLIC, V.; HOPWOOD, D.A; FRIEND, E.J. Mutagenesis by N-Metyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. **Mut Research**, v. 9, p.167-182, 1970.

DRUCKER, D. B. **Microbiological Applications of Gas Chromatography**. Cambridge: University Press, 1981.

EGAN, L. A.; BUSBY, R. W.; IWATA-REUYL, D.; TOWNSEND, C. A. The Probable Role of Clavaminic Acid as the Terminal Intermediate in the Common Pathway to Clavulanic Acid and the Antipodal Clavam Metabolites. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, p. 2348-2355, 1997.

ELLIOT, M. A.; BIBB, M. J.; BUTTNER, M. J.; LESKIW, B. K. BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Molecular Microbiology**, v. 40, p. 257-269, 2001.

ELANDER, R. P. Industrial production of β -lactam antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 385-392, 2003.

ELLIOT, M. A.; LESKIW, B. K. The BldD protein from *Streptomyces coelicolor* is a DNA-binding protein. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 6832-6835, 1999.

ELKINS, J. M.; CLIFTON, I. J.; HERNÁNDEZ, H.; DOAN, L.X.; ROBINSON, C. V.; SCHOFIELD, C. J.; HEWITSON, K. S. Oligomeric structure of proclavaminic acid amidino hydrolase: evolution of a hydrolytic enzyme in clavulanic acid biosynthesis. **Biochemistry Journal**, v. 366, p. 423-434, 2002.

ELSON, S. W.; BAGGALEY, K. H.; DAVISON, M.; FULSTON, M.; NICHOLSON, N. H.; RISBRIDGER, G. D.; TYLER, J. W. The identification of three new biosynthetic intermediates and one further biosynthetic enzyme in the clavulanic acid pathway. **Journal of Chemical Society, Chem Commun** (15), 1212-1214, 1993.

EMBLEY, M. T.; STACKEBRANDT, E. The molecular phylogeny and systematics of actinomycetes. **Annual Review Microbiology**, v. 48, p. 257-289, 1994.

ENSIGN, J.C. Formation, properties, and germination of actinomycete spores. **Annual Review of Microbiology**, v. 32, p. 185-219, 1978.

ETOK, C. A.; EKA, O. U. Characterization and chillproofing activity of two enzymes from *Streptomyces* species. **Journal of Basic Microbiology**, v. 36, p. 83-88, 1996.

FERNÁNDEZ-MORENO, M. A.; CABALLERO, J. L.; HOPWOOD, D. A.; MALPARTIDA, F. The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. **Cell**, v. 66, p. 769-780, 1991.

FLÄRDH, K. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6(6), p. 564-571, 2003.

FLETT, F.; MERSINIAS, V.; SMITH, C. P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting Streptomycetes. **FEMS. Microbiology Letters**, v. 155, p. 223-229, 1997.

FOULSTONE, M.; READING, C. Assay of amoxicillin and clavulanic acid, components of augumentin, in biological fluids with performance liquid chromatography. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v.22, p.753-762, 1982.

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

GARRITY, G.; BELL, J.; LILBURN, T. **Taxonomic Outline of the Prokaryotes**, 2004. in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition, Bergey's Manual Trust, Sringer-Verlag, New York.

GARRITY, G.M.; HOLT, J. G. **The Road Map to the Manual**, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition, Boone, D. R.; Castenholz, R. W.; Garrity, G. M. eds. Bergey's Manual Trust, Sringer-Verlag, New York, 2001. pp. 119-66.

GENTRY, D. R.; CASHEL, M. Mutational analysis of the *Escherichia coli spoT* gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation. **Molecular Microbiology**, v. 19, p.1373-1384, 1996.

GREIN, A. Antitumor anthracyclines produced by *Streptomyces peucetius*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 32, p.203-214, 1987.

GROVE, D.C.; RANDALL, W.A. **Assay Methods of Antibiotics, A Laboratory Manual**, New York, A medical Encyclopedia, Inc. 1995. p. 238.

GUPTA, N.; RATHI,P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 98-99, 2002.

HARDISSON, C.; MANZANAL, M.B.; SALAS, J.A.; SUÁREZ, J.E. 'Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*.' **Journal of General Microbiology**, v. 105 n. 2, p. 203-214, 1978.

HASELTINE, W. A.; BLOCK, R. Synthesis of guanosine tetra and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes, **PNAS USA**, v.70, p. 1564-1568, 1973.

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

HERITAGE, J.; EVANS, E. G. V.; KILLINGTON, R. A. **Introductory Microbiology**, Great Britain, Cambridge University Press, 1996. p. 234.

