

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

**Produção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* nos genes *lat*,  
*cvm7P* e *rpoZ* e estudo de seus efeitos sobre a produção de ácido  
clavulânico**

Vanderlei Aparecido de Lima

Orientador: Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

São Carlos – SP

2010



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

**Produção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* nos genes *lat*,  
*cvm7P* e *rpoZ* e estudo de seus efeitos sobre a produção de ácido  
clavulânico**

Vanderlei Aparecido de Lima

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

São Carlos – SP

2010

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

L732pm

Lima, Vanderlei Aparecido de.

Produção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* nos genes *lat*, *cvm7P* e *rpoZ* e estudo de seus efeitos sobre a produção de ácido clavulânico / Vanderlei Aparecido de Lima. -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
126 f.

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

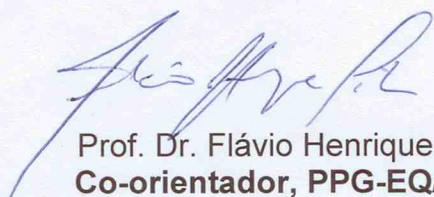
1. Engenharia genética. 2. Plasmídeos. 3. Conjugação bacteriana. 4. Conjugantes. 5. *Escherichia coli*. 6. Fermentação. I. Título.

CDD: 660.65 (20<sup>a</sup>)



MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **VANDERLEI APARECIDO DE LIMA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 11 DE AGOSTO DE 2010.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva  
**Co-orientador, PPG-EQ/UFSCar**




Profª Drª Daniela Morilha Néó Justino  
**UNICEP**



Prof. Dr. Humberto D'Muniz Pereira  
**IFSC/USP**



Profª Drª Andréa Soares da Costa Fuentes  
**DGE/UFSCar**



Drª Mônica Rosas da Costa lemma  
**DQ/UFSCar**



**Dedico este trabalho,**

A um anjo que conheci aqui na  
Terra, minha mãe, dona Valentina.

*In memoriam*

A minha esposa Patrícia e aos  
pequenos filhos, Rafael e Lucas.



## **Agradecimentos**

Ao professor Dr. Carlos Osamu Hokka, meu orientador, pelo incentivo, pelas idéias e pelo imenso apoio para a realização de meu estágio na Espanha.

A professora Dra. Paloma Liras, por sua orientação, pela aceitação de meu estágio em seu laboratório, por sua confiança e por me proporcionar um dos meus melhores anos de minha vida em León, meu agradecimento especial.

A Dra. Rosario Pérez-Redondo pelo desenvolvimento da tese, por sua orientação direta nos experimentos e pela contribuição efetiva neste estudo e que sem ela não seria possível a realização deste trabalho. A você, Rosma, meu sincero agradecimento "muchas gracias".

Ao professor Dr. Flávio Henrique da Silva, que aceitou ser meu co-orientador colaborando sempre com o andamento de minha tese.

A minha esposa, Patrícia, que sempre me apoiou ajudando a me organizar no andamento deste trabalho, por suas valiosas idéias, meu especial agradecimento.

Ao amigo Eliton da Silva Vasconcelos pelo apoio e pela imensa ajuda nas fermentações.

A prof. Dra. Isara Lourdes Cruz-Hernández pelas conversas, pela orientação e pelo apoio.

Ao amigo Luis Omar Dominguez Espinosa, pela amizade, pela sua generosa e valiosa contribuição no aprendizado da língua espanhola e apoio à nossa viagem a Espanha.

Aos meus pequenos, Rafael e Lucas, por termos passado juntos um tempo super agradável na Espanha.

Aos meus irmãos: Márcia, Cláudio e Deny, e ao meu pai, sempre me apoiando nesta carreira universitária, meu especial agradecimento.

As Minhas cunhadas, Lourdes, e Elaine pelo apoio, eu lhes agradeço.

A família que ganhei há alguns anos atrás, a família da matriarca dona Nice, meu muito obrigado pelo apoio incondicional.

Ao Juliano, a Luciane, ao Júnior e a Fernanda, obrigado pelo apoio.

Ao amigo Amadeus, técnico do laboratório, que sempre estava disposto a me ajudar, meu sincero agradecimento.

Ao amigo Clóvis, pelo apoio, pela amizade e por seus ensinamentos.

A Mônica lemma pelo apoio e pela ajuda, meu sincero agradecimento.

A Universidade Federal de São Carlos – UFSCar e ao programa de pós-graduação em engenharia química, em nome de seu coordendor, Alberto Colli Badino Jr., que também sempre me apoiou sem medir esforços.

A Universidade de León-Espanha pelo meu aceite na realização de minha tese.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado, aqui no Brasil e pela bolsa sanduíche na Universidade de León, Espanha.

---

## RESUMO

**LIMA, V. A. Produção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* nos genes *lat*, *cvm7P* e *rpoZ*, e estudo de seus efeitos sobre a produção de ácido clavulânico.** 2010. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos UFSCar, São Carlos-SP. 2010.

A biologia molecular e a engenharia genética têm se desenvolvido muito nos últimos anos e vários protocolos foram estabelecidos, apresentando novas metodologias capazes de alterar a genética de linhagens bacterianas de interesse industrial. O presente estudo teve por objetivos principais: (1) a construção dos seguintes plasmídeos:  $p\Delta lat$ ,  $p\Delta cmv7P$ ,  $pAMB4$  e  $pAMB3RpoZneo$ ; (2) a produção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* por disrupção gênica, por inserção de plasmídeo integrativo, e por replicação de plasmídeo multi-cópia em *Streptomyces clavuligerus* por conjugação bacteriana; (3) o estudo do efeito destas mutações na produção de ácido clavulânico e na atividade lipolítica. Na Espanha (Universidade de León), seis mutantes foram produzidos: *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr$ , *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta cmv7P::neo$ , *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr \Delta cmv7P::neo$ , *Streptomyces clavuligerus*  $pRAneoZ$ , *Streptomyces clavuligerus*  $pAMB4$  e *Streptomyces clavuligerus*  $pAMB3RpoZneo$ . Em León, as fermentações foram realizadas com o meio de cultura SA e somente com os mutantes *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr$  e *Streptomyces clavuligerus*  $pRAneoZ$ . Nestas fermentações não houve diferença estatística significativa ao nível de 5% de significância, pela análise de variância (ANOVA). No Brasil, as fermentações com todos os mutantes no meio de cultura a base de óleo e farinha de soja, mostraram um padrão diferenciado na produção de ácido clavulânico. Os mutantes *Streptomyces clavuligerus*  $pRAneoZ$  e *Streptomyces clavuligerus*  $pAMB3RpoZneo$  apresentaram títulos de ácido clavulânico superiores quando comparados com a linhagem selvagem ( $\alpha = 5\%$ ). O duplo mutante *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr \Delta cmv7P::neo$ , ao contrário do esperado, apresentou os níveis mais baixos de ácido clavulânico e em relação a sua linhagem parental. Os mutantes *Streptomyces clavuligerus*  $pRAneoZ$  e o mutante controle *Streptomyces clavuligerus*  $pAMB4$ , apresentaram a maior atividade lipolítica ao nível de 5% de significância. O duplo mutante por sua vez, apresentou as menores atividades lipolíticas. Uma relação direta entre os níveis de ácido clavulânico e a produção de lipase foi observada. Todos os mutantes produzidos neste trabalho poderiam ser fermentados em biorreator de bancada para se avaliar os níveis de produção de ácido clavulânico e de lipase. A construção de um novo duplo mutante denominado, *Streptomyces clavuligerus*  $p\Delta lat::apr RpoZneo$ , a partir dos existentes, poderia ser de grande interesse para investigar esta nova combinação de mutação na produção de ácido clavulânico e na atividade lipolítica.

**Palavras-chave:** plasmídeos; integrativo; replicativo; *Escherichia coli* ET12567[PUZ8002]; conjugação; conjugantes; fermentação; lipase; atividade lipolítica; biotecnologia de microrganismos.

## ABSTRACT

**LIMA, V. A. Production of *Streptomyces clavuligerus* mutants in the genes *lat*, *cvm7P* and *rpoZ*, and study their effects on acid production clavulanic. 2010.** Thesis (Doctorate.). Graduate Program in Chemical Engineering. Federal University of São Carlos UFSCar, São Carlos-SP. 2010.

Molecular biology and genetic engineering have been deployed widely in recent years, several protocols have been established, presenting new methodologies capable of altering the genetics of bacterial strains industrial interest. This research had as main objectives: (1) the construction of the following plasmids: p $\Delta$ lat, pAMB4 and pAMB3RpoZneo, (2) the production of *Streptomyces clavuligerus* mutants by gene disruption, by insertion of plasmid integrative, and by replication of multi-copy plasmid in *Streptomyces clavuligerus* by conjugation and (3) study the effect of these mutations on clavulanic acid production and lipolytic activity. In Spain (University of Leon), six mutants *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta$ lat::apr, *Streptomyces clavuligerus* cvm7P::neo, *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta$ Lat::apr  $\Delta$ cvm7P::neo, *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ, *Streptomyces clavuligerus* pAMB4 and *Streptomyces clavuligerus* pAMB3RpoZneo were produced. In Leon, the fermentations were performed with the SA culture medium and only with the mutants *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta$ lat::apr and *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ. In this case, there was no statistically significant difference at 5% probability by analysis of variance (ANOVA). In Brazil, the fermentations with all mutants in the culture medium-based oil and soybean meal, showed a different pattern in the production of clavulanic acid. The mutants *Streptomyces clavuligerus* pAMB3RpoZneo and *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ ( $\alpha = 5\%$ ) showed clavulanic acid titles higher when compared with the wild type. The double mutant *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta$ lat::apr  $\Delta$ cvm7P::neo, contrary to expectations, showed the lowest levels of clavulanic acid in relation to its parental strain. *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ mutant and the mutant *Streptomyces clavuligerus* pAMB4 control, showed the highest lipolytic activity at 5% probability. The double mutant in turn, had the lowest lipolytic activities. A direct relationship between levels of clavulanic acid and lipase production was observed. All mutants produced in this work could be fermented into bioreactor to assess production levels of clavulanic acid and lipase. The construction of a new double mutant named *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta$ lat::apr RpoZneo from existing ones mutant could be of great interest to investigate this new combination of mutations on clavulanic acid production and lipolytic activity.

Key-words: plasmids; integrative; replicative; *Escherichia coli* ET12567[PUZ8002]; conjugation; exconjugants; fermentation; lipase; lipolytic activity; microbial biotechnology.



---

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
1.1 Objetivos .....	04
<b>2. REVISAO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>06</b>
2.1 Classificação de <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	06
2.1.1 Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> .....	06
2.2 <i>Streptomyces</i> como produtor de metabólitos secundários .....	07
2.3 Antibióticos beta-lactâmicos e ácido clavulânico produzidos por <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	08
2.4 Precursores e biosíntese de ácido clavulânico .....	10
2.5 Biossíntese de cefamicina C .....	15
2.6 Biossíntese de clavamas .....	19
2.7 Genes regulatórios específicos nas biossínteses de Cefamicina C e ácidos clavulânico em <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	20
2.8 Lipases e atividade lipolítica em <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	22
2.9 Métodos e estratégias para aumentar o rendimento de metabólitos secundários em actinomicetos .....	24
2.10 O método da disrupção gênica para o estudo de um gene .....	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 Linhagens bacterianas .....	32
3.2 Plasmídeos .....	35
3.3 Meios de cultivo .....	38
3.3.1 Usos gerais .....	38
3.3.2 Meios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> .....	38
3.3.3 Meios de cultivo para <i>S. clavuligerus</i> .....	39
3.4 Enzimas e sistemas comerciais (kits) .....	40
3.5 Antibióticos e aditivos .....	40
3.6 Metodologia .....	42
3.6.1 Isolamento, purificação e amplificação de DNA .....	42
3.6.2 Extração de DNA de <i>Escherichia coli</i> .....	45
3.6.3 Extração de DNA genômico de <i>S. clavuligerus</i> .....	45

---

3.6.4 Reações de polimerização em cadeia PCR .....	45
3.6.5 Análise dos ácidos nucleicos em gel de agarose .....	46
3.6.6 Determinação da concentração de DNA .....	46
3.7 Dosagem de ácido clavulânico .....	46
3.7.1 Dosagem por bioensaio .....	46
3.7.2 Dosagem por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) .....	47
3.8 Dosagem de cefamicina C .....	47
3.9 Transformações bacterianas .....	48
3.9.1 Transformação de <i>Escherichia coli</i> .....	48
3.9.2 Conjugação de <i>S. clavuligerus</i> .....	48
3.10 Conservações das linhagens .....	50
3.11 Fermentações em incubadora rotatória orbital .....	50
3.12 Ensaio da atividade lipolítica pelo método do para-nitrofenilpalmitato (pNPP) .....	51
3.13 Sequenciamento de DNA .....	51
3.14 Construções dos plasmídeos .....	52
3.14.1 Construções dos mutantes por disrupção gênica .....	52
3.14.1.1 Construção do plasmídeo pJP37-acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699 para produzir o mutante <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr$ por disrupção do gene <i>lat</i> ... ..	52
3.14.1.2 Construção do plasmídeo pSKCPL12neoCPL78Hig para produzir o mutante <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta cvm7P::neo$ por disrupção do gene <i>cvm7P</i> da rota biossintética das clavamas 5S, resistente a canamicina e higromicina .....	63
3.14.1.3 Construção do duplo mutante <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr \Delta cvm7P::neo$ .....	75
3.14.2 Construção dos mutantes por inserção do gene <i>rpoZ</i> de <i>Streptomyces coelicolor</i> no genoma de <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	76
3.14.2.1 Plasmídeo mono-cópia pRAneoZ para a inserção do gene <i>rpoZ</i> de <i>Streptomyces coelicolor</i> no genoma de <i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	76
3.14.2.2 Plasmídeo pAMB4 utilizado como controle do plasmídeo multi-cópia do gene <i>rpoZ</i> de <i>S. coelicolor</i> .....	81
3.14.2.3 Plasmídeo pAMB3rpoZneo multi-cópia do gene <i>rpoZ</i> de <i>S. coelicolor</i> .....	84
3.15 Softwares utilizados e análise estatística .....	85
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
4.1 Inativação da rota biossintética da cefamicina C pela disrupção do gene <i>lat</i> .....	86

---

4.2 Produção de ácido clavulânico por <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr$ e <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr \Delta cvm7P::neo$ .....	89
4.2.1 Produção de ácido clavulânico em meio SA por <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr$ e <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr \Delta cvm7P::neo$ .....	89
4.2.2 Produção de ácido clavulânico em meio a base de óleo vegetal por <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr$ e <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr \Delta cvm7P::neo$ .....	91
4.2.3 Atividade lipolítica por <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr$ e por <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr \Delta cvm7P::neo$ .....	94
4.3 Produção de ácido clavulânico por <i>Streptomyces clavuligerus</i> pRAneoZ .....	99
4.3.1 Produção de ácido clavulânico por <i>Streptomyces clavuligerus</i> pRAneoZ em meio de cultivo SA .....	99
4.3.2 Produção de ácido clavulânico por <i>Streptomyces clavuligerus</i> pRAneoZ em meio de cultivo a base de óleo soja .....	101
4.3.3 Atividade lipolítica de <i>Streptomyces clavuligerus</i> pRAneoZ .....	103
4.4 Análise de ácido clavulânico em cultivo a base de óleo e farinha de soja da linhagem selvagem e dos mutantes <i>Streptomyces clavuligerus</i> pAMB4 e <i>Streptomyces clavuligerus</i> pAMB3RpoZneo .....	104
4.4.1 Atividade lipolítica da linhagem selvagem e dos mutantes <i>Streptomyces clavuligerus</i> pAMB4 e <i>S. clavuligerus</i> pAMB3RpoZneo .....	106
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>110</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>113</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Linhagens utilizadas neste trabalho .....	33
<b>Tabela 2.</b> Plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho. Os mapas detalhados dos vetores construídos no decorrer deste estudo são mostrados nas figuras 14, 21, 23, 24, 28 e 29.....	36
<b>Tabela 3.</b> Antibióticos e aditivos utilizados neste trabalho .....	41
<b>Tabela 4.</b> Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....	43
<b>Tabela 5.</b> Atividade lipolítica encontrada em vários microrganismos .....	97

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura do ácido clavulânico (LIRAS e RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2000). O anel de quatro membros a esquerda é denominado beta-lactâmico e o anel de cinco membros a direita é chamado de oxazolidino. .... 09
- Figura 2.** (A) Organização do agrupamento de genes de cefamicina C, (B) ácido clavulânico, (C) parálogos de ácido clavulânico e (D) clavamas. Nota-se que os genes *pcbR* e *ceaS2* estão incluídos em A e B para indicar que ambos agrupamentos são adjacentes. Os tamanhos dos genes não estão em escala (TAHLAN *et al.* 2004). .... 12
- Figura 3.** Rota biossintética para ácido clavulânico e clavamas. Os passos entre ácido N-glycylclavaminic e clavaldeído, ou entre ácido clavamínico e 2-carboximetilodenemclavama, ainda são desconhecidos. A formação seqüencial das diferentes clavamas pode ser deduzida dos produtos formados pelos diferentes mutantes, mas não há conhecimento das enzimas envolvidas (LIRAS *et al.*, 2008). .... 13
- Figura 4.** Rota biossintética para a produção de cefamicina C. Em parênteses nomes dos genes que codificam suas correspondentes enzimas (LIRAS, 1999). .... 16
- Figura 5.** Um triglicerídeo típico de lipídio é apresentado, usando a designação sn para as posições do glicerol. .... 23
- Figura 6.** Esquema mostrando a troca alélica. Os genes, A e B no genoma completo do organismo estão sob a forma de fragmentos gênicos no plasmídeo. .... 31
- Figura 7.** Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR obtidos por amplificação do fragmento de 1437 pb, do gene *pcbAB* com os iniciadores CPL5 E CPL6. M = marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ . As designações F1-F4 correspondem aos produtos PCR com 1 mM  $Mg^{+2}$ , F5-F8 1,5 mM  $Mg^{+2}$  e F9-F12 com 2,5 mM  $Mg^{+2}$ . As bandas específicas do fragmento gênico estão representadas pela seta e seu respectivo tamanho. .... 53
- Figura 8.** Digestão do plasmídeo pGEM-CPL5-6 com as enzimas de restrição *HindIII/XhoI*. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8%. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{EcoRI/HindIII}$ , P11-P15 = plasmídeos dos clones 11 a 15. As bandas específicas dos fragmentos gênicos estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos. .... 54
- Figura 9.** Análise eletroforética das digestões do fragmento CPL5-6 e do vetor pULJP37. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pGEM-CPL5-6 com a digestão dupla de *HindIII/XhoI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII/EcoRI}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , F = fragmento CPL5-6 e P = plasmídeo pULJP37. As bandas específicas do fragmento gênico e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos. .... 56

- Figura 10.** Análise eletroforética das digestões dos clones contendo os plasmídeos pULJP37-CPL5-6. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pULJP37-CPL5-6 com a digestão dupla de *HindIII/XhoI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{pst}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , e as bandas de 6,6 kb e 1,4 kb correspondem: ao fragmento CPL5-6 e ao plasmídeo pULJP37, respectivamente. ....57
- Figura 11.** Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pULJP37-CPL5-6 e pIJ773. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pULJP37-CPL5-6 com a digestão das enzimas *HindIII* e *EcoRI* e da digestão dupla do plasmídeo pIJ773. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , P1 = pULJP37-CPL5-6 (8 kb) digerido com *EcoRI*, P2 = pULJP37-CPL5-6 digerido com *HindIII* e F (fragmento) = gene *acc(3)IV* (1,4 kb) obtido de pIJ773. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.....58
- Figura 12.** Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pULJP37-*acc(3)IV-CPL5-6*. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pULJP37-*acc(3)IV-CPL5-6* com a digestão dupla das enzimas *HindIII/ClaI* e digestão da enzima *XhoI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , M3 = Marcador molecular  $\lambda_{pst}$ , colunas P1-P3 = plasmídeo pULJP37-*acc(3)IV-CPL5-6* digerido com *XhoI*, colunas P4-P6 = plasmídeo pULJP37-*acc(3)IV-CPL5-6* digerido com *HindIII/ClaI*. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos. ....59
- Figura 13.** Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pULJP37-*acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699*. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pULJP37-*acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699* com a digestão da enzima *XhoI* e *XbaI*. Os tamanhos dos fragmentos a esquerda se referem à digestão com a enzima *XbaI* e a direita com *XhoI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , M3 = Marcador molecular  $\lambda_{pst}$ , P1 = plasmídeo pULJP37-*acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699* digerido com *XbaI*, P2 = plasmídeo pULJP37-*acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699* digerido com *XhoI*. As bandas específicas dos fragmentos gênicos estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.....61
- Figura 14.** Mapa do vetor pULJP37-*acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699* construído nesta tese. ....62
- Figura 15.** Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pSK-CPL1-2. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pSK-CPL1-2 com a digestão da enzima *NotI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , P1-P17 = plasmídeo pSK-CPL1-2 digerido com *NotI*. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos. ....64

**Figura 16.** Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pSK-CPL7-8. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pSK-CPL7-8 com a digestão dupla das enzimas *EcoRV/PstI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , P1-P16 = plasmídeo pSK-CPL7-8 digeridos com *EcoRV/PstI*. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.....66

**Figura 17.** Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pSK-CPL1-2-CPL7-8 com a digestão dupla das enzimas *EcoRV/PstI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , P1-P18 = plasmídeo pSK-CPL1-2-CPL7-8 digeridos com *EcoRV/PstI*. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos. ....67

**Figura 18.** Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pSK-CPL1-2-CPL7-8 com a digestão da enzima *XbaI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , F1 = fragmento de 1.385 pb (gene *neo*) do plasmídeo pTC192-km digerido com *XbaI*, P1 = 1  $\mu$ L (diluição 1:2000) e P2 = 5  $\mu$ L (diluição 1:2000), ambos do plasmídeo pSK-CPL1-2-CPL7-8 digeridos com *XbaI*. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.....69

**Figura 19.** Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-*neo*. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pSK-CPL1-2-CPL7-8-*neo* com a digestão dupla de *EcoRV/PstI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , P1-P8 = plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-*neo* digeridos com *EcoRV/PstI*. As bandas específicas dos fragmentos gênicos estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.....70

**Figura 20.** Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-*neo*. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pSK-CPL1-2-CPL7-8-*neo* com a digestão das enzimas *EcoRV*, *SacI* e *XbaI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , P1-P3 = plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-*neo* digeridos com *EcoRV*, P4-P6 = plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-*neo* digeridos com *SacI* e P7-P9 = plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-*neo* digeridos com *XbaI*. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos. ....71

**Figura 21.** Mapa esquemático do vetor pSK-CPL1-2-*neo*-CPL7-8-*hig* utilizado para a disrupção do gene *cvm7P* de *Streptomyces clavuligerus*. ....72