HERNÁNDEZ, I. L. C.; GODINHO, M. J. L. ; MAGALHÃES, A.; SCHEFER, A. B.; FERREIRA, A. G.; BERLINCK, R. G. S. N-acetyl- γ -hydroxyvaline lactone, an unusual amino acid derivative from a marine streptomycete. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 664-665, 2000.

HIGGINS, C. E.; KASTNER, R. E. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a beta-lactam antibiotic producer. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 21, n. 4, p. 326-331, 1971.

HIRATA, D. B. Produção de ácido clavulânico em batelada alimentada por *Streptomyces clavuligerus* e extração em sistemas de duas fases aquosas. 2003. 104 f. Dissertação (Mestrado)- **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos, 2003.

HOCKENHULL, D. J. D. ANTIBIOTICS. IN: RAINBOW, C.; ROSE, AM. **Biochemistry of Industrial Microorganisms**. New York: Academic Press, 1963. p. 227-299.

HOCKENHULL, D. J. D. Inoculum development with particular references to *Aspergillus* and *Penicillium*, In: Smith, J.E.; Smith, D.R.; Berry, D.R.; Kristiansen, B. eds. **Fungal Biotechnology**, London: Academic Press, 1980. p. 1-14.

HODGSON, J. E.; FOSBERRY, A. P.; RAWLINSON, N.S.; ROSS, H. N.; NEAL, R. J.; ARNELL, J. C.; EARL, A. J.; LAWLOR, E. J. Clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*: gene cloning and characterization. **Gene**, v. 166, n. 1, p. 49-55, 1995.

HOKKA, C.O.; MORAES, I. O. Fermentação semicontínua. I- Análise do comportamento da fermentação para produção de penicilina. **Revista Brasileira de Tecnologia**, v. 9, p. 175-180, 1978.

HOPWOOD, D.A.; BIBB, K.F.; CHATER, K.F.; KIESER, T.; BRUTON, C.J.; KIESER, H.M.; LYDIATE, D.J.; SMITH, C.P.; WARD, J.M. E SCHREMPF, H. **Genetic Manipulation of Streptomyces, A Laboratory Manual**, Norwich, England, The John Innes Foundation. 1985. p. 356.

HOWARTH, T.T.; BROWN, AG.; KING, T.J. Clavulanic acid, a novel β -lactam isolated from *Streptomyces clavuligerus*: X-rays crystal structure analysis. **Journal of Chemical Society**, Chem Commun, p. 266-267, 1976.

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

JAKIMOWICZ, D.; MAJKA, J.; MESSER, W.; SPECK, C.; FERNANDEZ, M.; MARTÍN, M. C.; SANCHEZ, J; SCHAUWECKER, F.; KELLER, U.; SCHREMPF, H.; ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J. Structural elements of the *Streptomyces oriC* region and their interactions with the DnaA protein. **Microbiology**, v. 144, n. 5, p. 1281-1290, 1998.

JENSEN, S. E.; PARADKAR, A. S. Biosíntesis and molecular genetics of clavulanic acid. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 75, n. 1-2, p. 125-133, 1999.

JENSEN, S. E.; ELDER, K. J.; AIDOO, K. A.; PARADKAR, A. S. Enzymes catalyzing the early steps of clavulanic acid biosynthesis are encoded by two sets of paralogous genes in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3. p. 720-726, 2000.

JENSEN, S. E.; WONG, A.; GRIFFIN, A.; BARTON, B. *Streptomyces clavuligerus* has a second copy of the proclavaminic amidinohydrolase gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48. p. 514-520, 2004.

JONES, C.; THOMPSON, A; ENGLAND, R. Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.13, p.633-636, 1997.

KÄMPFER, P.; KROPPESTEDT, R. M.; DOTT, W. A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 1831-1891, 1991.

KELEMEN, G. H.; BUTTNER, M. J. Initiation of aerial mycelium formation in *Streptomyces*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 6, p. 656-662, 1998.

KELNER, A. Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultraviolet irradiation injury. **PNAS**, v. 35, p. 73-79, 1949.

KHALEELI, N.; LI, R; TOWNSEND, C. A. Origin of the beta-Lactam Carbons in Clavulanic Acid from an Unusual Thiamine Pyrophosphate-Mediated Reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 39, p. 9223-9224, 1999.

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

KIESER, H.M.; KIESER, T.; HOPWOOD, D.A. A combined genetic and physical map of *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 5496-5507, 1992.

KORN-WENDISCH, F.; KUTZNER, H. J. The Family Streptomycetaceae. In: STARR, M. P.; STOLP, H.; TRUPER, H. G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H. G., eds. **The Prokaryotes**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. v. 1, p. 921-995.