- Figura 22.** Análise de restrição dos plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo-hig, em gel de agarose 0,8% mostrando os fragmentos após as digestões com as enzimas *Pst*I. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{HindIII}}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{HE}}$ , M3 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{Pst}}$ , P4-P32 = plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo-hig digeridos com *Pst*I e PP = plasmídeo parental pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo digeridos com *Pst*I. A esquerda estão as bandas específicas liberadas na digestão dos plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo-hig e a direita, o seu parental pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo. Estas bandas específicas dos fragmentos gênicos estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos. ....73
- Figura 23.** Mapa esquemático do vetor pRAneoZ para inserção de uma cópia do gene *rpoZ* de *Streptomyces coelicolor* em *Streptomyces clavuligerus*. ....77
- Figura 24.** Mapa esquemático do vetor pRA+. Este plasmídeo serve de base para a construção do vetor pRAneoZ.....78
- Figura 25.** Análise eletroforética das reações do produto de PCR utilizando DNA genômico dos mutantes de *Streptomyces clavuligerus pRAneoZ*. Gel de agarose 0,8% mostrando os produtos de PCR. M1 e M2 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{Pst}}$ , F1-F14 = fragmento de 2,2 kb amplificado por PCR utilizando o DNA genômico dos mutantes *Streptomyces clavuligerus pRAneoZ*. As bandas específicas dos produtos de PCR estão representadas pela seta e seu respectivo tamanho. ....79
- Figura 26.** Análise eletroforética das digestões do DNA genômico dos mutantes de *Streptomyces clavuligerus pRAneoZ*. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do DNA genômico dos mutantes com as digestões das seguintes enzimas: *Bam*HI, *Eco*RV, *Nco*I, *Xba*I e *Bam*HI/*Xba*I. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{HindIII}}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{HE}}$ , M3 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{Pst}}$ , F1-F7 = fragmento/plasmídeo linearizado, digeridos com as enzimas de restrição; *Bam*HI, *Nco*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Xba*I, *Xho*I, e *Bam*HI/*Xba*I, respectivamente. ....80
- Figura 27.** Análise eletroforética das digestões do plasmídeo pAMB4. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do plasmídeo dos mutantes com as digestões das seguintes enzimas: *Bam*HI e *Eco*RI/*Xho*I. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{HE}}$ , P2-P18 = fragmentos liberados quando digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI (a esquerda no gel) e P2-P18 = fragmentos liberados na digestão dupla com as enzimas de restrição *Eco*RI/*Xho*I (a direita no gel). As bandas específicas dos fragmentos gênicos estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos. ....82
- Figura 28.** Mapa esquemático do plasmídeo pAMB4, com a origem de replicação oriT, e cassete de resistência a ampicilina e a canamicina.....83
- Figura 29.** Mapa esquemático do plasmídeo pAMB3RpoZneo, com a origem de replicação oriT, cassete de resistência a ampicilina e a canamicina e o gene *RpoZ* de *Streptomyces coelicolor*.....85



<b>Figura 30.</b> Análise eletroforética da amplificação dos produtos de PCR utilizando o par de iniciadores LAT-AK-F e LAT-AK-R, desenhados para amplificar um fragmento de 547 pb de gene <i>lat</i> . M1 = Marcador molecular $\lambda_{HE}$ , M2 = Marcador molecular $\lambda_{pst}$ , F1 = fragmento de 547 pb do gene <i>lat</i> da linhagem selvagem de <i>S. clavuligerus</i> , C9-C18 = colunas no gel de agarose com DNA molde dos respectivos clones mutantes de <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr$ .	87
<b>Figura 31.</b> Bioensaio mostrando a produção de cefamicina C pela linhagem selvagem (wt). Note que os mutantes (números 12, 13 e 18) <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr$ , não produzem Cef C.	88
<b>Figura 32.</b> Produção de ácido clavulânico em meio SA da linhagem selvagem e mutantes <i>S. clavuligerus</i> $\Delta lat::apr$ . (A) produção específica, (B) concentração de ácido clavulânico e (C) concentração de DNA.	90
<b>Figura 33.</b> Produção de ácido clavulânico em meio a base de óleo vegetal e farinha de soja da linhagem selvagem e mutante <i>S. clavuligerus</i> $\Delta lat::apr$ e <i>S. clavuligerus</i> $\Delta lat::apr \Delta cvm7P::neo$ .	92
<b>Figura 34.</b> Atividade lipolítica do sobrenadante dos cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> selvagem e dos mutantes, <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr$ e <i>Streptomyces clavuligerus</i> $\Delta lat::apr \Delta cvm7P::neo$ .	95
<b>Figura 35.</b> Produção de ácido clavulânico em meio SA da linhagem selvagem e mutantes <i>S. clavuligerus</i> RA e <i>S. clavuligerus</i> pRAneoZ. (A) produção específica, (B) concentração de DNA e (C) concentração de ácido clavulânico.	100
<b>Figura 36.</b> Produção de ácido clavulânico em meio a base de óleo e farinha de soja, da linhagem selvagem e mutantes <i>S. clavuligerus</i> RA e <i>S. clavuligerus</i> pRAneoZ.	102
<b>Figura 37.</b> Atividade lipolítica do sobrenadante dos cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> selvagem e dos mutantes, <i>Streptomyces clavuligerus</i> RA e <i>Streptomyces clavuligerus</i> pRAneoZ.	103
<b>Figura 38.</b> Produção de ácido clavulânico em meio a base de óleo e farinha de soja, da linhagem selvagem e mutantes <i>S. clavuligerus</i> pAMB4 e <i>S. clavuligerus</i> pAMB3RpoZneo.	105
<b>Figura 39.</b> Atividade lipolítica do sobrenadante dos cultivos de <i>Streptomyces clavuligerus</i> selvagem e dos mutantes, <i>Streptomyces clavuligerus</i> pAMB4 e <i>Streptomyces clavuligerus</i> pAMB3RpoZneo.	107
<b>Figura 40.</b> Gráfico da produção de ácido clavulânico em relação a atividade lipolítica dos mutantes <i>Streptomyces clavuligerus</i> : a) pRAneoZ e b) pAMB3RpoZneo.	108



## 1. INTRODUÇÃO

O ácido clavulânico é um potente inibidor de beta-lactamase (HODGSON et al., 1995) e é produzido naturalmente por *Streptomyces clavuligerus*. Esta molécula de interesse farmacêutico é capaz de inibir uma grande variedade de  $\beta$ -lactamases comumente encontradas em microrganismos resistentes à penicilinas e cefalosporinas (READING e COLE, 1977). Atualmente este inibidor é utilizado em combinação com antibióticos, para tratamentos de infecções bacterianas. A ação do ácido clavulânico na forma de clavulanato estende o espectro do antibiótico, abrangendo uma variedade maior de microrganismos, incluindo aqueles resistentes a outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

Por esta razão, existe grande interesse neste produto e inúmeros trabalhos científicos têm sido realizados no sentido de aumentar os títulos de ácido clavulânico. Dois tipos básicos de trabalhos têm sido realizados: uma linha de pesquisa visa melhorar as condições de cultivo de *Streptomyces clavuligerus*, seja por parâmetros físico-químicos, ou pelos nutrientes existentes no meio de cultura (DEVI, et al., 2000; CHEN-KUO, et al., 2003; WANG, et al., 2005; MARANESI et al., 2005; TEODORO, et al., 2006; ORTIZ, et al., 2007). A outra linha de pesquisa visa à manipulação do DNA da linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* para se alcançar uma maior produção de ácido clavulânico e de cefamicina C.

*Streptomyces clavuligerus* produz além do ácido clavulânico um antibiótico  $\beta$ -lactâmico, a cefamicina C. A produção de cefamicina C em *S. clavuligerus* ocorre em paralelo com a de ácido clavulânico. Os genes biossintéticos para ambos os

compostos estão adjacentes no genoma formando um superaglomerado de cerca de 60 kb.

A via biossintética que conduz ao ácido clavulânico está bem compreendida atualmente. O trecho até a produção do ácido clavamínico é compartilhado para a biossíntese das clavamas 5S. Porém, a partir deste ponto, pouco se sabe sobre os passos finais que conduzem à biossíntese especificamente, dessas clavamas 5S.

A biologia molecular e a engenharia genética têm se desenvolvido muito nos últimos anos e vários protocolos foram estabelecidos, apresentando novas metodologias capazes de alterar a genética de linhagens bacterianas de interesse comercial. Com o conhecimento de elementos chaves nos processos fermentativos e na síntese de metabólitos secundários, tais como: a clonagem e a interrupção gênica (JIN, et al., 2004; FUENTE, et al., 2002; PARADKAR, et al., 2001; TRINH-VIET, et al., 2007; TAHLAN, et al., 2007; LI e TOWNSEND, et al., 2006) e a duplicação/inserção de genes alvos, têm sido possível aumentar os títulos de certos metabólitos secundários (BALTZ, 2001). Estes trabalhos baseiam-se na construção de plasmídeos recombinantes, os quais são inseridos em *Escherichia coli* e posteriormente transferidos para *Streptomyces clavuligerus* por meio de conjugação bacteriana. Nos mutantes construídos se investiga os efeitos destas mutações nas rotas biossintéticas de interesse.

A conexão entre replicação e a propagação de uma unidade genética é fornecida pela conjugação bacteriana, na qual um genoma plasmidial ou cromossomo hospedeiro é transferido de uma bactéria para outra. As bactérias conjugantes são inicialmente conectadas quando fímbrias da doadora estabelecem contato com a bactéria receptora. Estes são os princípios básicos para a

---

transferência de um plasmídeo, preceito este utilizado pela engenharia genética para a construção de mutantes.

Nesta linha de pesquisa, dois grandes grupos de pesquisas sobre a genética dos metabólitos secundários em *Streptomyces clavuligerus* podem ser citados; um grupo liderado pelos professores Dra. Paloma Liras e Dr. Juan Francisco Martín, na Universidade de León – Espanha, e outro grupo liderado pela Dra. Susan E. Jensen, na Universidade de Alberta, no Canadá. Existem também outros pesquisadores distribuídos, por exemplo, na Inglaterra, nos Estados Unidos e no Japão, que contribuem para o entendimento da produção de ácido clavulânico, de cefamicina C e de outras substâncias com atividade biológica provenientes de espécies de *Streptomyces*.

O grupo de pesquisa liderado pela professora Dra. Paloma Liras sempre investigou os mecanismos implicados na genética de *Streptomyces* (PÉREZ-LLARENA, et al., 1998; PÉREZ-REDONDO, et al., 1998; LIRAS, P., 1999; PÉREZ-REDONDO, et al., 1999; RODRÍGUEZ-GARCÍA, et al., 2000; LIRAS, P. e RODRÍGUEZ-GARCÍA, A., 2000; MELLADO, et al., 2002; GOMEZ-ESCRIBANO, et al., 2008; LIRAS, et al., 2008). Estas referências mostram alguns de seus trabalhos no estudo dos genes biossintéticos e reguladores envolvidos na produção de ácido clavulânico e de cefamicina C. Foi inserido neste grupo e nesta linha de pesquisa que o presente estudo foi desenvolvido.

Portanto, é de grande interesse determinar se a elaboração dos distintos mutantes teria efeitos benéficos sobre a produtividade de ácido clavulânico.

## 1.1 Objetivos

### *Objetivo geral:*

O presente estudo teve como objetivo principal a construção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* para estudo do efeito das mutações induzidas na produção de ácido clavulânico e na atividade lipolítica.

### *Objetivos específicos:*

A pesquisa teve como objetivos específicos:

- i. Construção dos plasmídeos recombinantes; pJP37-acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699, pSKCPL1-2neoCPL7-8Hig, pAMB4 e pAMB3RpoZneo;
- ii. Interrupção do gene *lat* da rota biossintética da cefamicina C por disrupção gênica e pelo evento de recombinação homóloga em dois pontos;
- iii. Interrupção do gene *cvm7P* da rota biossintética das clavamas 5S por disrupção gênica e pelo evento de recombinação homóloga em dois pontos;
- iv. Inserção de uma cópia do gene *rpoZ* de *Streptomyces coelicolor* em *Streptomyces clavuligerus* por integração genômica;
- v. Inserção de várias cópias do gene *rpoZ* de *Streptomyces coelicolor* em *Streptomyces clavuligerus* por replicação autônoma;
- vi. Produção dos mutantes da linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* por conjugação bacteriana;
- vii. Cultivo das linhagens selvagem e mutantes em incubadora rotatória;
- viii. Avaliação da produção de ácido clavulânico no caldo fermentativo dos cultivos das linhagens, selvagem e mutantes;

- ix. Avaliação da produção de lipase no caldo fermentativo dos cultivos das linhagens, selvagem e mutantes;
- x. Avaliação das produções de ácido clavulânico e de lipase por meio das análises estatísticas.

## 2. REVISAO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Classificação de *Streptomyces clavuligerus*

*Streptomyces clavuligerus* é um actinomiceto com uma alta porcentagem de G+C em seu DNA (CHATER e HOPWOOD, 1993). Sua classificação está baseada em características morfológicas, químicas, nutricionais ou fisiológicas (WILLIAMS et al., 1983a; 1983b), e na sequência dos genes de RNAr 16S (STACKEBRANDT et al., 1992; RAGHAVA et al., 2000). 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*.

Os microrganismos do gênero *Streptomyces* são aeróbios restritos, que desenvolvem micélio estável formado por filamentos ramificados chamados hifas, e que formam grandes cadeias de esporos nos extremos das hifas aéreas (LECHEVALIER, 1989).

#### 2.1.1 Ciclo de vida de *Streptomyces*

*Streptomyces* possuem um ciclo de vida muito complexo. Os esporos, resistentes a condições climáticas adversas, estão normalmente presentes no solo. Quando as condições ambientais proporcionam a umidade e nutrientes necessários, os esporos germinam utilizando a energia proporcionada pelo principal componente



---

do esporo, o dissacarídeo trealose. A germinação termina com o início da formação de um filamento, que requer fontes de carbono e nitrogênio disponíveis como suprimentos (ESCRIBANO, 2006). O crescimento ocorre a partir da ponta dos filamentos, sendo freqüentemente acompanhado pela formação das ramificações, de modo que a fase vegetativa consiste em uma matriz complexa, fortemente entrelaçada, originando um micélio compacto e convoluto e, subseqüentemente uma colônia (KELEMEN e BUTTNER, 1998). À medida que a colônia envelhece, formam-se filamentos aéreos característicos, denominado 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).

## **2.2 *Streptomyces* como produtor de metabólitos secundários**

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* (ESCRIBANO, 2006). Os metabólitos secundários são compostos não essenciais para o crescimento e sobrevivência do organismo, mostram uma grande diversidade de estruturas químicas complexas e são tipicamente produzidos depois de entrar em fase estacionária de crescimento (MARTÍN; DEMAIN, 1980). A iniciação da formação do micélio aéreo em cultivos sólidos coincide com a produção de diversos metabólitos secundários, de modo que ambos os processos estão associados (CHATER e MERRICK, 1979; CHALLIS e HOPWOOD, 2003). Apesar disso, *Streptomyces coelicolor* é o microrganismo em que os mecanismos reguladores comuns foram mais estudados, e se conhece, por

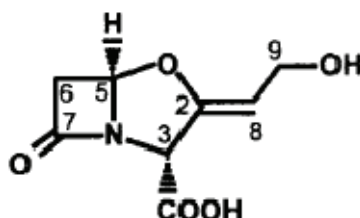
exemplo, que os mutantes *bld* não são capazes de desenvolver hifas aéreas e que estão alterados também na biossíntese de actinorrodina, undecilprodigiosina, metilenomicina e um antibiótico dependente de cálcio (CHAMPNESS, 1988). Os metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* incluem sideróforos, agentes antitumorais, promotores de crescimento de plantas, herbicidas, imunossupressores e antibióticos (KIESER et al., 2000). A maioria destes metabólitos secundários tem uma atividade antibiótica, de modo que 66% de todos os antibióticos conhecidos são produzidos por actinomicetos.

### **2.3 Antibióticos beta-lactâmicos e ácido clavulânico produzidos por *Streptomyces clavuligerus***

Antibióticos beta-lactâmicos são produzidos por fungos filamentosos e bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (BRAKHAGE, 2005). *Streptomyces clavuligerus* produz o antibiótico beta-lactâmico cefamicina C (CefC), isopenicilina N e o inibidor da enzima beta-lactamase, o ácido clavulânico (AC) (WANG et al., 2005; SANTAMARTA, 2002), entre outros compostos bioativos. Desses compostos, o mais conhecido é o ácido clavulânico, que possui baixa atividade antibiótica, mas é um potente inibidor da beta-lactamase. Devido a esta característica de inibição da beta-lactamase, o AC é usado clinicamente em combinação com antibióticos beta-lactâmicos convencionais no tratamento de infecções causadas por bactérias que são resistentes a estes antibióticos. “Augmentin”, uma mistura de amoxicilina e AC, é o medicamento mais amplamente prescrito para essas combinações, com valor de mercado que ultrapassa um bilhão de dólares anualmente (PARADKAR et al., 2001). A versão brasileira deste tipo de medicamento é o Clavulin<sup>®</sup>, o qual é uma

combinação de 500 mg de amoxicilina e 125 mg de ácido clavulânico na forma de clavulanato de potássio (GlaxoSmithKline do Brasil Ltda).

Ácido clavulânico possui uma estrutura clavama e uma característica estereoquímica *3R*, *5R*; essencial para a ação como uma molécula inibitória das  $\beta$ -lactamases. O núcleo (figura 1) do anel assemelha-se aos das penicilinas, mas o anel de cinco membros (anel oxazolidino) tem um átomo oxigênio ao invés de um átomo de enxofre e uma cadeia lateral C-6 acilamina, ausente nas penicilinas (LIRAS e RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2000).



**Figura 1. Estrutura do ácido clavulânico (LIRAS e RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2000). O anel de quatro membros a esquerda é denominado beta-lactâmico e o anel de cinco membros a direita é chamado de oxazolidino.**

Ácido clavulânico inibe a maioria das classes de  $\beta$ -lactamases (grupos 2a, 2b, 2b', 2c, 2e da classificação proposta por BUSH (1989a, b), e as hidrolases cloxacilina enzimas da classe D (grupo 2d), mas é pouco ativo contra as cefalosporinas de classe C (grupo 1) e inativas contra metaloenzimas dependentes de zinco, classe B (grupo 3) ou penicilinas cromossomais do grupo 4 (BUSH 1989a, b). O Ácido clavulânico liga-se irreversivelmente ao grupo hidroxil serina do centro ativo das beta-lactamases, produzindo um intermediário estável e resultando na inativação da enzima.

## 2.4 Precursores e biosíntese de ácido clavulânico

Ornitina e arginina exercem uma estimulação concentração-dependente na biossíntese de ácido clavulânico (ROMERO et al, 1986) e ambos amino-ácidos são eficientemente incorporados na molécula de ácido clavulânico (TOWNSEND e HO, 1985b; ROMERO et al. 1986). A incorporação ocorre nos carbonos C-2 e C-3, e C-8, C-9 e C10. Estudos com mutantes bloqueados nos genes *argF* e *argG*, demonstraram que a arginina é o precursor direto do ácido clavulânico (LIRAS e RODRÍGUES-GARCÍA, 2000).

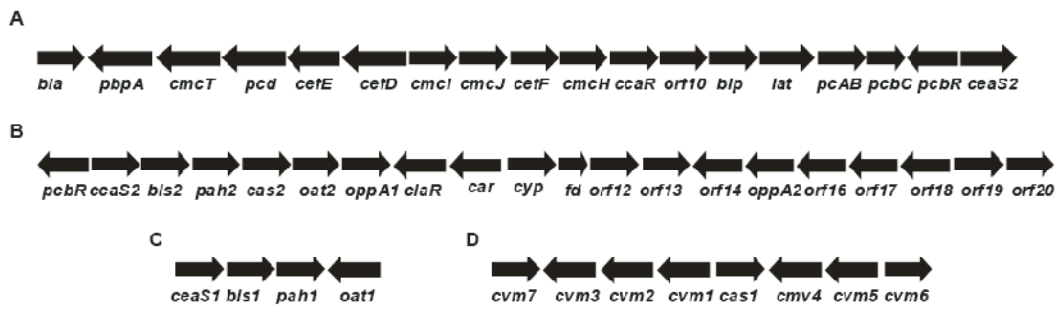
Outro precursor direto da biossíntese de AC é o glicerol. Romero et al. (1984) estudaram o papel do glicerol na biossíntese de AC por *S. clavuligerus*. Glicerol marcado, glicerato, propionato e  $\beta$ -hidroxipropionato são incorporados nos carbonos C-5, C-6 e C-7 da molécula do ácido clavulânico (ELSON e OLIVER, 1978; GUTMAN et al. 1985; TOWNSEND e HO, 1985a).

A rota biossintética de ácido clavulânico está sendo cada vez mais compreendida, através do isolamento de compostos intermediários, pela purificação e caracterização de enzimas e por estudos genéticos (LIRAS e RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2000). Primeiramente, a formação de N<sup>2</sup>-(2-carboxietilarginina) (CEA) ocorre pela condensação no carbono 3 (C-3) do derivado do piruvato com uma molécula de arginina (PÉREZ-REDONDO et al., 1999). Esta reação enzimática requer Pyc, produto protéico do gene chamado *pyc* (para a conversão do piruvato), localizado a montante do gene *bIs* no cluster de genes do ácido clavulânico de *Streptomyces clavuligerus*. O gene *pyc* codifica uma proteína

---

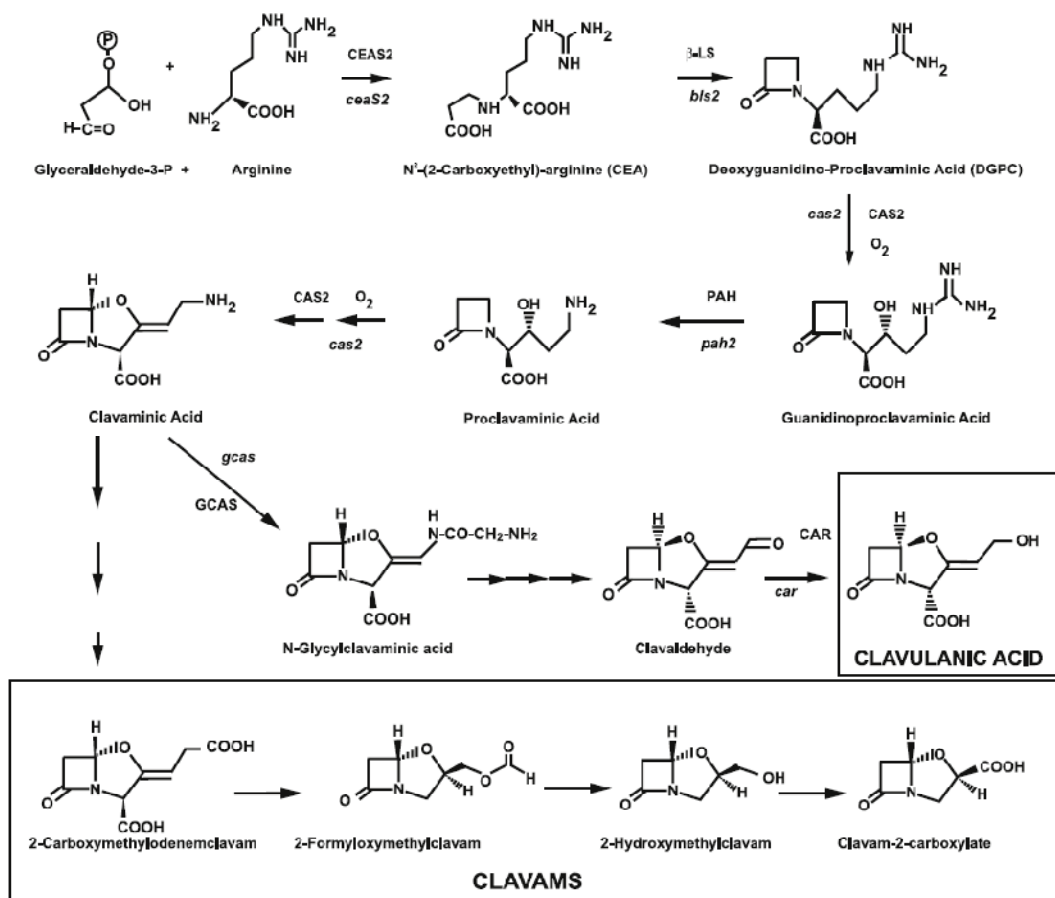
de 582 aminoácidos com domínio que reconhece piruvato e pirofosfato tiamina e que mostra 29,9% de identidade a acetohidroxiácido sintases. A disrupção da ORF10 resulta na completa falta da produção de AC e de clavamas (JENSEN, et al., 2000). A ORF10 é codificada pelo gene *cyp*, está envolvida na biossíntese de AC e seu papel ainda não foi claramente elucidado. Li et al. (2000) sugerem que esta ORF está relacionada com complexas reações oxidativas entre o ácido clavamínico e clavaldeído.

Os genes que codificam as enzimas responsáveis pela biossíntese do AC estão na forma de cluster e são chamados de super cluster beta-lactâmico. Em *S. clavuligerus* os agrupamentos das biossínteses de cefamicina C (figura 2A) e de ácido clavulânico (figura 2B) se encontram vizinhos no cromossomo (WARD e HODGSON, 1993). As informações referentes a ambos agrupamentos estão amplamente revisadas (LIRAS, 1999; RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2000). Há também um cluster gênico parálogo (figura 2C) em *S. clavuligerus*, neste cluster estão organizados os genes *ceaS1*, *bls1*, *pah1* e *oat1*. Todo gene designado pelo índice 1 se refere a este cluster parálogo e todos os genes designados pelo índice 2 referem-se propriamente ao cluster de genes do ácido clavulânico (TAHLAN et al., 2004).



**Figura 2. (A) Organização do agrupamento de genes de cefamicina C, (B) ácido clavulânico, (C) parálogos de ácido clavulânico e (D) clavamas. Nota-se que os genes *pcbR* e *ceaS2* estão incluídos em A e B para indicar que ambos agrupamentos são adjacentes. Os tamanhos dos genes não estão em escala (TAHLAN *et al.* 2004).**

O ácido clavulânico é sintetizado pela via (figura 3) que se inicia com a condensação do gliceraldeído-3-fosfato com L-arginina para formar N<sup>2</sup>-(2-carboxietilarginina) (CEA) e sucessivamente o ácido deoxiguanidinoproclavamínico (DGPC), que foram identificados por Elson e colaboradores (1993).



**Figura 3. Rota biossintética para ácido clavulânico e clavamas. Os passos entre ácido N-glycylclavaminic e clavaldeído, ou entre ácido clavamínico e 2-carboximetilodenemclavama, ainda são desconhecidos. A formação seqüencial das diferentes clavamas pode ser deduzida dos produtos formados pelos diferentes mutantes, mas não há conhecimento das enzimas envolvidas (LIRAS et al., 2008).**

A conversão de CEA para DGPC é feita pela enzima BLS, denominada de beta-lactâmica sintetase (BACHMANN et al., 1998), a qual é codificada separadamente por dois genes, *bIs1* e *bIs2*. Esta enzima forma uma ligação amídica na molécula de CEA, fechando o anel beta-lactâmico, na presença de ATP e Mg<sup>+2</sup>.

O ácido proclavamínico deoxiguanidino utilizado como substrato pela enzima clavaminato sintase (CAS), é convertido em ácido guanidino proclavamínico (ELSON

et al. 1987; TAHALAN et al., 2004). A purificação de CAS até a homogeneidade mostrou que a atividade desta enzima está associada a dois polipeptídeos de 46 e 47 kDa, CAS1 e CAS2 (SALOWE et al., 1990), e que uma delas inicialmente é responsável pela degradação do produto. O alinhamento de *cas1* e *cas2* indicam que há 87% de identidade nos nucleotídeos, e sua homologia é mais extensiva entre a porção central dos genes e mais variável próximo dos C- e N-terminais. As isoenzimas são 82% idênticas em seus amino-ácidos (MARSH et al., 1992). O próximo passo da rota metabólica é indicado pela ação de proclavaminato amidinohidrolase, PAH, codificada pelos genes *pah1* e *pah2* (JENSEN et al., 2004), que hidrolisam o ácido guanidino proclavamínico para formar o ácido proclavamínico. A proteína codificada por *pah* assemelha-se fortemente a amidinotransferases e requerem manganês ( $Mn^{+2}$ ) para sua atividade. O valor de  $K_m$  para a conversão do ácido guanidino proclavamínico ao ácido proclavamínico é 50-100 vezes maior que o  $K_m$  de CAS2, sugerindo que esta etapa é crítica para a completa ação de CAS2, e deve ser limitante para a biosíntese do ácido clavulânico (WU et al., 1995). A conversão de ácido proclavamínico a ácido clavamínico requer novamente CAS2.

Recentemente, Arulanantham et al. (2006) descreveram que o ácido clavamínico se condensa com a glicina através da enzima codificada por *orf17* (GCAS) para formar o ácido N-glicilclavamínico. Os passos intermediários entre o ácido N-glicilclavamínico e o clavulanato-9-aldeído (clavaldeído), o último intermediário isolado da rota biossintética, ainda não são conhecidos, mas a transformação implica na conversão estereoquímica para obter a conformação *3R*, *5R*.



Finalmente, o clavulanato-9-aldeído, através de uma enzima redutase dependente de NADPH, a clavulanato-9-aldeído redutase (CAR), se transforma em ácido clavulânico. A enzima CAR é também chamada de ácido clavulânico desidrogenase (CAD) (NICHOLSON et al., 1994), codificada pelo gene *car*, localizado cerca de 4 kb a jusante do gene *cas2* (PEREZ-REDONDO et al., 1998). CAR é uma proteína citocromo P450 que parece ser essencial para a produção de ácido clavulânico.

## **2.5 Biossíntese de cefamicina C**

*Streptomyces clavuligerus* produz cefamicina C, um antibiótico beta-lactâmico, que age inibindo a biossíntese de peptidoglicano por interação com as transpeptidases da parede celular (NAGARAJAN et al., 1971). A cefamicina C é uma molécula de cefalosporina (WHITNEY et al., 1972) e sua produção em *S. clavuligerus* ocorre em paralelo com a do ácido clavulânico (LIRAS et al., 2008). Sua biossíntese compartilha alguns passos com a rota biossintética (figura 4) de formação de penicilinas e cefalosporinas (AHARONWITZ et al., 1992).

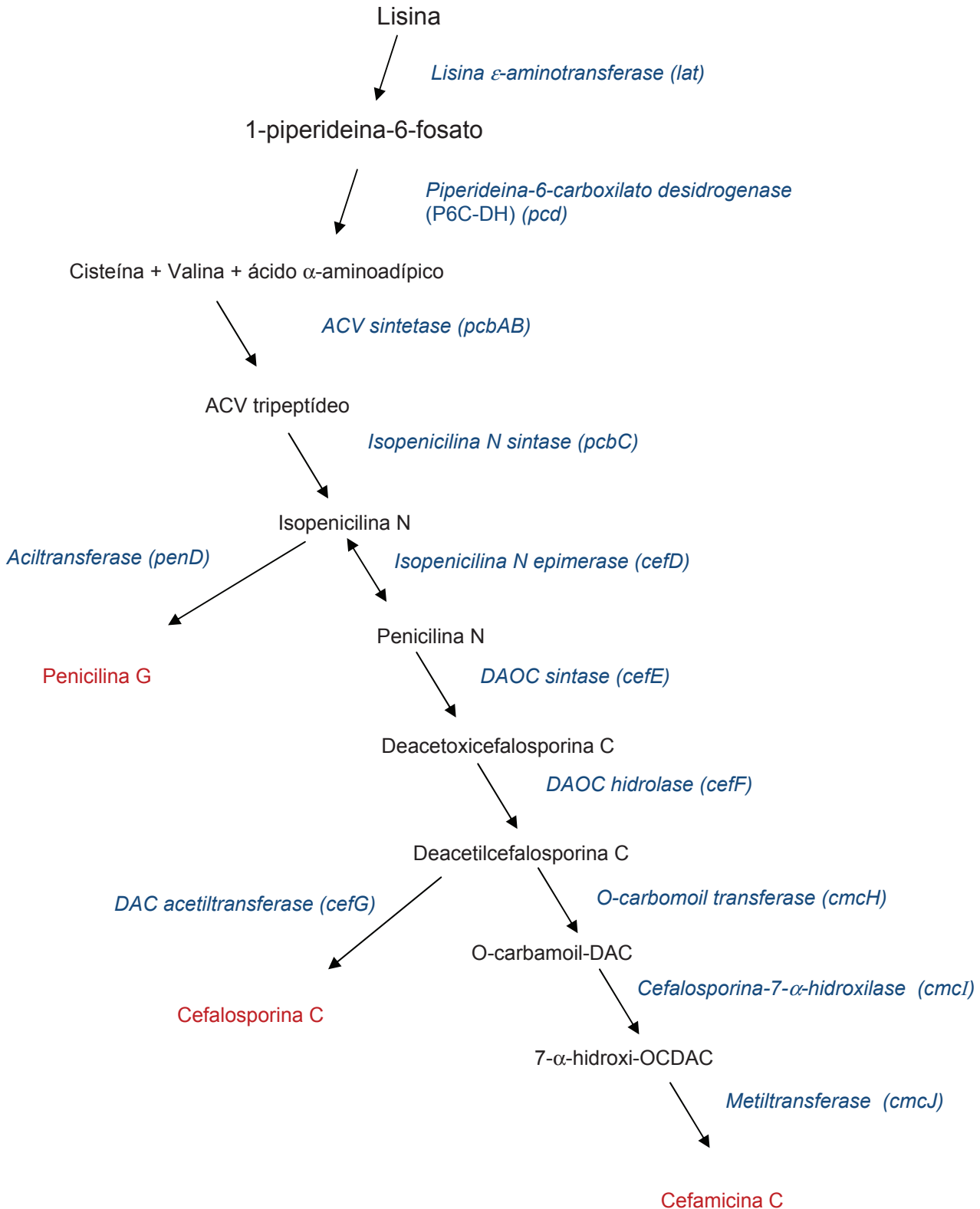


Figura 4. Rota biossintética para a produção de cefamicina C. Em parênteses nomes dos genes que codificam suas correspondentes enzimas (LIRAS, 1999).

---

A biossíntese da cefamicina C começa com a conversão da L-lisina a 1-piperideína-6-carboxilato catalisada pela enzima lisina  $\epsilon$ -aminotransferase (LAT, EC 2.6.1.36), em actinomicetos produtores de compostos  $\beta$ -lactâmicos. A clonagem de fragmentos de restrição de *Streptomyces clavuligerus*, em *Streptomyces lividans*, microrganismo não produtor de CefC levou a produção de LAT neste último hospedeiro. O gene *lat* está localizado a montante do gene *pcbAB*, localizado no cluster do gene da cefamicina C em *Streptomyces clavuligerus*. O seqüenciamento de fragmentos de DNA quando digeridos por enzimas de restrição contendo o putativo gene *lat*, revelou uma única ORF, que codifica um polipeptídeo com massa ( $M_r$ ) aproximadamente de 49.000 (TOBIN et al. 1991). A molécula de 1-Piperideína-6-carboxilato é então desidrogenada para formar o ácido  $\alpha$ -aminoadípico pela enzima piperideína-6-carboxilato desidrogenase (P6C-DH), codificada pela ORF13 (gene *pcd*). A ORF13 codifica uma proteína de 496 aminoácidos (de peso molecular MW 52.488) com uma sequência N-terminal de aminoácido idêntica de piperideína-6-carboxilato desidrogenase. O ácido L- $\alpha$ -aminoadípico formado é o precursor da cefamicina C. A estrutura básica do núcleo beta-lactâmico é formada por três aminoácidos: ácido L- $\alpha$ -aminoadípico, L-cisteína e L-valina, os quais são ativados com ATP e ligados para formar o tripeptídeo  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil-L-cisteína-D-valina) (ACV). A enzima multifuncional responsável por este passo, ACV sintase, é codificada pelo gene *pcbAB*. O tripeptídeo ACV é ciclizado pela ACV ciclase (também chamada de isopenicilina N sintase) codificada pelo gene *pcbC*, para formar isopenicilina N, um composto beta-lactâmico com baixa atividade antibiótica (LIRAS, 1999). A cadeia lateral L- $\alpha$ -aminoadipil da isopenicilina N é isomerada para a configuração D pela isopenicilina N isomerase, uma enzima codificada pelo gene *cefD*, para formar a penicilina N. O anel tiazolidina de cinco membros da penicilina N

é então expandido ao anel diidrotiazínico de seis membros, o qual é comum a todas as cefalosporinas. A enzima responsável por esta reação é a penicilina N expandase (também chamada de deacetoxicefalosporina C sintase), a qual é codificada pelo gene *cefE*. A molécula da deacetoxicefalosporina C formada, é hidroxilada no carbono C-3' pela enzima deacetoxicefalosporina C hidroxilase, codificada pelo gene *cefF*, para formar a deacetilcefalosporina C, o precursor imediato da cefalosporina C (LIRAS, 1999). Na cefamicina C de *S. clavuligerus*, o grupo hidroxila do carbono C-3' é carbamoilado pela deacetilcefalosporina C O-carboiltransferase, codificada pelo gene *cmC*. Os dois últimos genes da rota biossintética da cefamicina C são: *cmI* e *cmJ*. Estes genes correspondem as ORF7 e ORF8, respectivamente, do cluster gênico de cefamicina C de *Nocardia lactamdurans*. As enzimas codificadas por estes genes convertem a cefalosporina C em 7-metoxicefalosporina, sendo portanto, responsáveis por reações de metoxilação. As proteínas P7 e P8 (produtos das ORF7 e ORF8, respectivamente, expressadas em *Streptomyces lividans*) introduzem o grupo metoxil no carbono C-7 do núcleo da molécula de O-carbooil-DAC (COQUE et al., 1995). A ORF7 com 711 pb, codifica uma proteína, denominada de P7, que mostra homologia com O-metiltransferases de *Streptomyces fradiae*, sendo uma proteína de 236 aminoácidos, localizada a jusante do gene *pcbC*, separados por 13 nucleotídeos. A segunda ORF de 876 pb (ORF8), codifica uma proteína de 292 aminoácidos e está localizada imediatamente a jusante da ORF7, as quais estão separadas somente por sete nucleotídeos (COQUE et al., 1995). Evidências bioquímicas e de genética molecular, indicam que P7 e P8 são necessárias para a eficiente metoxilação de cefalosporinas.

## 2.6 Biossíntese de clavamas

As clavamas (2-carboximetilodenemclavama, 2-formiloximetilclavama, 2-hidroximetilclavama, clavama-2-carboxilato e alanilclavama) são originárias do ácido clavamínico por uma rota biossintética de genes agrupados em formas de cluster, chamado de cluster de genes de clavamas, e que foi isolado utilizando o gene *cas1*, como sonda (Figura 2D), um gene duplicado que codifica uma isoenzima (clavaminato sintase). Este cluster gênico contém os genes *cvm1* ao *cvm13*, *cvmG* e *cvmP*. Estudos com interrupção gênica dos genes *cvm1*, *cvm2* e *cvm5*, mostraram que estes genes são necessários para a produção das clavamas 5S, mas ainda são capazes para sintetizar ácido clavulânico. Interrupção do gene *cvm2* resultou em uma linhagem com baixa produção de 2-hidroximetilclavama e alanilclavama e são completamente incapazes de produzir clavama-2-carboxilato, enquanto a interrupção do gene *cvm5*, mostrou que a síntese de ambos compostos; hidroximetilclavama e clavama-2-carboxilato foi prejudicada. A função dos genes *cvm1*, *cvm2* ou *cvm5* na biossíntese de clavamas ainda não está clara (TAHALAN et al., 2007). Nenhum envolvimento dos outros genes do cluster de clavamas na formação das clavamas ou do ácido clavulânico tem sido encontrada. De uma forma geral pode-se citar que as reações envolvidas nas formações dos cinco compostos de clavamas são de oxidação e de hidrólise. Outros genes, como *cvmH*, *cvmP* e *cvmG*, também estão no cluster das clavamas e são responsáveis por algumas reações, como por exemplo de hidrólise.

Tahlan e colaboradores (2007) nestes estudos identificaram duas novas ORFs, *cvm6P* e *cvm7P*, localizadas no cluster parálogo de genes. O gene *cvm6P* está localizado imediatamente a montante do gene *oat1*. Mutantes de *cvm6P*

mostraram nas fermentações, que não houve produção das clavamas 5S, enquanto as produções de cefamicina C e ácido clavulânico não foram afetadas. O gene *cvm7P* está localizado a montante do gene *cvm6P* e mutantes deste gene por disrupção gênica apresentaram níveis de ácido clavulânico semelhantes ao da linhagem selvagem, porém não produziram níveis detectáveis das clavamas 5S. O gene *cvm7P* codifica um possível regulador transcricional similar ao regulador pimaricina de *Streptomyces natalensis*.

## **2.7 Genes regulatórios específicos nas biossínteses de Cefamicina C e ácidos clavulânico em *Streptomyces clavuligerus***

O gene *ccaR* codifica uma proteína regulatória do tipo *actII-ORF4* de *Streptomyces coelicolor*, e está presente cerca de 4 kb a montante do gene *lat* no cluster de cefamicina C. O produto protéico de *ccaR* é uma proteína de 28 kDa de massa molecular com 256 aminoácidos, com identidade na ordem de 26-29% com proteína regulatória (AfsR) e proteínas regulatórias específicas para antibióticos (Dnrl, RedD, ActII-ORF4). A proteína CcaR faz parte da família das proteínas SARP e é requerida para a produção de cefamicina C e ácido clavulânico. A disrupção do gene *ccaR* resultou na falta de produção de cefamicina C, ácido clavulânico ou de outras clavamas (PÉREZ-LLARENA et al., 1997). Kyung et al. (2001) identificou o perfil da expressão de CcaR, caracterizando-a como controladora da biossíntese de antibiótico em *S. clavuligerus* pela regulação da transcrição dos genes biossintéticos. Estudos de ligantes de DNA demonstraram que CcaR interage com a região promotora bi-direcional *cefD-cmcl* do cluster de gene de cefamicina C (SANTAMARTA et al. 2002). CcaR poderia controlar simultaneamente os genes

---

iniciais, intermediários e tardios da rota biossintética. CcaR também se liga em seu próprio promotor (LIRAS et al., 2008) e afeta a produção de ácido clavulânico por um mecanismo desconhecido, o qual poderia ser mediado pela expressão de uma proteína do tipo LisR, codificada pelo gene *claR*. Este último é outro gene regulador, porém, mais específico agindo somente na biossíntese de ácido clavulânico. O gene *claR* localizado no cluster de genes do ácido clavulânico, codifica uma proteína similar encontrada na família de ativadores transcricionais, a qual é requerida especificamente para a produção de ácido clavulânico (PÉREZ-REDONDO et al. 1998). Este gene está ligado ao gene *car* (clavulanato-9-aldeído redutase) em *Streptomyces clavuligerus* (PÉREZ-REDONDO et al., 1998) e codifica uma proteína de 431 aminoácidos ( $M_r$  deduzida de 47080). A amplificação do gene *claR* em um plasmídeo multi-cópia, resultou no aumento de 300% na produção de ácido clavulânico e aumento de cinco a seis vezes na produção de biossíntese de alanilclavama, enquanto a produção de cefamicina C foi significamente reduzida, quando utilizado meios de cultivos definidos e complexos. Trabalhos realizados por Pérez-Redondo (1998) e colaboradores mostraram que, em seus estudos, as biossínteses de ácido clavulânico e de cefamicina C em *Streptomyces clavuligerus*, são controladas por uma cascata de proteínas regulatórias reguladas por estes dois genes, *ccaR* e *claR*.

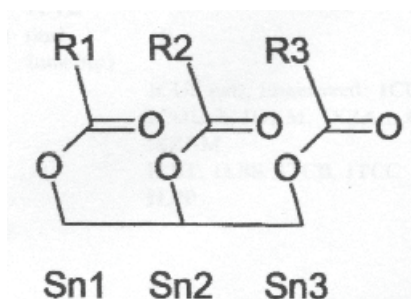
## 2.8 Lipases e atividade lipolítica em *Streptomyces clavuligerus*

Óleos e gorduras (lipídios) são considerados atualmente componentes essenciais em meios de cultivo na indústria de antibióticos, porque eles possuem propriedades anti-espumantes e são uma fonte de carbono alternativa mais barata, quando comparadas com carboidratos e podem aumentar a concentração de metabólitos secundários (LARGE et al., 1999). Pan e colaboradores (1959) foram um dos primeiros investigadores a utilizar óleo como parte da fonte de carbono em *Penicillium chrysogenum* e relataram que houve uma maior produção de penicilina, quando comparada com carboidrato, como fonte de energia. Outros pesquisadores aumentaram a produção de cefamicina C em *Streptomyces* sp. p6621 pelo uso de óleo no meio de cultivo (PARK et al. 1994; LEE et al. 1996). Maranesi e colaboradores (2005) e Ortiz (2007) também observaram o aumento da produção do inibidor de beta-lactamase, ácido clavulânico, quando óleo estava presente no meio de cultivo. Sendo assim, para investigar a ligação entre os lipídeos no meio de cultivo e os precursores da síntese de antibiótico em *Streptomyces clavuligerus* é importante o estudo de lipases no catabolismo de óleos.

Lipases (triacilglicerol acidolases; EC 3.1.1.3) são enzimas que são extremamente versáteis, devido ao grande número de reações de esterificação, que elas podem catalisar (DALMAU et al., 2000). Lipases catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos livres, e geralmente têm preferência por um tipo de substrato, seja ele um triacilglicerol ou um diacilglicerol e, portanto, tem como produtos diacilgliceróis e monoacilgliceróis, numa taxa maior do que apenas glicerol e ácidos graxos. A região de seletividade no triglicerídeo pelas lipases é freqüentemente maior para as posições sn1 e sn3 e menos freqüentemente para a



posição sn2 (figura 5) (LOTRAKUL e DHARMSTHITI, 1997; DHARMSTHITI; LUCHAI,1999).



**Figura 5. Um triglicerídeo típico de lipídio é apresentado, usando a designação sn para as posições do glicerol.**

Lipases verdadeiras hidrolisam ésteres de glicerinas emulsificados e ácidos graxos de cadeia longa, como trioleínas e tripalmitinas. Uma alteração na conformação da enzima ocorre quando ela entra em contato com um substrato insolúvel em água. Este fenômeno de ativação interfacial com (ou na presença de) uma obstrução do sítio ativo é atualmente uma área ampla de pesquisa envolvendo bioquímicos, químicos, engenheiros bioquímicos, biólogos moleculares e cristalógrafos de raios-X. Lipases são hidrolases serínicas (possuem um resíduo do aminoácido serina no sítio catalítico, essencial para sua função) e contém a seqüência de consenso G-X1-S-X2-G como a região catalítica, onde G= glicina, S= serina, X1= histidina e X2= ácido glutâmico ou aspártico. O conhecimento da estrutura tridimensional das lipases exerce um papel importante no projeto e na produção (neste caso, exclusivamente com o uso de engenharia genética, DNA recombinante) de lipases para finalidades específicas (SAXENA et al., 2003).

A ativação, a qual é freqüentemente necessária para a enzima lipase, é um movimento de um ou vários domínios. A área de superfície hidrofóbica é localizada centralmente na zona de contato com o lipídio, a qual contém grandes e vários

resíduos hidrofóbicos, como Phe, Trp, Ile, Leu e Tyr. O domínio é também a parte central da zona de contato da maioria das lipases de triacilgliceróis (SVENDSEN, 2000). Após obtenção da estrutura das primeiras lipases, os resíduos do sítio ativo foram encontrados como sendo homólogos da tríade de serina proteases (SVENDSEN, 2000), caracterizando esta enzima como serino hidrolases.

Óleos induzem a atividade lipolítica em bactérias e fungos (MAIA et al., 2001). Vasconcelos (2008) dosou a atividade lipolítica de linhagens selvagem e de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* em fermentações com meio de cultura contendo óleo de soja. Kim e Park (2007) induziram a produção de lipase por óleo de milho no meio de cultivo de *Streptomyces clavuligerus* CKD1119.