LARGE, K. P.; MIRJALILI, N.; OSBORNE, M.; PEACOCK, L. M.; ZORMPAIDIS, V.; WALSH, M.; CAVANAGH, M. E.; LEADLAY, P. F.; ISON, A. P. Lipase activity in *Streptomyces*. **Enzyme and Microbiol Technology**. v. 25, p. 569-575, 1999.

LAVARDA, S.C.S. **Avaliação de condições para a imobilização de células de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 para a produção de ácido clavulânico em biorreator tipo torre**. 2003. f. 113. Tese (Doutorado em Biotecnologia). UNESP Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2003.

LECHEVALIER, H.A; LECHEVALIER, M.P. Introduction to the Order *Actinomycetales* In: **Prokaryotes**. Starr, M.P.; Stalp, H.; Tryper, H.G.; Balawi, A; Schegel, H.G. eds, Springer, New York, 1981.

LEE, P.C.; HO, C.C. Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* in palm-oil medium. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.73-75, 1996.

LEE, S.D.; PARK, S.W.; OH, K.K.; HONG, S. I.; KIM, S.W. Improvement for the production of clavulanic acid by mutant *Streptomyces clavuligerus*. **Letters in Applied Microbiology**. V.34, p.370-375, 2002.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001. p, 282-286.

LI, R., N.KHALEELI; C. A. TOWNSEND. Expansion of the clavulanic acid gene cluster: identification and in vivo functional analysis of three new genes required for biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 4087–4095, 2000.

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

LOCCI, R. *Streptomyces* and related Genera. in **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Williams, S. T.; Sharpe, M. D.; Holt, J. G. eds., Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A., p. 2451-2492, 1989.

LORENZANA, L. M.; PÉREZ-REDONDO, R.; SANTAMARTA, I.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Two oligopeptide-permease-encoding genes in the clavulanic acid cluster of *Streptomyces clavuligerus* are essential for production of the beta-lactamase inhibitor. **Journal of Bacteriology**, v. 186. p. 3431-3438, 2004.

MARANESI, G.L.; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*

ATCC 27064. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4 p. 509-514, 2005.

MARSH, E. N.; CHANG, M. D.; TOWNSEND, C. A. Two isozymes of clavamate central to clavulanic acid formation: cloning and sequencing of both genes from *Streptomyces clavuligerus*. **Biochemistry**. v. 31, p. 12648-12657, 1992.

MARTÍN, J. F.; DEMAIN, A. L. Control of antibiotic biosynthesis. **Microbiological Reviews**, v. 44, n. 2, p. 230-251, 1980.

MELLADO, E. L. M. LORENZANA, M. RODRÍGUEZ-SALIZ, B. DÍEZ, P. LIRAS, AND J. L. BARREDO. The clavulanic acid biosynthetic cluster of *Streptomyces clavuligerus*: genetic organization of the region upstream of the *car* gene. **Microbiology**. v. 149, p. 1427-1438, 2002.

METZGER, S., SARUBBI, E., GLASER, G.; CASHEL, M. Protein sequences encoded by the *relA* and *spot* genes of *Escherichia coli* are interrelated. **Journal of Biological Chemistry**. v. 264, p. 9122-9125, 1989.

MOLLE, V.; PALFRAMAN, W. J.; FINDLAY, K.C.; BUTTNER, M. J. WhiD and WhiB, homologous proteins required for different stages of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 1286-1295, 2000.

MOLLE, V.; BUTTNER, M. J. Different alleles of the response regulator gene *blmM* arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages. **Molecular Microbiology**, v. 36, p. 1265-1278, 2000.

MOSHER, R. H.; PARADKAR, A. S.; ANDERS, C.; BARTON, B.; JENSEN, S. E. Genes specific for the biosynthesis of clavamate metabolites antipodal to clavulanic acid are clustered with the gene for clavamate synthase 1 in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 43, n. 5, p. 1215-1224, 1999.

MUSIALOWSKI, M. S.; FLETT, F.; SCOTT, G. B.; HOBBS, G.; SMITH, C. P.; OLIVER, S. G. Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *Streptomyces coelicolor* chromosome is close to the *dnaA-gyrB* region. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 16, p. 5123-5125, 1994.

NEVES, A.A; VIEIRA, L.M.; MENEZES, J.C. Effects of preculture variability on clavulanic acid fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 6, p. 628-633, 2001.