O estudo da atividade lipolítica em meios de cultivos contendo óleos nas fermentações de *Streptomyces clavuligerus* é de grande importância, pois um dos produtos da catálise desta enzima é o glicerol. Este, por último, é um dos precursores da biossíntese de ácido clavulânico.

## **2.9 Métodos e estratégias para aumentar o rendimento de metabólitos secundários em actinomicetos**

*Streptomyces clavuligerus* produz uma série de metabólitos secundários com diferentes estruturas químicas e atividades biológicas. *S. clavuligerus* sintetiza a cefamicina C, um antibiótico  $\beta$ -lactâmico que age na biossíntese da parede celular, um inibidor de  $\beta$ -lactamase, o ácido clavulânico (TAHLAN et al., 2004), o qual contém um núcleo clavama, e outras estruturas clavâmicas (TAHLAN et al., 2007) com atividades anti-bacteriana e anti-fúngica. Também, *S. clavuligerus* tem sido descrito como produtor de compostos com estruturas de pirrotina e holotina (LIRAS e

---

MARTÍN, 2005), e holomicina (FUENTE et al. 2002), as quais poderiam agir como agentes anti-tumorais e em pequenas quantidades outros compostos  $\beta$ -lactâmicos como a isopenicilina N e a deacetilcefalosporina (ROMERO et al., 1988), ambos intermediários na rota biossintética da cefamicina C. A produção de cada um destes compostos depende do meio de cultura e das condições do cultivo utilizadas.

E várias estratégias podem ser utilizadas para tentar aumentar a produção destas substâncias de interesse farmacêutico e industrial. Primeiramente, as técnicas mais comuns são de modificação das condições de cultivo e de alteração do meio de cultura para aumento de um determinado metabólito. Como por exemplo, podemos citar a influência da aeração na produção de antibiótico. Rollins e colaboradores (1988) estudaram o efeito da aeração na produção de metabólitos secundários, e mostraram que uma maior disponibilidade de transferência de oxigênio aumentou a produção de cefamicina C durante a fase exponencial de crescimento de *S. clavuligerus*.

Devi e Sridhar (1999) otimizaram a concentração de alginato de sódio, de cloreto de cálcio e a densidade celular em trabalhos de imobilização de *S. clavuligerus* em matriz de gel de alginato, com o intuito de aumentar a produção de cefamicina C.

Wang e colaboradores (2005) montaram um planejamento fatorial com cinco variáveis para otimizar o meio de cultivo, variando componentes do mesmo, no intuito de aumentar a produção de ácido clavulânico. Eles variaram as concentrações de glicerol, farinha de soja,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e investigaram, através destes fatores nutricionais, o efeito sobre a produção de ácido clavulânico.

Outros pesquisadores, Maranesi e colaboradores (2005), estudaram a utilização de várias fontes de carbono em diferentes meios de cultivos na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. O estudo investigou os efeitos de dextrina, amido e glicerol combinados com farinha de soja e óleo de soja sobre a produção de ácido clavulânico, e verificaram que o meio de cultivo utilizado com 23 g L<sup>-1</sup> de óleo de soja apresentou o maior título de ácido clavulânico.

Teodoro e colaboradores (2006) fizeram um estudo da influência das condições de operação, taxa de fluxo volumétrico e a concentração de glicerol, bem como do nitrogênio de farinha de soja em cultivos em batelada alimentada. A maior produção específica de AC correspondeu a 2,95 g L<sup>-1</sup> de nitrogênio total nos cultivos batelada. Em fermentações do tipo batelada alimentada a melhor condição foi 1,2 g h<sup>-1</sup> combinada com uma menor taxa de diluição.

Saudagar e Singhal (2007) otimizaram o meio de cultivo do processo de produção de ácido clavulânico pela metodologia estatística baseada em delineamento experimental. Os componentes do meio de cultivo utilizados como fatores foram: farinha de soja, óleo de soja, dextrina, extrato de levedura e fostato na forma de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Em outro experimento neste mesmo trabalho, o grupo de pesquisa estudou o efeito da arginina e leucina na produção de ácido clavulânico.

Ortiz e colaboradores (2007) investigaram a influência de fontes de nitrogênio de derivados de soja e fontes de carbono na produção de ácido clavulânico em *S. clavuligerus*. Farinha de soja e isolado de proteína de soja (IPS) foram utilizados como fontes de nitrogênio no meio de cultivo para o processo fermentativo em incubadora rotatória orbital "shaker". Outros experimentos foram conduzidos em biorreator variando-se a concentração de óleo de soja e de nitrogênio total. Na incubadora rotatória orbital, utilizando-se 1,6 g L<sup>-1</sup> de nitrogênio

---

total a produção de AC foi maior com farinha de soja, ao invés de isolado protéico de soja. Nos experimentos corridos em biorreator, os resultados mostraram que a produção de AC aumentou com o decréscimo da concentração de óleo de soja e com o aumento da concentração de farinha de soja, na faixa estudada.

Existem outras estratégias para aumentar a produção de metabólitos secundários, tais como: melhorias no fluxo de vias bioquímicas dos precursores de antibióticos, amplificação de genes da rota biossintética, amplificação de genes reguladores ou modificadores dos mecanismos de controle, bloqueio de rotas biossintéticas para produzir compostos intermediários de interesse, criação de vias alternativas para obter o produto desejado, modificação através de mutagênese dos genes que codificam as enzimas para melhorar sua eficiência, entre outras (BALTZ, 2001). Como por exemplo, podemos citar o trabalho desenvolvido por Tahlan e colaboradores (2007), neste, a rota biossintética das clavamas 5S foi bloqueada e as mutações no gene *cmv2* demonstraram que, há uma diminuição na produção de alanilclavama, 2-hidroximetilclavama e elimina completamente a produção da clavama-2-carboxilato. O outro gene *cvm5*, que foi bloqueado, não produziu nenhuma das conhecidas clamavas 5S, porém houve acumulação de uma nova clavama, 2-carboximetilideneclavama. Estudos deste tipo são de grande valia, pois podem nos ajudar a conhecer a natureza dos genes, suas funções e a descobrir novos genes atuantes em uma rota biossintética.

Hung et al., (2007) pesquisaram o aumento da produção de ácido clavulânico pela expressão integrativa e replicativa dos genes *ccaR* e *cas2* em *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585. Seis plasmídeos foram construídos para tal propósito, três deles; pIBRHL1, pIBRHL3, pIBRHL13, foram utilizados para a super-expressão, enquanto os plasmídeos pNQ3, pNQ2 e pNQ1, foram construídos para a

integração dos genes *ccaR*, *cas2* e *ccaR-cas2* no cromossomo de *S. clavuligerus*. Todos os plasmídeos foram inseridos no cromossomo de *S. clavuligerus* e a produção de ácido clavulânico aumentou de 2,25 a 23,8 (pNQ1) vezes, dependendo do mutante obtido. O mutante com o plasmídeo integrativo pNQ1 foi selecionado com sucesso para aumento do AC.

Li e Townsend (2006) estudaram o efeito de mutações dirigidas na produção de ácido clavulânico por engenharia genética, alterando a via glicolítica em *Streptomyces clavuligerus*. Neste estudo, dois genes (*gap1* e *gap2*), cujos produtos protéicos são distintos, enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases (GAPDHs), foram inativados em *S. clavuligerus* por disrupção gênica dirigida. O gliceraldeído-3-fosfato (G3P) é um dos precursores metabólicos primários do ácido clavulânico (KHALEELI et al., 1999). Análises do fluxo metabólico têm sugerido que um fator limitante para a biossíntese do ácido clavulânico é o G3P (IVES e BUSHELL, 1997), o qual é um intermediário da via glicolítica e é convertido a 1,3-bisfosfoglicerato pela GAPDH. Pesquisas têm demonstrado que aumentando o nível de G3P, poderia resultar em um aumento da produção de AC em *S. clavuligerus*. E para realizar tal propósito, esta nova estratégia foi criada para manipular o metabolismo primário deste organismo, pela inativação dirigida do gene que codifica GAPDH para o fluxo de carbono de G3P através da biossíntese de AC. E com esta estratégia, a produção de AC dobrou na linhagem mutante *gap1*, quando comparada com a linhagem selvagem. Foram verificados também, nestes experimentos, que adicionando-se arginina no meio de cultura deste mutante, os níveis de AC aumentaram ainda mais.

PARAKDAR e colaboradores (2001) construíram um mutante, parental de *S. clavuligerus* NRRL3585, bloqueado na produção de cefamicina C por disrupção

---

dirigida do gene *lat*, a qual codifica a lisina  $\epsilon$ -aminotransferase, a primeira enzima da rota biossintética da Cef C. Para as manipulações genéticas em *Escherichia coli* e *Streptomyces*, foram utilizados os vetores; pUC119 e pIJ486, respectivamente. O cassete de resistência a apramicina foi inserido no gene *lat* por interrupção gênica, em *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585, tornando o mutante (*S. clavuligerus lat::apr*) resistente a apramicina e sensível a tioestreptona. A produção de ácido clavulânico deste mutante foi de 1,7 a 3,8 vezes maior, dependendo do tempo de fermentação em relação à linhagem selvagem. Um duplo mutante bloqueado no gene *lat* e no gene *cvm1* (*cvm1::apr*), também foi criado para estudar seu efeito na produção de AC. O gene *cvm1*, junto com os genes *cvm4* e *cvm5*, cujas localizações são adjacentes ao gene *cas1*, estão envolvidos na biossíntese das clavamas. Portanto, o mutante, no qual o gene *cvm1* foi bloqueado não sintetiza as clavamas. Esta estratégia foi utilizada, pois mais uma rota biossintética foi bloqueada, a das clavamas. O duplo mutante, bloqueado nos genes *lat* e *cvm1*, apresentou títulos maiores de AC em relação a sua linhagem parental.

Zhihan e Yanping (2006), também bloquearam a biossíntese de cefamicina C pela interrupção do gene *lat*. Para este estudo, foram utilizados os vetores, pUCm-T para as manipulações genéticas em *E. coli* e pKC1139 para o processo de conjugação de *E. coli* em *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585. Os mutantes possuíam resistência a apramicina e sensibilidade a canamicina. Não houve diferença no peso seco do micélio entre as linhagens selvagem e mutante, mas a produção de AC foi de 200 a 260% maior do que a linhagem selvagem, em meio de cultivo a base de farinha de soja, amido e sais.

São inúmeras as estratégias que podem ser utilizadas para se aumentar o título de metabólitos secundários em microrganismos e especialmente em *S.*

*clavuligerus*, sejam elas de ordem nutricional; alterando-se componentes no meio de cultura, que afetam a produção de certo metabólito, ou de alterações de natureza genética.

## **2.10 O método da interrupção gênica para o estudo de um gene**

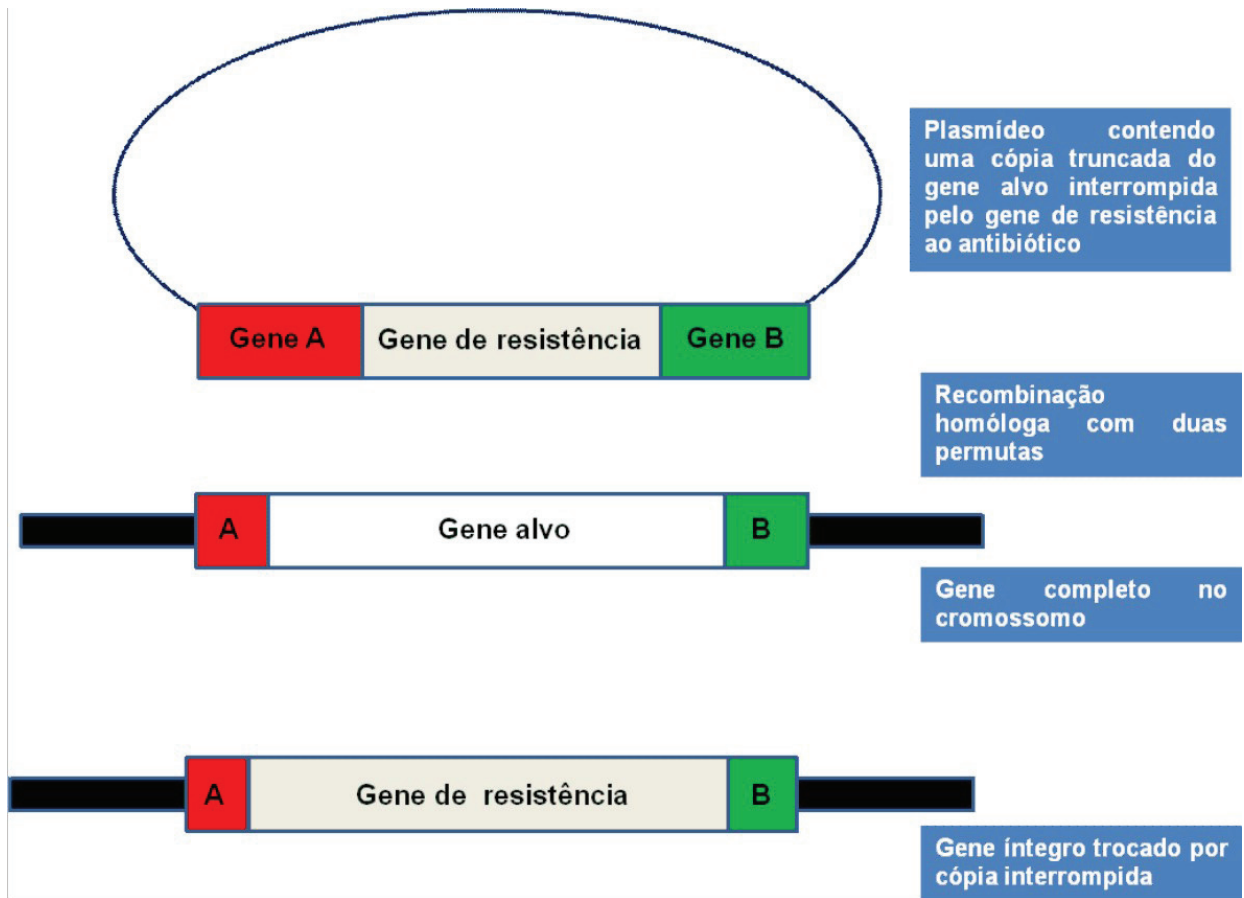
Nas bactérias, assim como em alguns eucariotos inferiores, a maneira mais eficiente para a mutação de genes específicos é feita por meio de troca, por recombinação homóloga, da cópia selvagem do gene alvo por uma cópia truncada ou contendo uma mutação. Esse tipo de mutação é denominado genericamente de interrupção gênica por recombinação homóloga.

Existem dois métodos principais usados para a interrupção gênica por recombinação homóloga: a mutagenese por inserção-deleção e a troca alélica.

A mutagenese por inserção-deleção envolve a recombinação homóloga com uma permuta entre o gene selvagem no cromossomo bacteriano e uma cópia truncada desse gene, clonada em um plasmídeo replicativo ou suicida. Após o evento de permuta, todo o plasmídeo fica inserido no cromossomo bacteriano e o gene alvo sofre duplicação.

A troca alélica resulta na troca do gene selvagem por uma cópia interrompida por um marcador de seleção (figura 6). Este processo envolve a recombinação homóloga por duas permutas.





**Figura 6. Esquema mostrando a troca alélica. Os genes, A e B no genoma completo do organismo estão sob a forma de fragmentos gênicos no plasmídeo.**

Este tipo de disrupção pode ser exemplificado da seguinte maneira: para a disrupção do gene *lat* de *Streptomyces clavuligerus*, o gene alvo seria o *lat* e os genes A e B, seriam *ccaR* a montante e *pcbAB* a jusante, respectivamente. A grande vantagem da troca alélica é o fato dessa estratégia gerar mutantes mais estáveis em comparação com a mutagênese do tipo inserção-deleção.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Linhagens bacterianas**

Os microrganismos utilizados durante este estudo são apresentados na tabela 1. Os cultivos de *Escherichia coli* foram feitos em meio LB (descritos no item 3.1.3), suplementado com ampicilina e o antibiótico que o plasmídeo confere resistência, a 37°C sob agitação constante de 220 rpm.

*Streptomyces clavuligerus* foi cultivado em Erlenmeyer a 28°C, 220 rpm em mesa incubatória rotativa, por no máximo 180 horas. Todos os microrganismos utilizados neste trabalho foram estocados em placas, contendo seus respectivos meios de cultivo e ágar 1,4%, até quatro semanas. Para um tempo maior de preservação, as linhagens foram congeladas -75 °C em glicerol 20% p/v.

**Tabela 1.** Linhagens utilizadas neste trabalho

Microorganismo	Linhagem	Comentário do genótipo	Referência
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	F <sup>-</sup> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , ( <i>rK<sup>-</sup>mk<sup>+</sup></i> ), <i>sup44</i> , <i>relA1</i> , λ <sup>-</sup> , ( <i>φ80d lacZΔM15</i> ), Δ( <i>lacZYA-argF</i> ), U169	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i>	Ess 22-35	Linhagem super-sensível a antibióticos β-lactâmicos; utilizada como indicadora no bioensaio de cefamicina C	Hu et al., 1984
<i>Escherichia coli</i>	ET12567[pUZ8002]	dam-13::Tn9, dcm-6, <i>hsdM</i> e que leva o plasmídeo pUZ8002, resistente a cloranfenicol e canamicina. Esta linhagem foi utilizada para a conjugação de <i>S. clavuligerus</i>	Paget et al., 1999
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 29665	Produz β-lactamase do tipo I; utilizada como indicadora no bioensaio de ácido clavulânico	ATCC
<i>S. clavuligerus</i>	ATCC 27064	Linhagem selvagem	Higgins e Kastner, 1971
<i>S. clavuligerus</i>	RA+	Mutante utilizado como controle nas fermentações	Rodríguez-García et al., 2007
<i>S. clavuligerus</i>	Δ <i>lat</i>	Mutante deletado no gene <i>lat</i> , resistente à ampicilina e apramicina, ausência na produção de cefamicina C	Este trabalho, (figura 14)
<i>S. clavuligerus</i>	Δ <i>cvm7P</i>	Mutante deletado no gene <i>cvm7P</i> , resistente à canamicina, ausência na expressão da proteína <i>cvm7P</i>	Este trabalho, (figura 23)
<i>S. clavuligerus</i>	Δ <i>lat</i> Δ <i>cvm7P</i>	Duplo mutante, deletados nos genes <i>lat</i> e <i>cvm7P</i> , resistentes a apramicina, ampicilina,	Este trabalho

---

	canamicina e higromicina		
<i>S. clavuligerus</i>	:::rpoZneo	Mutante obtido pela inserção de uma cópia do gene <i>rpoZ</i> de <i>S. coelicolor</i> em <i>S. clavuligerus</i> , resistente à canamicina	Este trabalho, (figura 28)
<i>S. clavuligerus</i>	pAMB4	Mutante utilizado como controle nas fermentações, resistente a ampicilina e neomicina	Este trabalho, (figura 36)
<i>S. clavuligerus</i>	pAMB3rpoZneo	Mutante com plasmídeo multi-cópia do gene <i>rpoZ</i> de <i>S. coelicolor</i> em <i>S. clavuligerus</i> , resistente à ampicilina e canamicina	Este trabalho, (figura 37)

---

### **3.2 Plasmídeos**

Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão apresentados na tabela 2, onde são descritas suas características, bem como a forma de utilização destes vetores.

**Tabela 2.** Plasmídeos utilizados e construídos neste trabalho. Os mapas detalhados dos vetores construídos no decorrer deste estudo são mostrados nas figuras 14, 21, 23, 24, 28 e 29.

Plasmídeo	Descrição geral do plasmídeo	Referência
pGEM®-T Easy	Vetor comercializado por Promega, que foi utilizado para a subclonagem do fragmento CPL5-6 na deleção do gene <i>lat</i>	Promega
pIJ699	Vetor de clonagem com as origens de replicação dos plasmídeos pIJ101. Este vetor foi utilizado como fonte de origem da replicação em <i>Streptomyces clavuligerus</i> .	Kieser e Melton, 1988
pULJP37	Este vetor contém a ORF12 e parte do gene <i>b/p</i> . Utilizado para a construção do plasmídeo final, levando a deleção do gene <i>lat</i> .	Pérez-Llarena et al., 1997
pIJ773	Este plasmídeo se utilizou como fonte de resistência a apramicina e origem de transferência <i>acc3(IV)-oriT</i>	Gust et al., 2003
pULJP37- <i>acc3(IV)</i> -CPL5-6	Plasmídeo pULJP37 com o fragmento CPL5-6 e o cassete de resistência a apramicina	Este trabalho (2009)
pULJP37- <i>acc3(IV)</i> -CPL5-6-699	Este plasmídeo foi construído para deletar o gene <i>lat</i> de <i>S. clavuligerus</i>	Este trabalho (2009)
pBluescript II SK(+/-)	Vetor utilizado na deleção do gene <i>cvm7P</i> , comercializado pela Stratagene	Stratagene
pTC192-Km	Plasmídeo utilizado como fonte do cassete de resistência a canamicina. Contém o gene de resistência a canamicina do transposon Tn5 ( <i>aphII</i> ), clonado em pTC192.	Rodríguez-García et al., 2006
pHZ1358	Este vetor foi utilizado para clonar o fragmento CPL1-2neoCPL7-8	SUN et al., 2009

pIJ10700	Este plasmídeo se utilizou como fonte de resistência a higromicina	Cedido pela Dra. Rosário Pérez-Redondo.
pSKCPL1-2neoCPL7-8Hyg	Este plasmídeo foi construído para a deleção do gene <i>cvm7P</i> em <i>S. clavuligerus</i> , possui resistência à canamicina e higromicina	Este trabalho (2009)
pRA+	Vetor utilizado na inserção do gene <i>rpoZ</i> de <i>S. coelicolor</i> em <i>S. clavuligerus</i>	PÉREZ-REDONDO, et al. 2010
pMB1neo	Este plasmídeo, o qual possui resistência a canamicina foi utilizado como fonte do gene <i>neo</i>	Cedido pela Dra. Rosário Pérez-Redondo
pRAneoZ	Este plasmídeo final foi construído para a inserção do gene <i>rpoZ</i> de <i>S. coelicolor</i> em <i>S. clavuligerus</i>	Foi cedido pela Dra. Mónica Barriuso Iglesias
pAMB2	Vetor utilizado na inserção do gene <i>rpoZ</i> de <i>S. coelicolor</i> em <i>S. clavuligerus</i>	Cedido pela Dra. Rosário Pérez-Redondo
pAMB3	Vetor utilizado na inserção do gene <i>rpoZ</i> de <i>S. coelicolor</i> em <i>S. clavuligerus</i>	Cedido pela Dra. Rosário Pérez-Redondo
pAMB4	Plasmídeo utilizado como controle	Este trabalho (2009)
pAMB3rpoZneo	Plasmídeo construído para a inserção de várias cópias do gene <i>rpoZ</i> de <i>S. coelicolor</i> em <i>S. clavuligerus</i> , o qual possui resistência à ampicilina e canamicina	Este trabalho (2009)

### 3.3 Meios de cultivo

Todos os meios de cultivos foram preparados e esterilizados em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Um volume de 100 mL de meio foram utilizados para os cultivos em Erlenmeyers de 1000 mL.

#### 3.3.1 Usos gerais

O meio **TSB** (tryptone soya broth; **TSA** para meio sólido), foi utilizado para crescimento de *E. coli*, *k. penumoniae* e *S. clavuligerus*. Este meio contém caldo de triptona de soja (30 g L<sup>-1</sup>), pH ajustado para 7,2. Para cultivos em placas é adicionado 1,4% de ágar e para bioensaios de cefamicina C e ácido clavulânico adiciona-se 2,0% de ágar.

#### 3.3.2 Meios de cultivo para *Escherichia coli*

- a) **LB** (Luria Bertani). O meio de cultura LB (MILLER, 1972), de cultivo geral para *E. coli*, tem a seguinte composição em (g L<sup>-1</sup> em água destilada): bacto triptona (10,0); extrato de levedura (5,0); NaCl (10,0). O pH foi ajustado em 7,3 com NaOH.
- b) **TB** (*terrific broth*). Meio de cultivo utilizado para crescimento de *E. coli* e obtenção de alto rendimento de DNA plasmidial (HOBBS et al., 1989). Este meio de cultivo tem a seguinte composição (g/L): bacto triptona 12; extrato de levedura 24; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12,54; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,32; glicerol 4 mL; Água q.s.p. 1000 mL. Após o preparo o meio foi autoclavado por 20 min a 1 atmosfera.



### 3.3.3 Meios de cultivo para *S. clavuligerus*

- a) **ME** (meio de esporulação). Meio utilizado para a esporulação de *S. clavuligerus*, teve a seguinte composição em (g L<sup>-1</sup> em água destilada): MOPS (21); glicose (5); extrato de levedura (0,5); extrato de carne (0,5); hidrolisado de caseína enzimática (1,0). Adiciona-se 2% de ágar e ajusta-se o pH para 7,0 (SÁNCHEZ e BRAÑA, 1996).
- b) **2xYT**. Meio utilizado para a incubação dos esporos de *Streptomyces* na conjugação com *E. coli* ET12567[PUZ8002] (KIESER et al., 2000). Sua formulação é a seguinte em (g L<sup>-1</sup> em água destilada): bacto-triptona (16,0); extrato de levedura (10,0); NaCl (5,0). Se ajusta o pH para 7,4 com NaOH.
- c) **SA** (meio de produção). Meio otimizado para a produção de ácido clavulânico em *S. clavuligerus* (AIDOO et al., 1994), teve a seguinte composição em (g L<sup>-1</sup> em água destilada): amido (10,0); L-asparagina (2,0); MOPS (21,0); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,6); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4,4); solução de elementos traços 1mL. A solução de elementos traço leva por litro: FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1 g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1 g; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 1 g; CaCl<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O 1.3 g e ajusta-se o pH para 6,8.
- d) **SFM** (meio para a conjugação entre *E. coli* ET12567[PUZ8002] e *Streptomyces clavuligerus*). Dissolve-se 20 g de manitol e se ajusta o volume até um litro. Alicotar 100 mL em garrafas e adicionar ágar e farinha de soja, ambas a 2%. Esterilizar duas vezes em autoclave e adicionar MgCl<sub>2</sub> 10 mM, quando se preparam as placas (HOBBS et al., 1989).
- e) **Meio de reativação para as linhagens de *Streptomyces clavuligerus***. O meio tem a seguinte composição (g/L em água destilada): tampão MOPS (21); glicerol (15); peptona bacteriológica (10); extrato de malte (10); extrato de levedura (1); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,5); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,75); solução de sais (1 mL).

Solução de sais para 1 Litro:  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1g);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1g);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1g). O pH deve ser ajustado para 6,8.

- f) **Meio para produção de ácido clavulânico** (MARANESI, 2005). O meio tem a seguinte composição (g/L em água destilada): farinha de soja (20); glicerol (10);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,2); óleo de soja (23); MOPS (21); solução de sais (10 mL). Solução de sais para 1 Litro:  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1g);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1g);  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1g). O pH deve ser ajustado para 6,8.
- g) **Ácido nalidíxico**: 12,5 mg/mL em NaOH 1N.

### 3.4 Enzimas e sistemas comerciais (kits)

As enzimas e os *kits* utilizados neste trabalho foram os seguintes:

- As enzimas de restrição e a enzima klenow para preenchimento de extremidades protuberantes foram obtidas de MBI Fermentas, Amersham Pharmacia Biotech, Takara e Promega.
- A T4 DNA Ligase e a fosfatase alcalina para desfosforilação de extremidades cegas, assim como o tampão foram obtidos da Roche.
- O Kit para amplificação de fragmentos de DNA por PCR foram obtidos da FINNZYMES e KAPABIOSYSTEMS.
- O Kit para purificação de gel de agarose – GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit GE Healthcare [www.gehealthcare.com/illustra](http://www.gehealthcare.com/illustra)

### 3.5 Antibióticos e aditivos

A tabela 3 mostra os antibióticos e aditivos utilizados para a seleção dos recombinantes.

**Tabela 3.** Antibióticos e aditivos utilizados neste trabalho

Antibiótico	<i>S. clavuligerus</i>			<i>E. coli</i>	
	Gene de resistência	Meio sólido	Meio líquido	Meio sólido	Meio líquido
Ampicilina (200 mg/mL)	<i>bla (amp)</i>			100 µg/mL	100 µg/mL
Canamicina (100 mg/mL)	<i>neo (apha II)</i>	50 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL
Cloranfenicol (100 mg/mL)	<i>cat</i>			25 µg/mL	25 µg/mL
Tioestreptona (50 mg/mL)	<i>tsr</i>	50 µg/mL	1 µg/mL		
Apramicina (100 mg/mL)	<i>aac(3)IV (apramicina)</i>	50 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL
Ácido nalidíxico (12,5 mg/mL)		500 µg/mL		25 µg/mL	
Penicilina G (10 mg/mL)				10 µg/mL	
(IPTG) - Isopropil-1-tio-β-D-galactosidase					
0,1 M em água				0,1 – 1 mM	
X-Gal 5-bromo-4-chloro-3-indoil-β-D-galactopiranosídeo 100 mM em dimetilformamida				0,05 mM	

## **3.6 Metodologia**

### **3.6.1 Isolamento, purificação e amplificação de DNA**

Procedimentos comuns em biologia molecular, como extração de plasmídeo com fenol-clorofórmio, precipitação de ácido nucléico, separação por eletroforese, quantificação de biomoléculas por espectrofotômetro, bem como a preparação dos tampões, foram realizados de acordo os procedimento-padrões, descrito por Sambrook et al., (1989) e por Hopwood et al., (1985). Os itens seguintes descrevem tais procedimentos e a tabela 4 apresenta os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

**Tabela 4.** Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Iniciadores utilizados nas reações de PCR	Seqüência (regiões em negrito correspondem aos sítios de restrição)	Comentário
CPL5	5' – <b>AAG CTT</b> GGA GAG CCC ACG AAT GAT G – 3'	Para clonagem do fragmento de 1,4 kb. Contém sítio de restrição para <i>HindIII</i> .
CPL6	5' – <b>CTC GAG</b> AAG ACG TAC GAG GCG AAG – 3'	Para clonagem do fragmento de 1,4 kb. Contém sítio de restrição para <i>XhoI</i> .
LAT-AK-F	TCG GCG CCG CTC GGA ATC AAC C	Para comprovação da interrupção do gene <i>lat</i> mediante PCR. Fragmento de 547 pb.
LAT-AK-R	CGC CGC CCT CGC CCT GGA TG	Para comprovação da interrupção do gene <i>lat</i> mediante PCR. Fragmento de 547 pb.
CPL1	5' – GTG <b>ATC GAT</b> AGT GTC AGG CCG ATG GTG GTT C – 3'	Para clonagem do fragmento de 1,9 kb. Contém sítio de restrição para <i>ClaI</i> .
CPL2	5' – AAG <b>TTC GAA</b> GAA CGA TCG GCT TCC GCA TC – 3'	Para clonagem do fragmento de 1,9 kb. Contém sítio de restrição para <i>HindIII</i> .
CPL7	5' – GTG GAC <b>TGC AGT</b> TGC GAA CCG CGT GTG ATC – 3'	Para clonagem do fragmento de 1,4 kb.

---

CPL8	5' – CGT <b>GGA TAT CAT</b> ACC CGG AGG TGA TGC CCT TC – 3'	Contém sítio de restrição para <i>Pst</i> I. Para clonagem do fragmento de 1,4 kb.
CPL9	5' – GTG TAC GAG TGC AGC GAT G – 3'	Contém sítio de restrição para <i>EcoRV</i> . Para comprovação da deleção do gene <i>cvm7P</i> .
CPL10	5' – TTG TCC TGA CGC AGG ATC – 3'	Para comprovação da deleção do gene <i>cvm7P</i> .
SecRA1 (direto)	CGG GCC TCT TCG CTA TTA C	Para confirmação do inserto do gene <i>rpoZ</i> de <i>S. coelicolor</i> em <i>S. clavuligerus</i>
SecRA2 (reverso)	AGG GAA AAC GGG GAT ATC	Para confirmação do inserto do gene <i>rpoZ</i> de <i>S. coelicolor</i> em <i>S. clavuligerus</i>

---

### **3.6.2 Extração de DNA de *Escherichia coli***

Pequenas quantidades de DNA plasmidial, a partir de células de *Escherichia coli* foram extraídas por Miniprep (HOLMES e QUIGLEY, 1981) com modificações propostas por Ausubel *et al.* (1994). DNA plasmidial em altas concentrações foi isolado pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Em ambos os casos, *Escherichia coli* recombinante foi cultivadas em meio TB suplementado com o antibiótico de seleção.

### **3.6.3 Extração de DNA genômico de *S. clavuligerus***

Para a extração de DNA genômico de *S. clavuligerus* e conjugantes foi utilizado o protocolo modificado por Pospiech e Neumann (1995).

### **3.6.4 Reações de polimerização em cadeia PCR**

As amplificações das seqüências codificadoras específicas, foram feitas por PCR segundo os protocolos de Kieser *et al.*, (2000). Os deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) foram preparados a partir de nucleotídeos individuais (Promega), na proporção de 15:15:35:35 de A, T, G e C, respectivamente, ou seja A e T apresentaram a concentração final de 480  $\mu$ molar, ao passo que C e G, 1120  $\mu$ molar. Esta proporção de nucleotídeos se deve a alta porcentagem de C + G, presentes no genoma de *S. clavuligerus*. Dependendo da finalidade dos fragmentos que se queriam amplificar, se utilizaram as enzimas *KAPA Taq Polymerase* (KAPA BIOSYSTEMS) e *Phusion<sup>TM</sup> High-fidelity DNA Polymerase* (FINNZYMES).

### **3.6.5 Análise dos ácidos nucléicos em gel de agarose**

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para análise e avaliação do tamanho dos fragmentos de DNA e dos plasmídeos, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). A agarose foi preparada em tampão TAE 1X em concentração final de 0,8 ou 1,2% para visualização dos fragmentos de DNA em transiluminador com lâmpada ultravioleta.

### **3.6.6 Determinação da concentração de DNA**

O DNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando-se difenilamina como agente cromóforo, segundo a metodologia proposta por Burton (1968).

## **3.7 Dosagem de ácido clavulânico**

### **3.7.1 Dosagem por bioensaio**

O microrganismo indicador utilizado para se determinar a concentração de ácido clavulânico foi *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, produtora de  $\beta$ -lactamase. Os bioensaios foram realizados imediatamente após as tomadas de amostras, devido à instabilidade de AC em solução, segundo o protocolo estabelecido por Romero et al. (1984).



### 3.7.2 Dosagem por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

A concentração de ácido clavulânico foi determinada por HPLC, segundo a metodologia descrita por Foulstone e Reading (1982), utilizando coluna C-18  $\mu$ -Bondapak e como eluente uma solução de 100 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  94% (m/v) e pH 3,2. Foram utilizadas as seguintes condições de operação: temperatura de 28°C, vazão de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ , comprimento de onda de 311 nm e tempo de retenção de 8 minutos. A concentração de ácido clavulânico foi determinada a partir de uma curva de calibração obtida de soluções de 0-0,5 mM de clavulanato de potássio proveniente medicamento CLAVULIN<sup>®</sup> (Glaxo-SmithKline Farmacêutica, Rio de Janeiro, Brasil), disponível comercialmente. As amostras provenientes dos ensaios foram centrifugadas a 4°C e 10.000 rpm por 15 minutos, foram derivatizadas com imidazol (TEODORO et al., 2006) e injetadas no HPLC para as leituras.

### 3.8 Dosagem de cefamicina C

O microrganismo indicador foi a linhagem super sensível de *Escherichia coli* Ess22-35. A metodologia de dosagem de CefC foi baseado nos protocolos estabelecidos por Romero *et al.* (1984).

### **3.9 Transformações bacterianas**

#### **3.9.1 Transformação de *Escherichia coli***

Duas linhagens de *E. coli* foram utilizadas para as transformações, *E. coli* DH5 $\alpha$  e *E. coli* ET12567[PUZ8002]. Para a conjugação de *Streptomyces clavuligerus* a linhagem utilizada é a *E. coli* ET12567[PUZ8002]. Os protocolos para transformação destas duas linhagens de *E. coli* foram baseados na metodologia segundo Hanahan (1983, 1995).

#### **3.9.2 Conjugação de *S. clavuligerus***

O processo de conjugação foi utilizado para a introdução de DNA em *S. clavuligerus*, devido à maior eficiência do processo frente à transformação. O vetor pUZ8002, que não é móvel, mas que pode mobilizar vetores que contêm *oriT*, se transforma na linhagem de *E. coli* ET12567[pUZ8002]. Neste processo foram utilizados os protocolos estabelecidos por Kieser et al. 2000 e Gust et al. (2003, 2010), mostrados a seguir:

- Os plasmídeos recombinantes a serem transferidos por conjugação foram inseridos na linhagem de *E. coli* ET12567[pUZ8002] por transformação por choque térmico, devendo conter os seguintes antibióticos: (1) o antibiótico que o plasmídeo carrega o cassete de resistência, (2) os antibióticos cloranfenicol e canamicina, os quais a linhagem já apresenta resistência.

- 
- A linhagem transformante foi cultivada durante toda a noite em meio LB, cloranfenicol, canamicina e o antibiótico apramicina para o mutante  $\Delta lat::apr$  ou canamicina para o mutante  $\Delta cvm7p::neo$ .
  - O volume de 1 mL de cultivo (na capela) foi transferido a outro volume de 100 mL de meio LB com todos os antibióticos de seleção e mantidos a 37°C até alcançar a densidade óptica entre 0,4 a 0,6.
  - Uma vez alcançada a densidade óptica, foi centrifugado a 4°C e 4500 rpm e lavado duas vezes com um volume de meio LB. Foi finalmente ressuspendido em 0,1 volume de meio LB.
  - Os esporos de *S. clavuligerus* foram inoculados em 500  $\mu$ L de meio 2xTY e incubados a 50°C durante 10 minutos.
  - 500  $\mu$ L de células lavadas (na capela) foram misturados com 500  $\mu$ L de esporos. Foi dado um pulso na centrífuga, para eliminar parte do sobrenadante e a mistura de células ressuspendidas em 600  $\mu$ L.
  - Distintas quantidades de células preparadas anteriormente foram plaqueadas em meio SFM suplementado com 10 mM de  $MgCl_2$ , e incubadas a 30°C por um período de 16 a 20 horas.
  - Após o período de incubação foram adicionadas em capela 1 mL de solução do antibiótico de seleção do plasmídeo em *Streptomyces* e 0,5 mg/mL de ácido nalidíxico.

Além de se utilizar esporos no processo de conjugação, pode-se fazer com micélio obtido de placas. Para isto, deixa-se crescer *S. clavuligerus* em meio TSA durante dois a três dias, e recolhe-se com alça o micélio o qual é ressuspendido em

2-3 mL de glicerol a 20%. Para o processo de conjugação se utilizam 500 µL da suspensão seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

Nas transformações de *Escherichia coli*, o seu DNA plasmidial é extraído por mini-preparações para se comprovar, que não foram produzidas reorganizações nos plasmídeos por meio de análises de restrição. Em todos os casos em que se introduz plasmídeos em *S. clavuligerus* mediante o método de conjugação ou de transformação, o DNA dos conjugantes ou transformantes devem ser extraídos pelo método de Pospiech e Neumann, 1995.

Neste trabalho foi utilizado a estratégia de disrupção gênica por troca alélica, na maioria dos mutantes produzidos.

### **3.10 Conservações das linhagens**

Os microrganismos foram conservados em criotubos, suas células foram suspensas em solução crioprotetora (glicerol 20% m/v) e estocadas a - 70°C no *ultra-freezer*.

### **3.11 Fermentações em incubadora rotatória orbital**

As fermentações de todas as linhagens em meio de cultivo SA foram realizadas no laboratório de microbiologia e genética da Universidade de León-Espanha. E as fermentações das linhagens em meio de cultivo a base de óleo de soja (MARANESI et al., 2005) foram realizadas no laboratório de engenharia bioquímica do PPGEQ-UFSCar, São Carlos-SP, da seguinte maneira: as suspensões de células armazenadas em criotubos (3,5 mL) foram inoculadas em 45 mL de meio de reativação em frascos Erlenmeyer de 500 mL e incubadas em mesa

rotativa a 28°C e 250 rpm por 24 horas. Na sequência, 5 mL do inóculo fermentado nesta etapa foi adicionado em frasco Erlenmeyer (500 mL) com 45 mL de meio de cultura e incubado em mesa rotativa nas mesmas condições anteriores. Esta etapa se caracteriza pela produção do ácido clavulânico em meio de cultivo a base de óleo de soja (MARANESI, 2005). Todas as fermentações foram realizadas em triplicata e foram calculados os valores médios dos parâmetros analisados.

### **3.12 Ensaios da atividade lipolítica pelo método do para-nitrofenilpalmitato (pNPP)**

Os ensaios de lipase foram feitos sempre utilizando o meio de cultivo a base de óleo e farinha de soja (MARANESI et al., 2005) e todos os experimentos foram realizados no laboratório de bioquímica do PPGEQ-UFSCar.

Os ensaios para determinação da atividade lipolítica foi realizado por espectrofotometria, a 37°C, utilizando-se como substrato, o pNPP, de acordo com o método descrito por Gupta et al. (2002). Somente o sobrenadante das fermentações foi utilizado para a análise da atividade lipolítica.

Uma unidade de lipase foi definida como a quantia de lipase que libera 1  $\mu\text{mol}$  *p*-nitrofenol/min, sob as condições do teste. Os resultados expressos foram calculados pela média de fermentações corridas em triplicata.

### **3.13 Sequenciamento de DNA**

Fragmentos de DNA clonados nos plasmídeos foram seqüenciados no INBIOTEC, Instituto de Biotecnologia de León-Espanha.

### 3.14 Construções dos plasmídeos

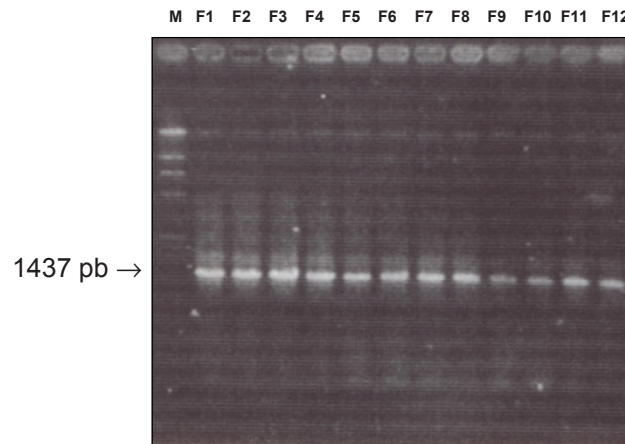
#### 3.14.1 Construções dos mutantes por disrupção gênica

##### 3.14.1.1 Construção do plasmídeo pJP37-acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699 para produzir o mutante *Streptomyces clavuligerus* $\Delta lat::apr$ por disrupção do gene *lat*

O principal objetivo deste estudo foi a interrupção do gene *lat* por disrupção gênica no genoma de *Streptomyces clavuligerus*, baseado na hipótese que a eliminação da via biossintética da cefamicina C aumentaria a produção do AC. Este gene havia sido deletado por Paradkar e colaboradores (2001), que demonstraram um aumento na produção de AC em 2 a 2,5 vezes, com 66 horas de cultivo, em meio SA.

Neste trabalho, deletou-se o gene *lat* de *Streptomyces clavuligerus*, por disrupção gênica, para estudar o seu efeito na produção de AC e construir um duplo mutante, deletado também no gene *cvm7P* (item 3.14.1.3). O plasmídeo pULJP37 (PÉREZ-LLARENA, 1997) foi utilizado como base para todas as construções do presente trabalho. O mutante, não produtor de cefamicina C, foi denominado *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr$ .

Utilizando-se os oligonucleotídeos CPL5 e CPL6 descritos (ver tabela 4), e DNA genômico extraído da linhagem selvagem *S. clavuligerus*, foi amplificado por PCR (figura 7), parte do gene *pcbAB* (sobre a sequência SCU12015), localizado imediatamente a jusante do gene *lat*.



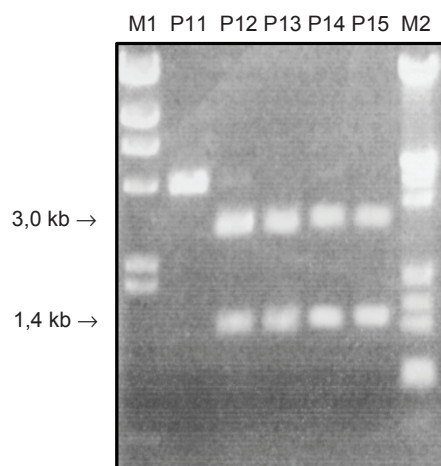
**Figura 7. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR obtidos por amplificação do fragmento de 1437 pb, do gene *pcbAB* com os iniciadores CPL5 E CPL6. M = marcador molecular  $\lambda_{\text{HindIII}}$ . As designações F1-F4 correspondem aos produtos PCR com 1 mM  $\text{Mg}^{+2}$ , F5-F8 1,5 mM  $\text{Mg}^{+2}$  e F9-F12 com 2,5 mM  $\text{Mg}^{+2}$ . As bandas específicas do fragmento gênico estão representadas pela seta e seu respectivo tamanho.**

O fragmento CPL5-6 de 1437 pb corresponde a parte do gene *pcbAB* (figura 14). Este gene está localizado a jusante do gene *lat* em *Streptomyces clavuligerus*. O gene *pcbAB* foi purificado pelo kit GE para a clonagem no plasmídeo pGEM-T, sem digestão, ou seja com extremidades não-coesivas (abruptas). A construção no vetor de clonagem foi denominada pGEM-CPL5-6 e a escolha deste sistema foi empregada para a propagação, baseada no fato deste vetor ser muito conveniente para clonar produtos de PCR e facilitar a seleção dos clones positivos. Este vetor apresenta 3015 pb e contém duas marcas de seleção ao longo de sua seqüência, um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina e outro gene que codifica para a proteína  $\beta$ -galactosidase. Os plasmídeos recombinantes pGEM-CPL5-6 recém construídos foram inseridos por choque térmico em bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. As bactérias transformadas por choque térmico foram semeadas em

placa de Petri contendo meio LB, ágar, ampicilina, X-gal e IPTG e crescidas durante a noite em estufa e incubadas a 37°C.

Diversas colônias brancas e azuis cresceram na placa contendo o meio selecionado descrito acima. A seleção dos transformantes foi realizada então pela capacidade de crescer em presença do antibiótico ampicilina e através da coloração branca de algumas colônias transformantes indicativa da presença do inserto dentro da região codificadora da enzima  $\beta$ -galactosidase.

Foram obtidos 24 clones (colônias brancas) resistentes a ampicilina, que foram inoculados em tubos estéreis contendo meio LB líquido com ampicilina e submetidos à incubação durante a noite a 37°C sob agitação. Após crescimento individual destas colônias seus DNAs plasmidiais foram extraídos, quantificados, clivados com *EcoRI* para checar a presença do inserto e, finalmente sequenciados. Destes clones, cinco foram selecionados para outra análise de restrição com a digestão dupla das enzimas *HindIII/XhoI* (figura 8).