NICHOLSON, N. H.; BAGGALEY, K. H.; CAEELS, R.; DAVISON, M.; ELSON, S. W.; FULSTON, M.; TYLER, J. W.; WORONIECKI, S. R. Evidence that the immediate biosynthetic precursor of clavulanic acid is its N-aldehyde analogue. **Journal of Chemical Society**, Chem Commun, v. 11, p. 1281-1282, 1994.

NODWELL, J. R.; YANG, M.; KUO, D.; LOSICK, R. Extracellular complementation and the identification of additional genes involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. **Genetics**, v. 151, p. 569-584, 1999.

NODWELL, J. R.; LOSICK, R. Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 1334-1337, 1998.

NODWELL, J.; MCGOVERN, K.; LOSICK, R. An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. **Molecular Microbiology**, v. 22, p. 881-893, 1996.

NYSTROM, T. Starvation, cessation of growth and bacterial ageing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 214-219, 1999.

PARADKAR, A. S.; AIDOO, K. A.; WONG, A.; JENSEN, S. E. Molecular analysis of beta-lactam resistance gene encoded within the cephamycin gene cluster of *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 6266-6274, 1996.

PATRICK, G.L. **An introduction to Medicinal Chemistry**. New York: Oxford University Press, 2001. p. 622.

PECZYNSKA-CZOCH, W., MORDARSKI, M. Actinomycete enzymes. In: GOODFELLOW, M., WILLIAMS, S. T., MORDARSKI, M. (Ed.). **Actinomycetes in Biotechnology**. Academic press, London, 1998. p. 219-283.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2nd ed.. Makron Books do Brasil Ltda, 1997. v.1-2.

PÉREZ-REDONDO, R.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Deletion of the *pyc* gene blocks clavulanic acid biosynthesis except in glycerol-containing medium: evidence for two different genes in formation of the C3 unit. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 22, p. 6922-6928, 1999.

PÉREZ-REDONDO, R.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. The *claR* gene of *Streptomyces clavuligerus*, encoding a LysR-type regulatory protein controlling clavulanic acid biosynthesis, is linked to the clavulanate-9-aldehyde reductase (*car*) gene. **Gene** v. 211, n. 2. p. 311-321, 1998.

PETINATE, S.D.G., MARTINS, R.M., COELHO, R.R.R., MEIRELLES, M.N.L., BRANQUINHA, A.B.V. Influence of Growth Medium in Proteinase and Pigment Production by *Streptomyces cyaneus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 173-177, 1999.

PIEPERSBERG, W. Pathway engineering in secondary metabolite-producing actinomycetes. **Critical reviews in biotechnology**, v. 14, p. 251-285, 1994.

PRIDHAM, T. G.; TRESNER, H. G. Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. In: BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. F., eds. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 8nd ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1974. p. 748-829.

PTILIK, J.; TOWNSEND, C.A. The fate of [2,3,3-²H₃, 1,2-¹³C₂]-D,L-glycerate in clavulanic acid biosynthesis. **Chemical Communications**, v. 1-2, p. 225-226, 1997.

REDDY, P. S.; RAGHAVAN, A.; CHATTERJI, D. Evidence for a ppGpp-binding site on *Escherichia coli* RNA polymerase: Proximity relationship with the rifampicin-binding domain. **Molecular Microbiology**, v. 15, p. 255-265, 1995.

REDENBACH, M.; KIESER, H. M.; DENAPAITE, D.; EICHNER, A.; CULLUM, J.; KINASHI, H.; HOPWOOD, D. A. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 77-96, 1996.

ROLINSON, G.N. Evolution of β -lactamases inhibitors. **Reviews of Infections Diseases**, v. 13, p. 5727-5732, 1991.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Isolation and biochemical characterization of *Streptomyces clavuligerus* mutants in the biosynthesis of clavulanic acid and cephamycin C. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 510-516, 1988.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTIN, J.F. Dissociation of cephamicyn 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 and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 892-897, 1996.

ROSA, J. C. **Influência das condições de transferência de oxigênio na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***. São Carlos, 2002. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

RYDING, N. J.; BIBB, MAUREEN, J.; MOLLE, V.; FINDLAY, K. C.; CHATER, K. F.; BUTTNER, M. J. New sporulation loci in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 5419-5425, 1999.

RYDING, N. J.; KELEMEN, G. H.; WHATLING, C. A.; FLARDH, K.; BUTTNER, M. J.; CHATER, K. F. A developmentally regulated gene encoding a repressor-like protein is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Molecular Microbiology**, v. 29, p. 343-357, 1998.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and biochemical parasitology**, p. 120-121, 2002.

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

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, p. 313-340, 1966.

SINGER, C.E.; AMES, B.N. Sunlight ultraviolet and bacterial DNA base ratios. **Science**, 170, p. 822-826, 1970.