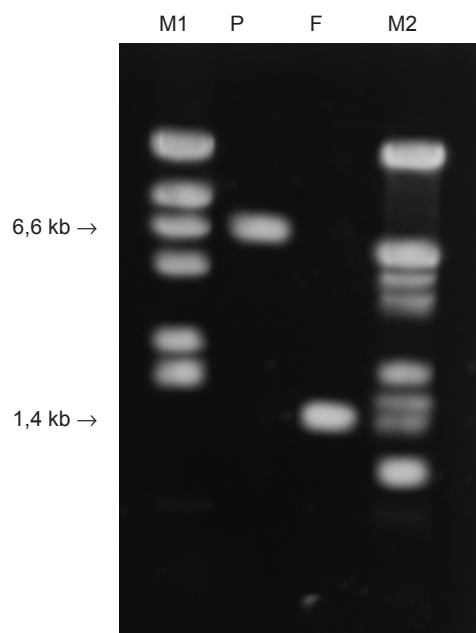


**Figura 8. Digestão do plasmídeo pGEM-CPL5-6 com as enzimas de restrição *HindIII/XhoI*. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8%. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{EcoRI/HindIII}$ , P11-P15 = plasmídeos dos clones 11 a 15. As bandas específicas dos fragmentos gênicos estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.**



Os clones 12 e 13 contendo o plasmídeo recombinante (vetor pGEM-T com o inserto CPL5-6), foram selecionados para os experimentos posteriores. Seus plasmídeos foram extraídos por lise alcalina e ressuspensos em tampão TE. Sequenciou-se o DNA do fragmento CPL5-6 e fez-se um BLAST no programa disponível no site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), o mesmo mostrou uma analogia de 96% com o gene *pcbAB* de *S. clavuligerus*, confirmando a região alvo desejada. O vetor pGEM-CPL5-6 do clone 12 foi digerido com as enzimas *HindIII/XhoI* para a liberação do fragmento CPL5-6 de 1437 pb, o qual foi purificado para a posterior clonagem no plasmídeo pULJP37.

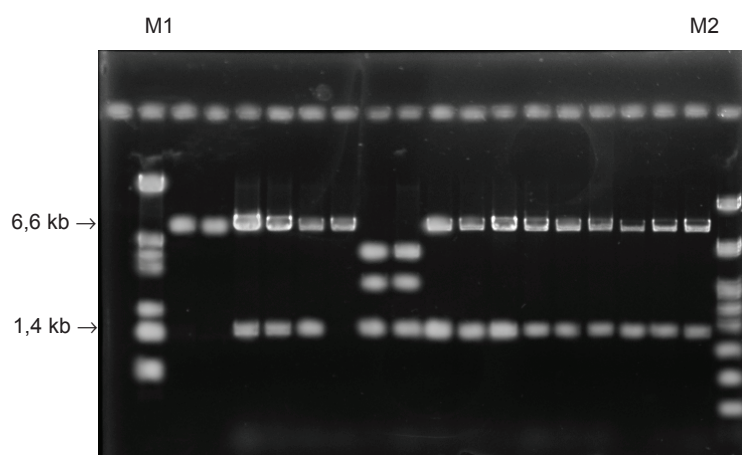
O vetor pULJP37 de 6631 pb, foi construído pelo grupo de pesquisa da professora Dra. Paloma Liras. Este plasmídeo contém: um fragmento do gene *pcbAB* de 1408 pb, um fragmento do gene *ccaR* de 770 pb, um fragmento da ORF12 de 1016 pb, um fragmento do gene *bip* de 548 pb, e um marcador de seleção, o gene de resistência ao antibiótico ampicilina de 857 pb. Este vetor, também foi digerido com as mesmas enzimas do fragmento CPL5-6 e um novo gel de agarose foi feito para se comprovar seus respectivos tamanhos (figura 9).



**Figura 9.** Análise eletroforética das digestões do fragmento CPL5-6 e do vetor pULJP37. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pGEM-CPL5-6 com a digestão dupla de *HindIII/XhoI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII/EcoRI}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , F = fragmento CPL5-6 e P = plasmídeo pULJP37. As bandas específicas do fragmento gênico e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.

Comprovado os respectivos tamanhos do inserto e do plasmídeo, foi feita a ligação do plasmídeo pULJP37 com o fragmento CPL5-6. A mesma, foi deixada durante a noite (4°C) e os plasmídeos denominados pULJP37-CPL5-6 foram inseridos por choque térmico em *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. As bactérias transformadas foram semeadas em placa de Petri contendo ampicilina e crescidas durante a noite em estufa por incubação a 37°C. Diversos clones cresceram na placa contendo o antibiótico de seleção, a ampicilina e, vinte destes, foram repicados em meio líquido contendo ampicilina, sob novo cultivo de 24 horas.

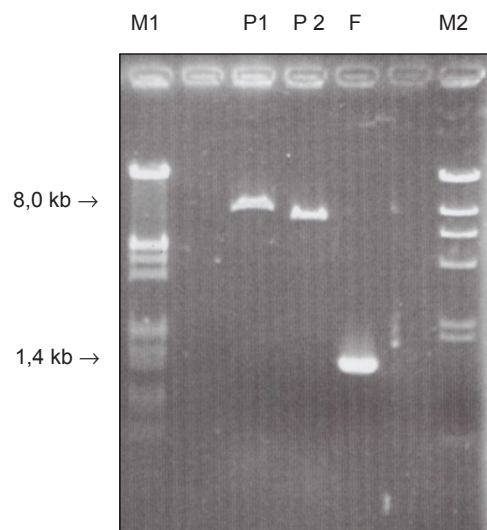
Os plasmídeos pULJP37-CPL5-6 foram extraídos por mini-preparações e foi feita uma análise de restrição com uma digestão dupla com as enzimas *HindIII/XhoI* (figura 10).



**Figura 10.** Análise eletroforética das digestões dos clones contendo os plasmídeos pULJP37-CPL5-6. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pULJP37-CPL5-6 com a digestão dupla de *HindIII*/*XhoI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{pst}}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{HE}}$ , e as bandas de 6,6 kb e 1,4 kb correspondem: ao fragmento CPL5-6 e ao plasmídeo pULJP37, respectivamente.

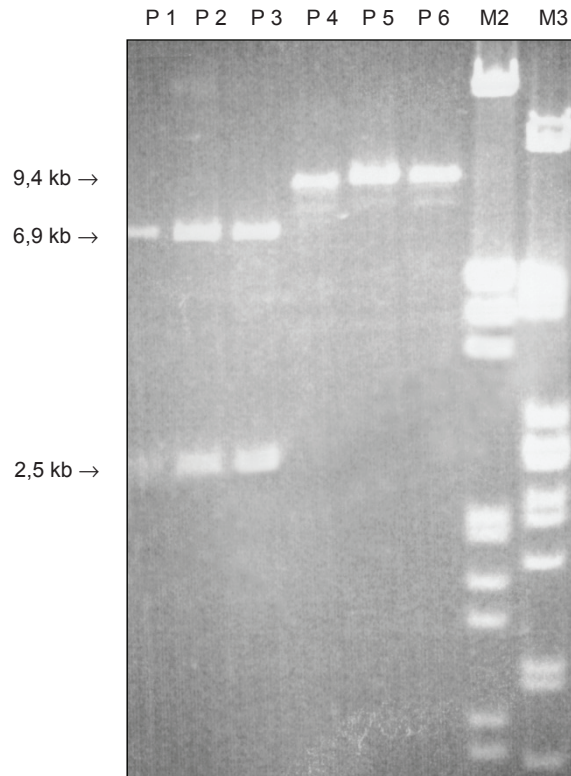
Confirmado os respectivos tamanhos do fragmento CPL5-6 e do plasmídeo pULJP37, o plasmídeo pULJP37-CPL5-6 foi clivado com as enzimas *HindIII* e *EcoRI*, para os experimentos posteriores, a clonagem do gene *acc(3)IV* (figura 11). As digestões com as enzimas *HindIII* e *EcoRI* mostraram apenas cortes únicos no plasmídeo pULJP37-CPL5-6.

O plasmídeo pIJ773 de 4334 pb tem dois marcadores de seleção: o gene *amp* de resistência a ampicilina, o gene *acc(3)IV* de resistência a apramicina e *oriT* (origem de replicação em *Streptomyces clavuligerus*). Este plasmídeo foi utilizado como fonte de resistência a apramicina e de *oriT*, e foi digerido duplamente com as enzimas *HindIII* e *EcoRI*. O fragmento liberado de 1,4 kb correspondente ao gene *acc(3)IV* foi excisado do gel de agarose 0,8% e purificado (figura 11) pelo *Kit* de purificação.



**Figura 11.** Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pULJP37-CPL5-6 e pIJ773. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pULJP37-CPL5-6 com a digestão das enzimas *HindIII* e *EcoRI* e da digestão dupla do plasmídeo pIJ773. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , P1 = pULJP37-CPL5-6 (8 kb) digerido com *EcoRI*, P2 = pULJP37-CPL5-6 digerido com *HindIII* e F (fragmento) = gene *acc(3)IV* (1,4 kb) obtido de pIJ773. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.

O plasmídeo pULJP37-CPL5-6 e o gene *acc(3)IV*, ambos digeridos com *HindIII/EcoRI* foram ligados para a transformação em *E. coli DH5 $\alpha$* . Este sistema foi deixado durante a noite em meio de cultivo contendo LB e apramicina. A transformação por choque térmico foi efetiva, produzindo muitos clones recombinantes. O novo plasmídeo foi denominado pULJP37-*acc(3)IV*-CPL5-6 e possui 9411 pb. Dezoito clones recombinantes deste sistema foram selecionados, e cultivados em meio líquido contendo LB e apramicina. Destes, três clones recombinantes tiveram seus plasmídeos extraídos por mini-preparações para as digestões com as enzimas: *XhoI* digestão simples e *HindIII/ClaI* como digestão dupla (figura 12).



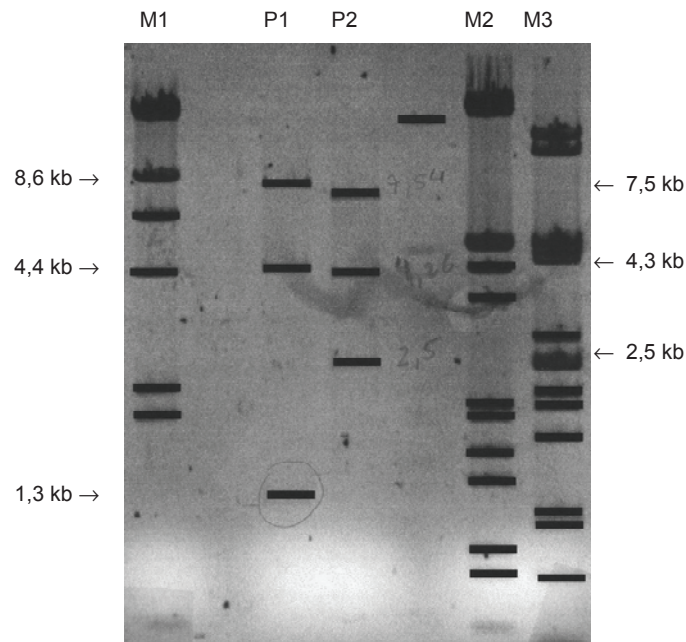
**Figura 12.** Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6 com a digestão dupla das enzimas *HindIII*/*ClaI* e digestão da enzima *XhoI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , M3 = Marcador molecular  $\lambda_{pst}$ , colunas P1-P3 = plasmídeo pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6 digerido com *XhoI*, colunas P4-P6 = plasmídeo pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6 digerido com *HindIII*/*ClaI*. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.

A análise de restrição com as digestões simples e duplas mostrou que a digestão com a enzima *XhoI* liberou os dois fragmentos esperados, um de 2509 pb e o outro de 6902 pb e a linearização do plasmídeo com a digestão dupla de *HindIII*/*ClaI*. Esta digestão dupla, por sua vez caracterizou apenas a linearização do plasmídeo (9411 pb), ao invés de liberar os dois fragmentos esperados de 4258 e 5153 pb. Com isto conclui-se que apenas uma das enzimas cortou o DNA, provavelmente a *HindIII*, pois a enzima *ClaI* sofre efeito de metilação e sua digestão geralmente não é muito eficaz. Porém, somente com o resultado positivo da

digestão do plasmídeo pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6 com *XhoI* assumiu-se que a construção do vetor estava correta, uma vez que na digestão dupla o tamanho do plasmídeo íntegro foi exatamente 9,4 kb.

A última etapa da construção do plasmídeo para a deleção do gene *lat* foi a inserção do gene de resistência a estreptomicina, gene *tsr*, e da inserção da origem de replicação (*oriT*) do plasmídeo pIJ699. Este plasmídeo foi digerido com *XbaI/BamHI* liberando três fragmentos; de 4,92 kb apenas com extremidades *XbaI*, 2,51 kb e 1,66 kb com extremidades *XbaI* e *BamHI*. Todos os fragmentos (figura 14) foram identificados em gel de agarose 0,8% e o fragmento de 4,92 kb foi recuperado do mesmo para os posteriores procedimentos. Este fragmento foi ligado ao plasmídeo pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6 digerido com *SpeI* e desfosforilado em tratamento com a enzima alcalina fosfatase.

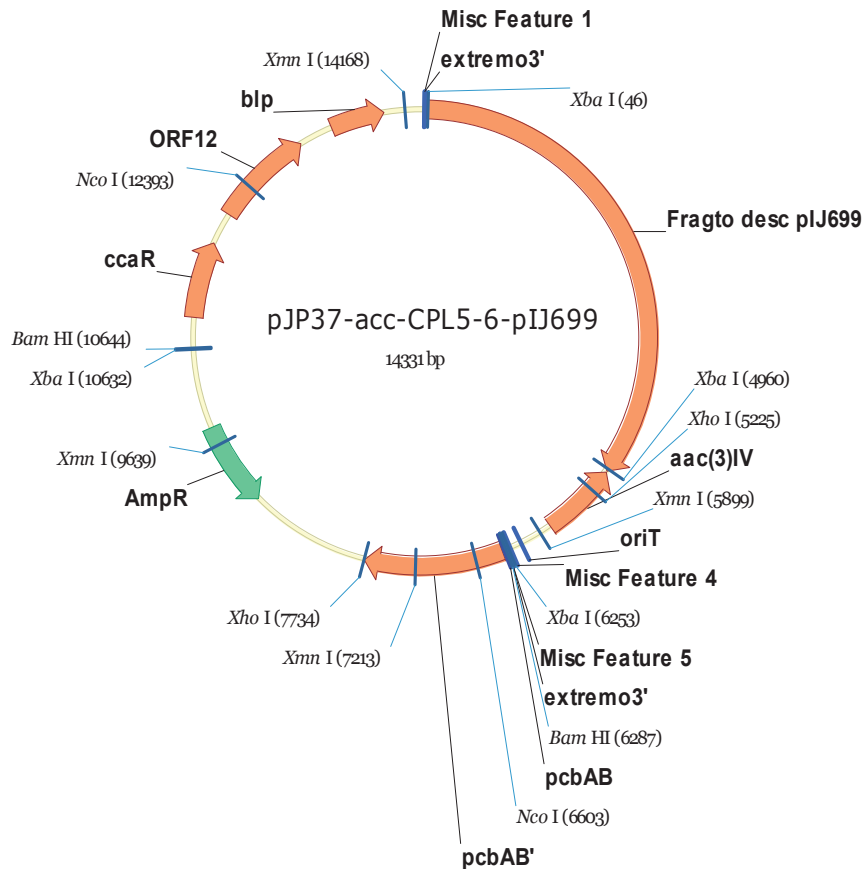
A ligação do fragmento de 4,92 kb do plasmídeo pIJ699 no vetor pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6 foi feita e este novo vetor foi inserido em *E. coli* DH5 $\alpha$ , a qual foi transformada por choque térmico. Obtiveram-se muitos clones, dos quais foram extraídos seus plasmídeos por mini-preparações e uma nova análise de restrição (figura 13) com as enzimas *XbaI* e *XhoI*, foi feita para se comprovar as devidas inserções e orientações no plasmídeo, que agora fora denominado pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699. Este plasmídeo final possui 14.331 pb e seu esquema completo é mostrado na figura 14.



**Figura 13.** Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699 com a digestão da enzima *Xho*I e *Xba*I. Os tamanhos dos fragmentos a esquerda se referem à digestão com a enzima *Xba*I e a direita com *Xho*I. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{HindIII}}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{HE}}$ , M3 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{pst}}$ , P1 = plasmídeo pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699 digerido com *Xba*I, P2 = plasmídeo pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699 digerido com *Xho*I. As bandas específicas dos fragmentos gênicos estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.

Na análise de restrição pode-se observar que houve a liberação de três fragmentos com a digestão com *Xba*I, 8,6; 4,4 e 1,3 kb, confirmando a construção correta do plasmídeo. Embora apareça quatro sítios de *Xba*I na figura 14, um deles, na posição 46 do plasmídeo se perdeu na clonagem do fragmento de 4,92 kb no vetor pIJ699. A segunda confirmação foi feita com a digestão da enzima *Xho*I, a qual liberou também três fragmentos de 7,5; 4,3 e 2,5 kb, comprovados pela figura 13.





**Figura 14.** Mapa do vetor pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699 construído nesta tese.

Como o último fragmento a ser inserido no vetor possuía os dois extremos com *Xba*I, não é possível saber a orientação correta deste fragmento de 4,92 kb no plasmídeo pULJP37-acc(3)IV-CPL5-6-pIJ699, porém todas as outras orientações construídas neste plasmídeo estão corretamente representadas.

Com a montagem deste plasmídeo, o mesmo foi inserido por choque térmico em *E. coli* DH5 $\alpha$  e subsequentemente na linhagem de *Escherichia coli* ET12567[pUZ8002], a qual foi utilizada para a conjugação em *Streptomyces clavuligerus*.

A conjugação foi feita e gerou-se conjugantes, ou seja, mutantes de *Streptomyces clavuligerus* com o gene *lat* interrompido pela inserção do gene *acc3(IV)*. O mutante produzido apresenta resistência a canamicina e apramicina e



---

sensibilidade à toiespreptona. Várias esporulações foram feitas para que a linhagem recombinante apresentasse somente a resistência à canamicina e à apramicina.

#### **3.14.1.2 Construção do plasmídeo pSKCPL1-2neoCPL7-8Hig para produzir o mutante *Streptomyces clavuligerus* $\Delta$ *cvm7P::neo* por disrupção do gene *cvm7P* da rota biossintética das clavamas 5S, resistente a canamicina e higromicina**

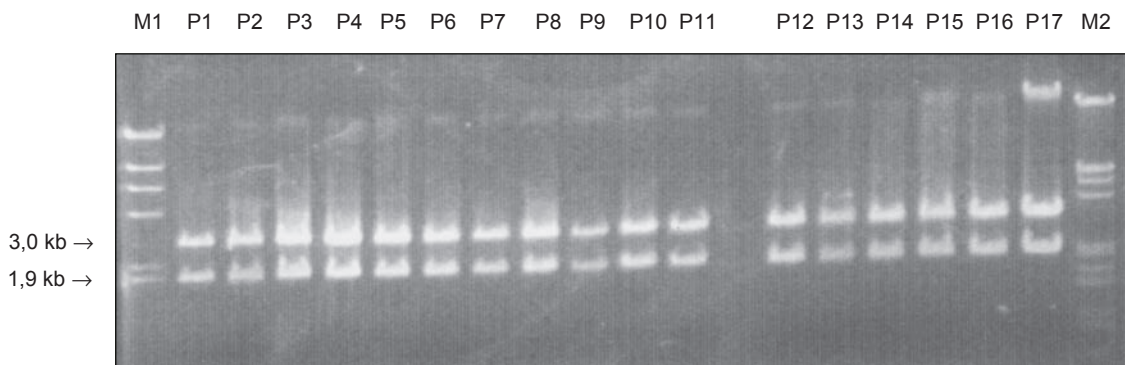
*Streptomyces clavuligerus* também produz clavamas, que são moléculas com estruturas similares a do ácido clavulânico, mas com estereoquímica 5S em vez de 5R. As cinco clavamas mais conhecidas são: 2-carboximetilodenemclavama, 2-formiloximetilclavama, 2-hidroximetilclavama, clavama-2-carboxilato e alanilclavama (figura 3) e não possuem atividade inibidora de  $\beta$ -lactamases, mas alguns destes representantes desta família possuem atividade antifúngica ou antibacteriana (BROWN *et al.* 1976).

O gene *cvm7P* codifica um regulador transcricional específico para a biossíntese das clavamas 5S. Tahlan e colaboradores (2007) mutaram o gene *cmv7P* e constataram que este bloqueio elimina completamente a produção de clavamas, mas não do ácido clavulânico.

E com o intuito de investigar se a disrupção do gene *cvm7P* alteraria a produção de ácido clavulânico em *Streptomyces clavuligerus*, foi construído o mutante denominado *Streptomyces clavuligerus* *cvm7P::neo*. E para tal estudo dois pares de iniciadores foram desenhados para a interrupção do gene *cvm7P* em *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. O fragmento de 1,9 kb, denominado CPL1-2 corresponde a ORF1 a montante do gene *cvm7P* e o fragmento de 1,4 kb correspondente ao gene *cvm6P* localizado a jusante do gene *cvm7P*, e ambos os

fragmentos, foram amplificados por *PCR* utilizando-se DNA genômico da linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* como molde.

O fragmento CPL1-2 de 1,9 kb foi purificado do gel de agarose, ligado ao plasmídeo pGem-T e foi inserido em *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico. A inserção do fragmento foi comprovada por análise de restrição, digerindo os plasmídeos recombinantes com as enzimas *Hind*III/*Xho*I e com *Sma*I/*Pst*I, ambas digestões duplas (dados não mostrados). O fragmento CPL1-2 foi recuperado com a digestão de *Not*I, purificado do gel de agarose e clonado no plasmídeo pSK+ (pBluescript II SK (+/-)), previamente digerido também com a mesma enzima. Obtiveram-se muitos clones recombinantes e seus plasmídeos foram extraídos por mini-preparações e uma nova digestão com *Not*I foi feita para comprovação do inserto CPL1-2 no vetor pSK+ (figura 15).

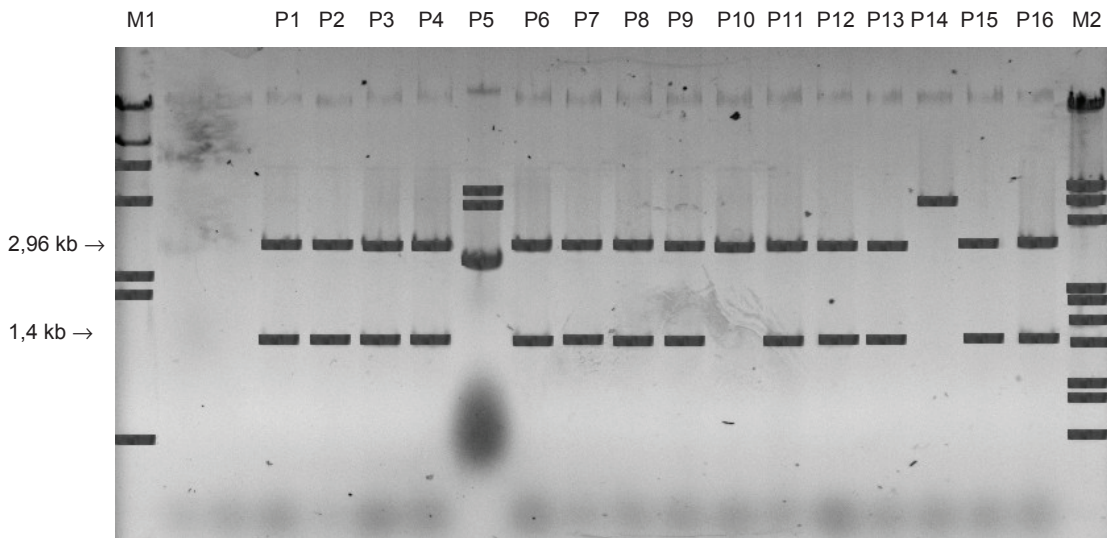


**Figura 15. Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pSK-CPL1-2. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pSK-CPL1-2 com a digestão da enzima *Not*I. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , P1-P17 = plasmídeo pSK-CPL1-2 digerido com *Not*I. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.**

Na digestão do plasmídeo PSK-CPL1-2 com NotI foi liberado um fragmento de 1,9 kb correspondente ao CPL1-2 e o fragmento de 2.961 pb correspondente ao vetor pSK+, comprovando a correta montagem do plasmídeo.

O outro fragmento de DNA denominado CPL7-8 foi amplificado por PCR utilizando o DNA genômico de *Streptomyces clavuligerus* como molde. Este fragmento de 1,4 kb (a jusante do gene *cvm7P*) corresponde ao final do gene *cvm7P* e grande parte do gene *cvm6P*. O fragmento CPL7-8 foi digerido com *EcoRV* e *PstI*, ligado ao plasmídeo PSK+, previamente digerido com as mesmas enzimas e inserido em *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico. Cresceram muitos clones recombinantes, dos quais seus plasmídeos foram extraídos por mini-preparações, e 24 destes clones foram selecionados para as análises de restrição. O novo plasmídeo foi denominado pSK-CPL7-8 e possui 4,4 kb de tamanho aproximadamente.

Para se comprovar a inserção do fragmento CPL7-8 no plasmídeo, bem como sua orientação, o plasmídeo pSK-CPL7-8 foi digerido (digestão dupla) com as enzimas *EcoRV/PstI* (figura 16).



**Figura 16. Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pSK-CPL7-8. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pSK-CPL7-8 com a digestão dupla das enzimas *EcoRV/PstI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , P1-P16 = plasmídeo pSK-CPL7-8 digeridos com *EcoRV/PstI*. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.**

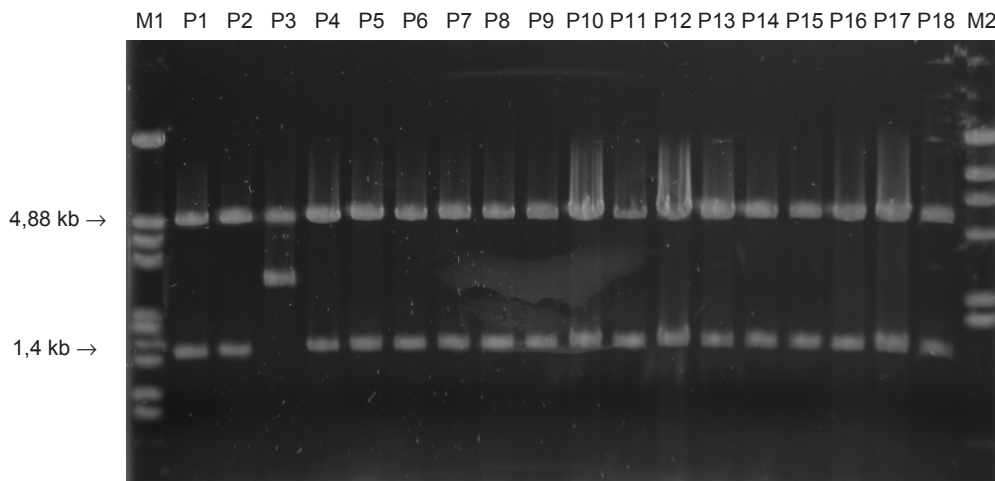
A análise de restrição mostrou que a construção estava correta, pois havia duas bandas de DNA, uma de 1,4 kb correspondente ao fragmento CPL7-8 e a outra de 2,96 kb, correspondente ao plasmídeo pSK+.

Para uma segunda confirmação da correta construção do plasmídeo pSK-CPL7-8 foi feita uma outra análise de restrição, com a enzima *BstXI*. O plasmídeo recombinante foi digerido e apresentou duas bandas de DNA (dados não mostrados) no gel de agarose 0,8%, uma de 1,4 e a outra de 2,96 kb, confirmando mais uma vez a construção correta do plasmídeo para a deleção do gene *cvm7P*.

Duas lises alcalinas foram feitas para se extrair os plasmídeos de pSK-CPL1-2 e pSK-CPL7-8, dos clones 3 e 8, respectivamente. O fragmento CPL7-8 de 1,4 kb foi liberado após digestão dupla com *EcoRV/PstI* e ligado ao vetor pSK-CPL1-

2, digerido previamente com a mesma enzima. Isto foi possível, pois o sítio de restrição de *Pst*I está somente a 6 pares de bases (a jusante) distante do sítio de *Eco*RV. Este novo plasmídeo foi denominado de pSK-CPL1-2-CPL7-8 e possui 6,26 kb de tamanho.

O plasmídeo foi inserido em *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico. Cresceram muitos clones resistentes a ampicilina, característica intrínseca do plasmídeo pBluescript II SK (+/-), o qual possui o gene *Amp*. Destes, 24 foram selecionados para a digestão dupla com *Eco*RV/*Pst*I e o resultado da análise de 18 destes clones está mostrado na figura 17.



**Figura 17. Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pSK-CPL1-2-CPL7-8 com a digestão dupla das enzimas *Eco*RV/*Pst*I. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , P1-P18 = plasmídeo pSK-CPL1-2-CPL7-8 digeridos com *Eco*RV/*Pst*I. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.**

A análise de restrição com as enzimas *Eco*RV/*Pst*I mostrou que a nova construção do plasmídeo para a disrupção do gene *cvm7P* continuava correta,

houve a liberação de um fragmento de 1,4 kb correspondente a parte do gene *cvm7P* e do outro fragmento maior de 4.877 pb correspondendo ao vetor PSK-CPL1-2.

O clone 5 foi escolhido para a extração de seu plasmídeo por lise alcalina e para as outras etapas da construção do plasmídeo final. O plasmídeo pSK-CPL1-2-CPL7-8 deste clone foi digerido com a enzima *Xba*I para receber um fragmento gênico do plasmídeo pTC192-km. Este plasmídeo contém o gene *aphII*, também chamado *neo*, que confere resistência a canamicina e neomicina. O plasmídeo pTC192-km foi digerido com *Xba*I liberando um fragmento de 1.385 pb, correspondente ao gene *neo* e outro de 2.668 pb do restante do plasmídeo.

O fragmento correspondente ao gene *neo* de 1.385 pares de bases, com extremidades *Xba*I, foi purificado do gel de agarose 0,8% (figura 18) para ser ligado ao vetor pSK-CPL1-2-CPL7-8.

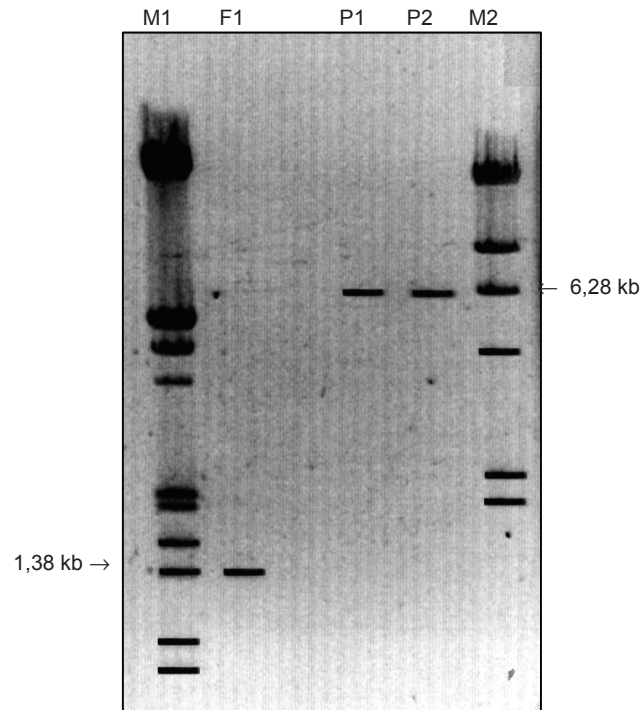
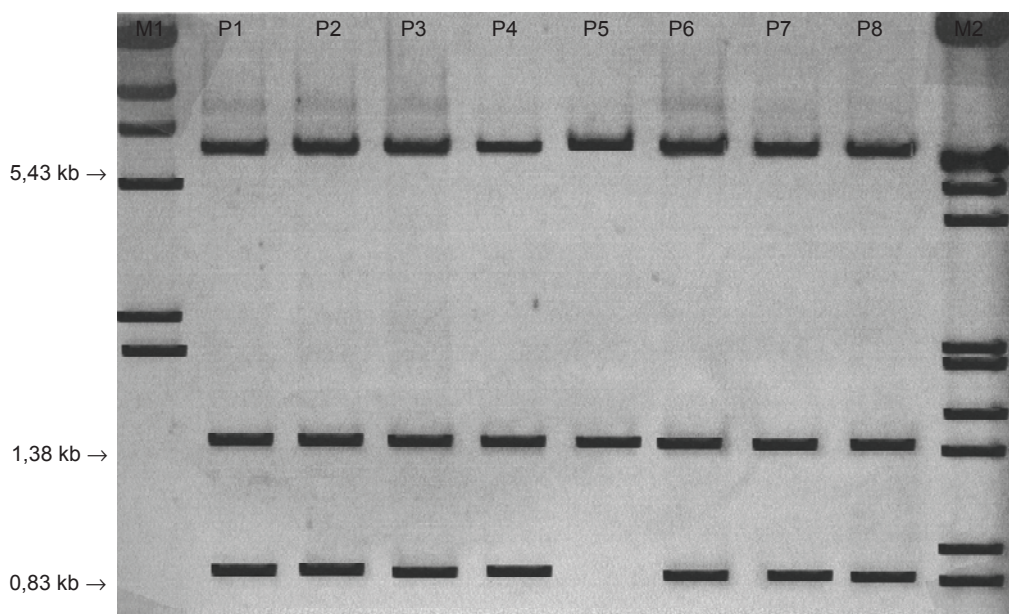


Figura 18. Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pSK-CPL1-2-CPL7-8 com a digestão da enzima *Xba*I. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , F1 = fragmento de 1.385 pb (gene *neo*) do plasmídeo pTC192-km digerido com *Xba*I, P1 = 1  $\mu$ L (diluição 1:2000) e P2 = 5  $\mu$ L (diluição 1:2000), ambos do plasmídeo pSK-CPL1-2-CPL7-8 digeridos com *Xba*I. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.

Ambos, gene *neo* e plasmídeo pSK-CPL1-2-CPL7-8, digeridos com *Xba*I foram ligados. O novo plasmídeo foi denominado pSK-CPL1-2-CPL7-8-*neo* (7,66 kb) e inserido em *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  por transformação por choque térmico. Cresceram vários clones recombinantes e oito destes foram selecionados para as digestões enzimáticas com *Pst*I e *EcoRV* (figura 19).



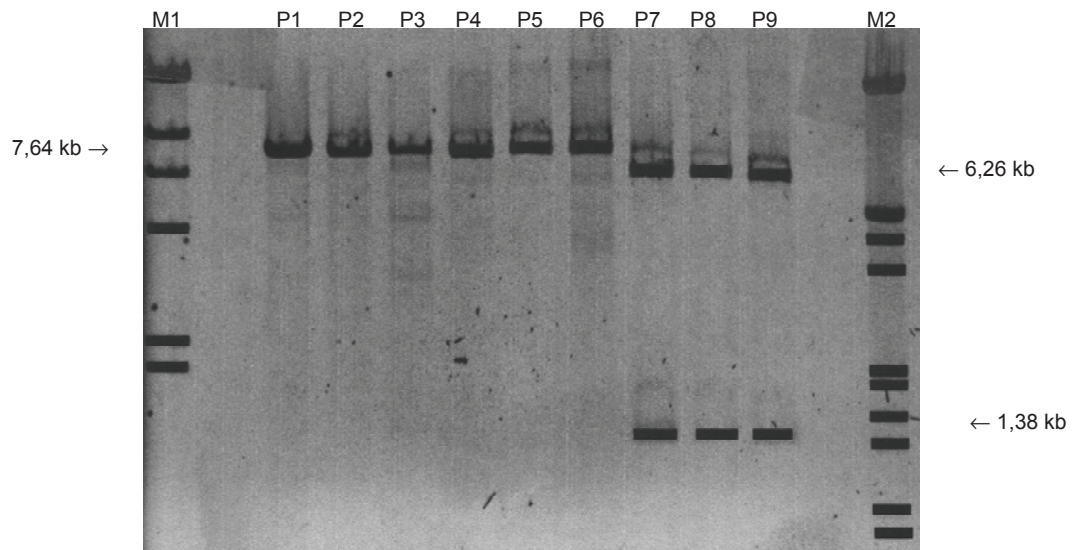


**Figura 19.** Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo com a digestão dupla de *EcoRV/PstI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , P1-P8 = plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo digeridos com *EcoRV/PstI*. As bandas específicas dos fragmentos gênicos estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.

Da digestão dupla dos plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo com *EcoRV/PstI*, liberaram-se três fragmentos distintos de: 0,83; 1,38 e 5,43 kb, e ambos somados representam 7,64 kb do tamanho do plasmídeo construído anteriormente, confirmando os resultados e sua correta construção.

Para outra confirmação, três novas digestões foram feitas para se assegurar a montagem do vetor. O plasmídeo pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo foi digerido com as enzimas; *EcoRV*, *SacI* e *XbaI* (figura 20). A digestão do plasmídeo com a enzima *EcoRV* e com *SacI* linearizaria o plasmídeo, enquanto que com a enzima *XbaI* liberaria o gene *neo* de 1.385 pb, como observado na figura 20.





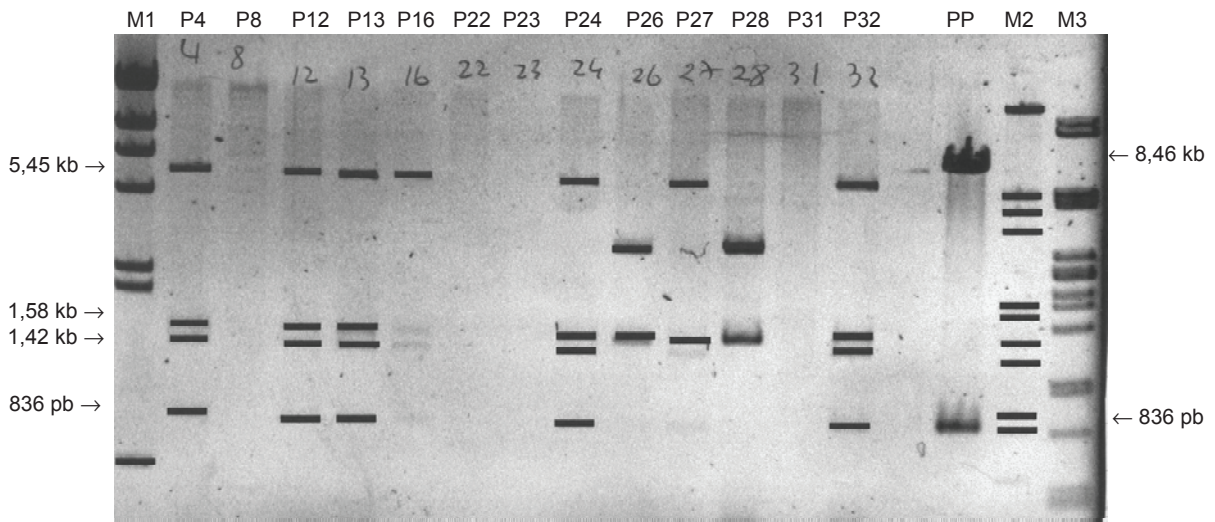
**Figura 20. Análise eletroforética das digestões dos plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do vetor pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo com a digestão das enzimas *EcoRV*, *SacI* e *XbaI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , P1-P3 = plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo digeridos com *EcoRV*, P4-P6 = plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo digeridos com *SacI* e P7-P9 = plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo digeridos com *XbaI*. As bandas específicas dos fragmentos gênicos e do plasmídeo estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.**

Para se obter uma maior quantidade de plasmídeos e para a continuação da construção do vetor final para interrupção do gene *cvm7P*, foi feita uma lise alcalina dos plasmídeos dos clones 3 e 5.

O plasmídeo pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo do clone 5 foi devidamente diluído e digerido com *XhoI*. E logo após, foi tratado com Klenow para o semi-preenchimento com C e T. Paralelamente o plasmídeo pIJ10700 foi digerido com *BamHI* e também foi tratado com Klenow sendo semi-preenchido com A e G. O plasmídeo pIJ10700 possui 4.545 pb e foi utilizado como fonte do gene *hyg*, que confere resistência a higromicina. Este gene foi liberado quando o plasmídeo pIJ10700 foi digerido com *BamHI* e apresenta 1,6 kb de tamanho. O gene *hyg* de pIJ10700, purificado de gel



Após a transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$  com o plasmídeo pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo-hig, 131 clones foram obtidos, todos resistentes a canamicina e a higromicina, quando cultivados em placa com ágar e seus respectivos antibióticos de seleção. Porém, somente 13 destes clones cresceram em meio líquido contendo TB e higromicina. Estes mesmos foram utilizados para extração de seus plasmídeos por mini-preparações e digeridos com a enzima *Pst*I, bem como, o seu plasmídeo parental, pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo (figura 22).



**Figura 22. Análise de restrição dos plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo-hig, em gel de agarose 0,8% mostrando os fragmentos após as digestões com as enzimas *Pst*I. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HindIII}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , M3 = Marcador molecular  $\lambda_{Pst}$ , P4-P32 = plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo-hig digeridos com *Pst*I e PP = plasmídeo parental pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo digeridos com *Pst*I. A esquerda estão as bandas específicas liberadas na digestão dos plasmídeos pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo-hig e a direita, o seu parental pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo. Estas bandas específicas dos fragmentos gênicos estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.**

Os tamanhos dos fragmentos liberados, após a digestão com *Pst*I estão de acordo com o esperado, são eles: 836; 1.429; 1.582 e 5.455 pb. Para exemplificar pode-se analisar o fragmento de 1.582 pb, que corresponde a digestão pela enzima

*Pst*I cortando nos sítios de restrição localizados nas posições 17 e 1.599 do plasmídeo pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo-hig. As análises dos outros fragmentos seguem o mesmo raciocínio, calculando-os quando se observa a figura 22.

E para outra confirmação da construção do vetor pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo-hig, uma nova digestão dos plasmídeos dos clones 4, 13, 24 e 32, foi feita com as enzimas de restrição *Dra*III e *Xba*I (dados não mostrados), liberando os fragmentos esperados e comprovando mais uma vez a correta construção do plasmídeo para disrupção do gene *cvm7P* de *Streptomyces clavuligerus*.

Após estas análises de restrição, o plasmídeo do clone 4 foi utilizado para a transformação de *Escherichia coli* ET12567[PUZ8002]. Dois tipos de placas com ágar foram feitas para se semear os clones recombinantes; uma com LB + cloranfenicol + canamicina + ampicilina e outra com LB + cloranfenicol + canamicina + higromicina. Na placa que continha os antibióticos cloranfenicol, canamicina e higromicina cresceram apenas seis clones, ao passo que, na outra placa cresceram muitos clones. Este fato se deve provavelmente, pelo tipo de recombinação homóloga (simples ou dupla) que houve durante o processo de conjugação. Isto é, quando houve uma recombinação homóloga simples (em apenas um ponto), o clone recombinante tem resistência a ampicilina, canamicina, neomicina e a higromicina. Quando houver uma recombinação homóloga em dois pontos, o clone recombinante apresenta resistência a canamicina e apresenta sensibilidade a higromicina.

Os clones recombinantes de *Streptomyces clavuligerus* (conjugantes) passaram por sucessivas esporulações, em média de cinco a oito, a fim de que, por meio dessas esporulações, os clones que apresentassem sensibilidade a higromicina, perdessem a mesma e adquirissem somente resistência a canamicina.

---

O mutante final foi denominado *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta cvm7P::neo$  e possui fenótipo de resistência a canamicina.

#### **3.14.1.3 Construção do duplo mutante *Streptomyces clavuligerus* $\Delta lat::apr$ $\Delta cvm7P::neo$**

Para produzir o duplo mutante, *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr$   $\Delta cvm7P::neo$ , foi utilizado o processo de conjugação. Como fonte doadora de plasmídeo utilizou-se a linhagem *Escherichia coli* ET12567[PUZ8002]pSK-CPL1-2-CPL7-8-neo-hig e como receptora a linhagem de *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr$  com interrupção do gene *lat*. Desta linhagem mutante, esporos e micélio do clone 11 de *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr$  foram utilizados para a conjugação. Por conjugação produziu-se 24 clones, sendo que oito foram provenientes de esporos e 16 clones provenientes de micélio, ambos da linhagem receptora.

Todos os duplos mutantes apresentaram fenótipo de resistência a canamicina e para testar o outro fenótipo, a resistência a higromicina, a qual o duplo mutante adquiriu; placas contendo meio TSA com higromicina foram preparadas e os duplos mutantes semeados na mesma. Este teste foi positivo, pois os duplos mutantes apresentaram também o fenótipo de resistência a higromicina, confirmando a nova interrupção gênica, a do gene *cvm7P*.

### **3.14.2 Construção dos mutantes por inserção do gene *rpoZ* de *Streptomyces coelicolor* no genoma de *Streptomyces clavuligerus***

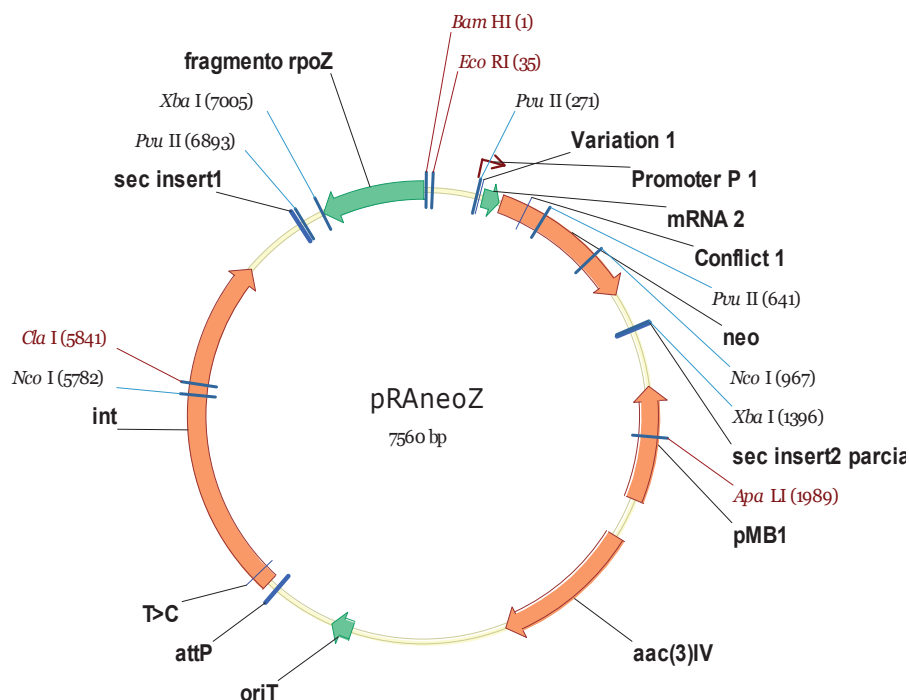
#### **3.14.2.1 Plasmídeo mono-cópia pRAneoZ para a inserção do gene *rpoZ* de *Streptomyces coelicolor* no genoma de *Streptomyces clavuligerus***

O plasmídeo pRAneoZ (figura 23) foi construído e cedido pela Dra. Mónica Barriuso Iglesias da Universidade de León – Espanha. Este plasmídeo é constituído de: uma cópia do gene *rpoZ* de *Streptomyces coelicolor*, oriT (origem de replicação), gene *aac(3)IV* (resistência a apramicina) e o gene *neo* (resistência a neomicina e canamicina) e o mesmo apresenta 7.560 pb de tamanho.