SPIZEK, J.; TICHY, P. Some aspects of overproduction of secondary metabolites. **Folia Microbiologica**, v. 40, p. 43-50, 1995.

STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W.; WEBB, R.; WITT, D. Towards a molecular identification of streptomyces species in pure culture and in environmental samples. **Actinomycetologia**, v. 5, p. 38-44, 1991 a.

STACKEBRANDT, E.; WITT, D.; KEMMERLING, C.; KROPPESTEDT, R.; LIESACK, W. Designation of streptomyces 16 S and 23 S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1468-1477, 1991 b.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A. The development of inocula for industrial fermentation In: **Principles of Fermentation Technology**. New York: Oxford Pergamon Press, p. 108-119, 1984.

THIRKETTLE, J.E.; BALDWIN, J.E.; EDWARDS, J.; GRIFFIN, J.P.; SCHOFIELD, CH.J. The origin of the β -lactam carbons of clavulanic acid. **Chemical Communications**, v. 1-2, p. 1025-1026, 1997.

TAHLAN, K.; PARK, H. U.; WONG, A.; BEATTY, P. H.; JENSEN, S. E. Two sets of paralogous genes encode the enzymes involved in the early stages of clavulanic acid and clavam metabolite biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 930-939, 2004.

TAN, H.; YANG, H.; TIAN, Y.; WU, W.; WHATLING, C.A.; CHAMBERLIN, L.C.; BUTTNER, M. J.; NODWELL, J.; CHATER, K. F. The *Streptomyces coelicolor* sporulation-specific sigma WhiG form of RNA polymerase transcribes a gene encoding a ProX-like protein that is dispensable for sporulation. **Gene**, v. 212, p. 137-146, 1998.

TOWNSEND, C.A.; HO, M. Biosynthesis of clavulanic acid: Origin of the C3 unit. **Journal of the American Chemical Society**, 107, p. 1066-1068, 1985 a.

TOWNSEND, C. A.; HO, M. Biosynthesis of clavulanic acid: Origin of the C5 unit. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, p. 1065-1066, 1985 b.

TOWSEND, C. A. New reactions in clavulanic acid biosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 5, p. 583-589, 2002.

TROVATTI, E. **Desenvolvimento de meio de cultivo semi-sintético de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 em processo de produção de ácido clavulânico**. 2001. 65 f. Dissertação (mestrado) - UNESP Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2001.

VALENTINE, B.P.; BAILEY, C.R.; DOHERTY, A.; MORRIS, J.; ELSON, S.W.; BAGGALEY, K.H.; NICHOLSON, N.H. Evidence that arginine is a later metabolite intermediate that ornithine in the biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of the Chemical Society Chem Commun**, p. 1210-1211, 1993.

VAN SUIJDAN, J. C.; CALLOW, D. S. Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous moulds. **Biotechnology and bioengineering**, v. 23, p. 11-148, 1981.

VOLFF, J. N.; ALTENBUCHNER, J. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. **Molecular Microbiology** v. 27, n. 2, p. 239-246, 1998.

WARD, J. M.; HODGSON, J. E. The biosynthetic genes for clavulanic acid and cephamycin production occur as a super-cluster' in three *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 110 p. 239-242, 1993.

WEN, Z. T.; BROWNGARDT C.; BURNE R. A. Characterization of two operons that encode components of fructose-specific enzyme II of the sugar: phosphotransferase system of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205 p. 337-342, 2001.

WHITNEY, J. G.; BRANNON, D. R.; MABE, J. A.; WICKER, K. J. Incorporation of labelled precursors into A 16886B, a novel beta-lactam antibiotic produced by *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 3, p. 247-251, 1972.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G., eds. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore, Williams and Wilkins, 1989. v. 4, p. 2453-2492.

WILLIAMS, S. T.; HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H.; STALEY, J. T. **Bergey's Manual Determinative Bacteriology**, 1994. Baltimore, Williams and Wilkins, v.1.

WU, T. K.; BUSBY, R. W.; HOUSTON, T. A.; MCLLWAIN, D. B.; EGAN, L. A.; TOWNSEND, C. A. Identification, cloning, sequencing, and overexpression of the gene encoding proclavaminic amidino hydrolase and characterization of protein function in clavulanic acid biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 13, p. 3714-3720, 1995.

ZHANG, Z.; REN, J.; STAMMERS, D. K.; BALDWIN, J. E.; HARLOS, K.; SCHOFIELD, C. J. Structural origins of the selectivity of the trifunctional oxygenase clavaminic acid synthase. **Nature Structural Biology**, v.7, p. 127-133, 2000.