O gene *rpoZ* é uma subunidade ômega de RNA polimerase, que está envolvido no início da esporulação em *Streptomyces aureofaciens*. E em *Streptomyces kasugaensis* está relacionado com a produção de antibióticos e com o seu processo de diferenciação morfológica.

A construção deste mutante, que tem uma cópia do gene *rpoZ* de *S. coelicolor* tem como objetivo principal investigar a possível implicação do gene *rpoZ* no metabolismo secundário de *S. clavuligerus*.

Este plasmídeo foi construído clonando-se um fragmento de PCR (BamHI-XbaI) de 550 nucleotídeos com 273 nucleotídeos do gene *rpoZ* de *S. coelicolor*, precedidos por 225 nucleotídeos a montante e 35-50 nucleotídeos a jusante do referido gene. O gene *neo* foi clonado na extremidade BamHI do produto de PCR, porém não foi possível saber se o gene *neo* (1,38 kb) está realmente na orientação representada no esquema do plasmídeo.



**Figura 23.** Mapa esquemático do vetor pRAneoZ para inserção de uma cópia do gene *rpoZ* de *Streptomyces coelicolor* em *Streptomyces clavuligerus*.

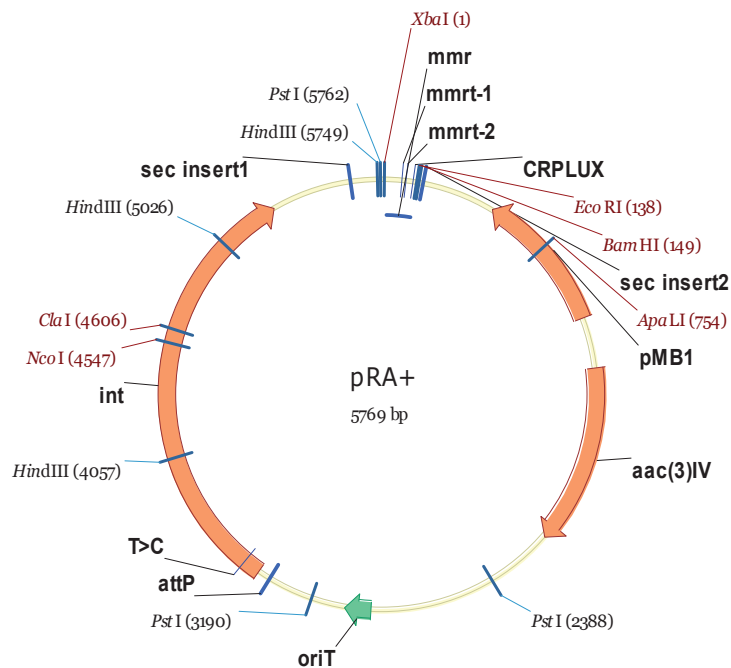
O plasmídeo que deu origem ao pRAneoZ foi o vetor pRA (RODRÍGUEZ-GARCIA *et al.* 2000) de 5.769 pb, por ser transferível por conjugação, integrativo e portanto, mono-cópia. Este mesmo (pRA) não contém o gene *neo* e o gene *rpoZ* de *S. coelicolor* e foi utilizado também nas fermentações como controle para os estudos dos efeitos destas mutações sobre a produção de ácido clavulânico em *Streptomyces clavuligerus*.

O plasmídeo pRA (figura 24) é derivado do vetor integrativo pSET152 (COMBES *et al.* 2002), e contém uma enzima integrase do vírus  $\phi$ C31, a qual é responsável pela integração do plasmídeo no genoma do hospedeiro, no caso, no genoma de *Streptomyces clavuligerus*.

O plasmídeo pRA (7.560 pb de tamanho), bem como o pRAneoZ foram cedidos pela Dra. Mónica Barriuso Iglesias da Universidade de León – Espanha. O



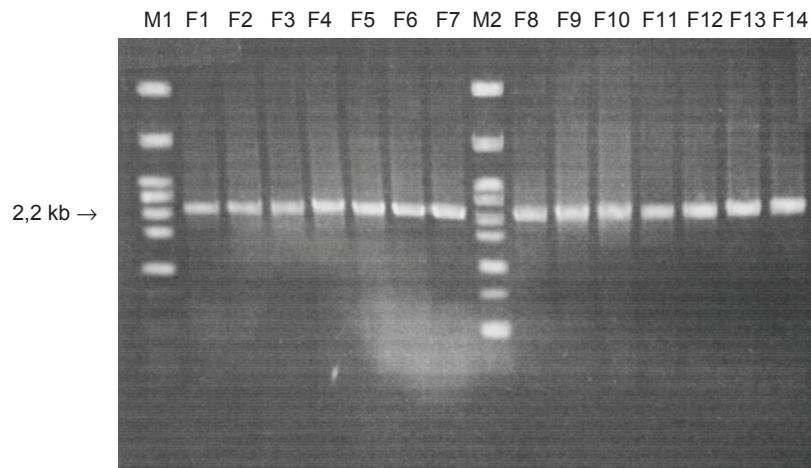
plasmídeo pRAneoZ é constituído de: uma cópia do gene *rpoZ* de *Streptomyces coelicolor*, oriT (origem de replicação), gene *aac(3)IV* (resistência a apramicina), o gene *neo* (resistência a neomicina e canamicina) e o sítio de integração attP (na posição 4624-4662).



**Figura 24. Mapa esquemático do vetor pRA+. Este plasmídeo serve de base para a construção do vetor pRAneoZ.**

O plasmídeo pRAneoZ foi construído clonando-se um fragmento de PCR (*BamHI-XbaI*) de 550 nucleotídeos com 273 nucleotídeos do gene *rpoZ* de *S. coelicolor*, precedidos por 225 nucleotídeos a montante e 35-50 nucleotídeos a jusante do referido gene. O gene *neo* foi clonado na extremidade *BamHI* do produto de PCR, porém não foi possível saber se o gene *neo* (1,38 kb) está realmente na orientação representada no esquema do plasmídeo. E para se confirmar as orientações de alguns genes, o par de iniciadores denominados *secRA1* e *secRA2* foi desenhado para se amplificar um fragmento de 2,2 kb do plasmídeo recombinante pRAneoZ (figura 25).

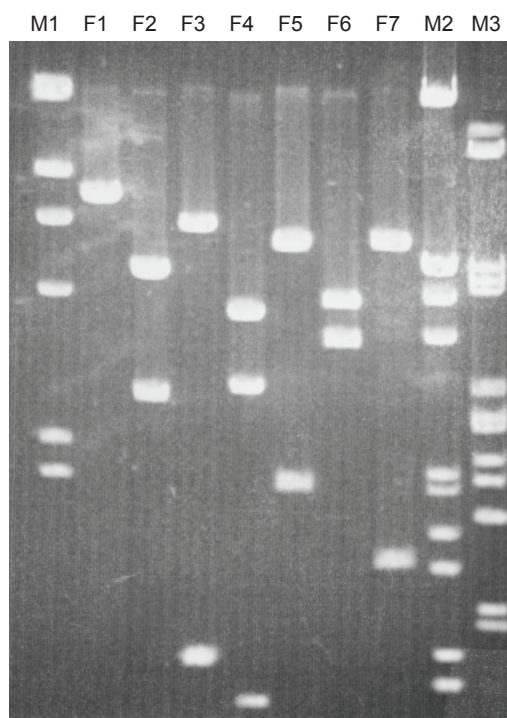




**Figura 25. Análise eletroforética das reações do produto de PCR utilizando DNA genômico dos mutantes de *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ. Gel de agarose 0,8% mostrando os produtos de PCR. M1 e M2 = Marcador molecular  $\lambda_{pst}$ , F1-F14 = fragmento de 2,2 kb amplificado por PCR utilizando o DNA genômico dos mutantes *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ. As bandas específicas dos produtos de PCR estão representadas pela seta e seu respectivo tamanho.**

O par de iniciadores que foi desenhado, efetivamente amplificou o fragmento de 2.200 pb do gene *SCO1478* de *S. coelicolor* e o gene *neo*. O produto protéico de *SCO1478* é uma proteína pequena de 90 aminoácidos, uma subunidade omega ( $\omega$ ) de RNA polimerase de *S. coelicolor*, denominada *RpoZ*, correspondendo apenas a 270 nucleotídeos, o restante de 1.930 pb corresponde a amplificação do gene *neo* e alguns nucleotídeos a jusante do mesmo.

O vetor foi inserido em *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico e produziram-se muitos clones recombinantes. E sucessivamente transformou-se a linhagem de *E. coli* ET12567[PUZ8002]. Seus plasmídeos, pRAneoZ, foram extraídos para serem digeridos e verificar sua correta construção, utilizando-se as seguintes enzimas: *Bam*HI, *Nco*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Xba*I, *Xho*I, e *Bam*HI/*Xba*I (digestão dupla). Esses resultados são apresentados na figura 26.



**Figura 26.** Análise eletroforética das digestões do DNA genômico dos mutantes de *Streptomyces clavuligerus pRAneoZ*. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do DNA genômico dos mutantes com as digestões das seguintes enzimas: *BamHI*, *EcoRV*, *NcoI*, *XbaI* e *BamHI/XbaI*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{HindIII}}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{HE}}$ , M3 = Marcador molecular  $\lambda_{\text{pst}}$ , F1-F7 = fragmento/plasmídeo linearizado, digeridos com as enzimas de restrição; *BamHI*, *NcoI*, *PvuII*, *SacI*, *XbaI*, *XhoI*, e *BamHI/XbaI*, respectivamente.

Para não sobrecarregar a figura 26 os tamanhos dos fragmentos liberados de DNA não foram mostrados, mas de uma maneira geral, pode-se afirmar que: (1) a coluna F1 corresponde ao plasmídeo pRAneoZ linearizado com a digestão de *BamHI*; (2) a coluna F2 corresponde ao plasmídeo digerido com *NcoI* liberando dois fragmentos, um de 2.745 e o outro de 4.815 pb; (3) a coluna F3 corresponde ao plasmídeo digerido com *PvuII* liberando três fragmentos, um de 6.252, 938 e outro fragmento de 370 pb que não aparece no gel, devido ao seu pequeno tamanho; (4) a coluna F4 corresponde a digestão do plasmídeo com *SacI* liberando dois fragmentos, um de 751 e outro de 6.809 pb; (5) a coluna F5 corresponde a digestão

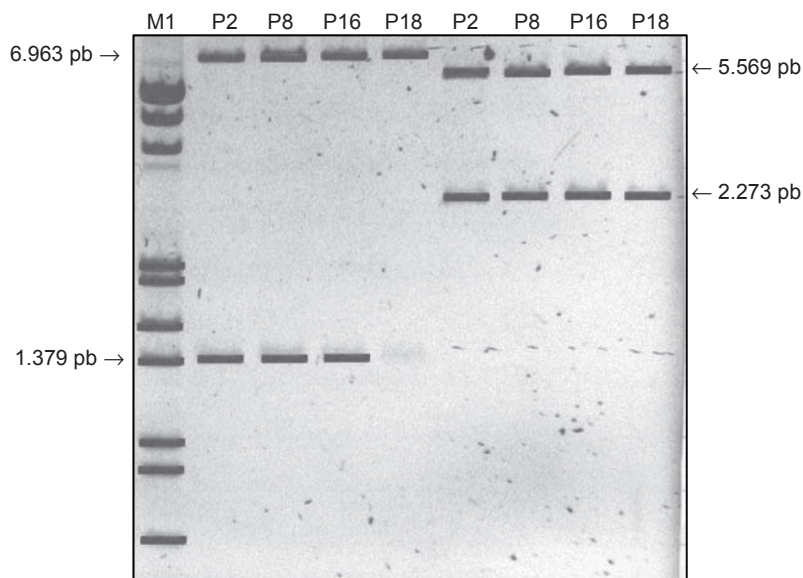
com *XbaI* liberando um fragmento de 1.951 e 5.609 pb; (6) a coluna F6 corresponde a digestão do plasmídeo com *XhoI* liberando um fragmento de 1.650 e outro de 5.910 pb; (7) a coluna F7 corresponde a digestão dupla do plasmídeo com *BamHI/XbaI* liberando três fragmentos de 556, 1.395 e 5.609 pb. O fragmento de DNA de 556 pb da coluna C7 não pode ser visto, devido ao seu pequeno tamanho. A digestão com a enzima *SacI* pelo desenho do plasmídeo (figura 28) teria apenas dois fragmentos liberados, mas na revelação do gel de agarose, apresentou três fragmentos gênicos de aproximadamente; 2.800, 800 pb e um outro fragmento entre 3.530 e 4.268 pb. O fragmento de 800 pb poderia ser aquele do desenho do plasmídeo (751 pb) e com isto, parece então, que há um outro sítio de restrição de *SacI* no plasmídeo pRAneoZ. Porém a soma destes três fragmentos apresenta aproximadamente 7.560 pb, o que equivale o tamanho do vetor pRAneoZ.

#### **3.14.2.2 Plasmídeo pAMB4 utilizado como controle do plasmídeo multi-cópia do gene *rpoZ* de *S. coelicolor***

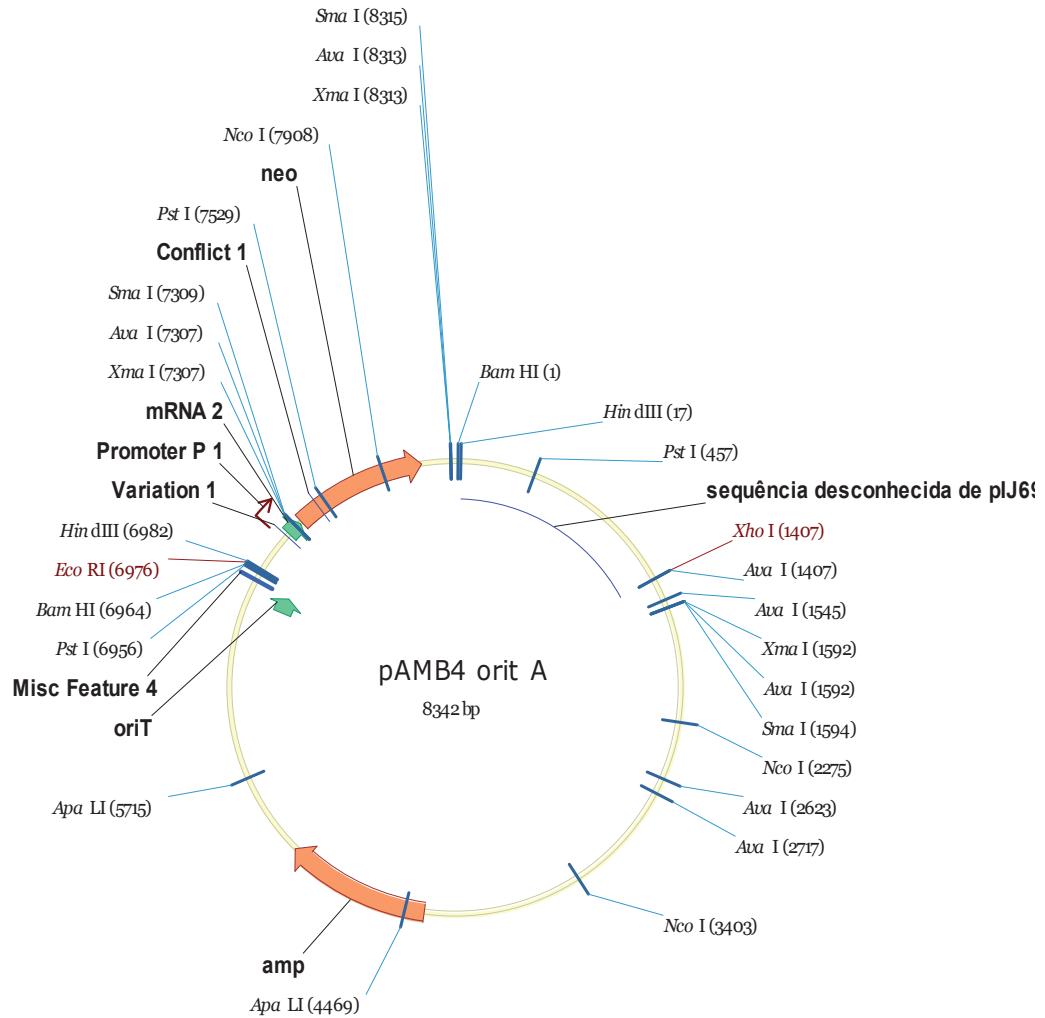
O vetor pAMB3 foi o plasmídeo base para a construção do plasmídeo pAMB4. O plasmídeo pAMB3 possui 6963 pb de tamanho e possui resistência a ampicilina. Sua construção seguiu os seguintes passos: (1) o plasmídeo pAMB3 foi digerido com a enzima *BamHI*, linearizando-o; (2) o plasmídeo pTC192-km foi digerido também com a mesma enzima para liberar o gene *aphII*, que possui resistência a canamicina; (3) ligação do gene *aphII* com o plasmídeo pAMB3, ambos com extremidades *BamHI* e denominados pAMB3-aphII ou, simplesmente pAMB4; (4) transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico; (4) confirmação da construção por análise de restrição; e (5) transformação de *E. coli* ET12567[PUZ8002] por conjugação.

Quando *E. coli* DH5 $\alpha$  foi transformada com o plasmídeo pAMB4 por choque térmico cresceram muitos clones recombinantes, dos quais foram extraídos seus plasmídeos por mini-preparações e digeridos com *Bam*HI e *Eco*RI/*Xho*I (digestão dupla) para confirmar sua correta construção (figura 27).

Na digestão com *Bam*HI liberou-se dois fragmentos: um de 1.379 e outro de 6.963 pb e na digestão com as enzimas *Eco*RI/*Xho*I liberou-se outros dois fragmentos, de 2.773 e 5.569 pares de bases. Em ambas as análises de restrição a soma dos fragmentos perfazem um total de 8.342 pb, o qual encaixa com o tamanho esperado do plasmídeo pAMB4 (figura 28), confirmando sua correta construção. Este plasmídeo contém o cassete de resistência a ampicilina e canamicina.



**Figura 27. Análise eletroforética das digestões do plasmídeo pAMB4. Gel de agarose 0,8% mostrando a análise de restrição do plasmídeo dos mutantes com as digestões das seguintes enzimas: *Bam*HI e *Eco*RI/*Xho*I. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , P2-P18 = fragmentos liberados quando digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI (a esquerda no gel) e P2-P18 = fragmentos liberados na digestão dupla com as enzimas de restrição *Eco*RI/*Xho*I (a direita no gel). As bandas específicas dos fragmentos gênicos estão representadas pelas setas e seus respectivos tamanhos.**



**Figura 28. Mapa esquemático do plasmídeo pAMB4, com a origem de replicação oriT, e cassete de resistência a ampicilina e a canamicina.**

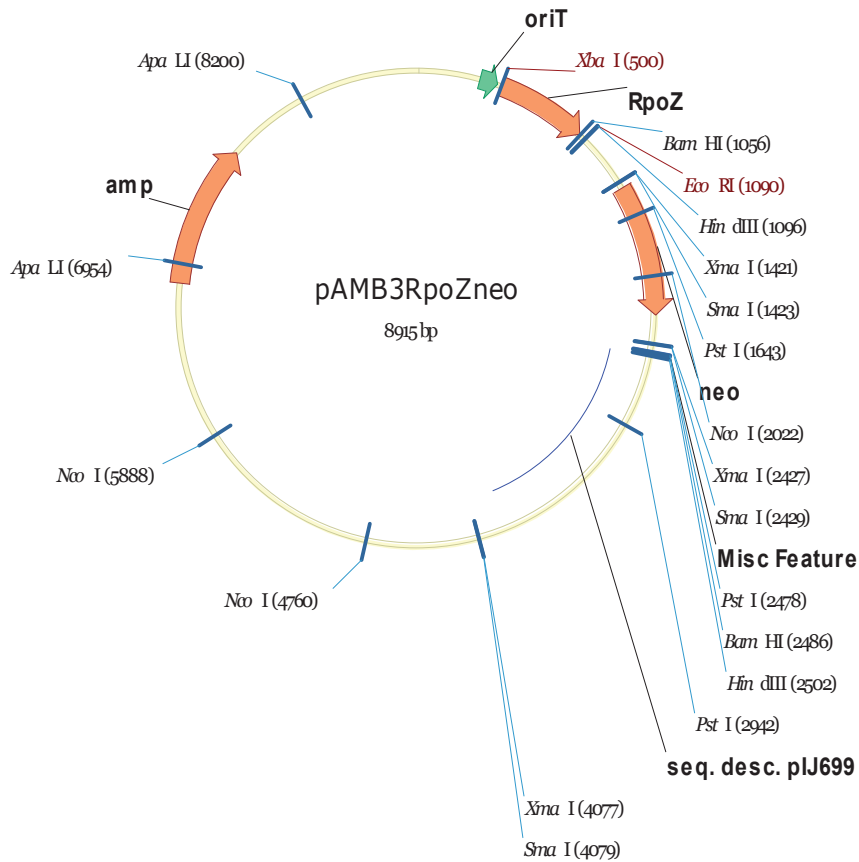
O plasmídeo do clone 8 foi utilizado para a transformação de *E. coli* ET12567[PUZ8002] e muitos clones cresceram em placas com ágar, LB, cloranfenicol, canamicina e ampicilina.

O plasmídeo pAMB4 foi inserido em esporos de *S. clavuligerus* por conjugação. O plasmídeo pAMB4 é um vetor bi-funcional *E. coli* - *Streptomyces clavuligerus*, multi-cópia, com replicação autônoma e com marcadores de resistência a ampicilina e a canamicina, sem o gene *rpoZ* de *S. coelicolor*.

### **3.14.2.3 Plasmídeo pAMB3rpoZneo multi-cópia do gene *rpoZ* de *S. coelicolor***

O plasmídeo pAMB3rpoZneo é um vetor multi-cópia, bi-funcional *Escherichia coli* – *Streptomyces* de replicação autônoma com marcadores de resistência a ampicilina e a canamicina com o gene *rpoZ* de *Streptomyces coelicolor*. A base para a construção deste plasmídeo foi o plasmídeo pAMB2, o qual foi digerido com a enzima de restrição *SacI* para perder o gene *acc3(IV)*. Este novo plasmídeo denominado pAMB3 sem o gene de resistência a apramicina foi religado e possui 6.963 pb.

O plasmídeo pRAneoZ foi digerido com *XbaI* liberando 1,9 kb, o qual contém o gene *rpoZ* de *S. coelicolor* e o gene *neo*, e foi ligado ao vetor pAMB3. O novo plasmídeo foi denominado pAMB3RpoZneo e possui 8.915 pb (figura 29).



**Figura 29.** Mapa esquemático do plasmídeo pAMB3RpoZneo, com a origem de replicação oriT, cassete de resistência a ampicilina e a canamicina e o gene *RpoZ* de *Streptomyces coelicolor*.

Todas as etapas da construção deste vetor foram confirmadas por análises de restrição (dados não mostrados) e pelo sistema de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%.

### 3.15 Softwares utilizados e análise estatística

Os gráficos com os dados analisados apresentados nas figuras foram feitos no programa *Origin* 6.0. As figuras dos plasmídeos foram feitas no programa *Vector NTI* 10 e as análises estatísticas, no programa *Origin* 7.0.

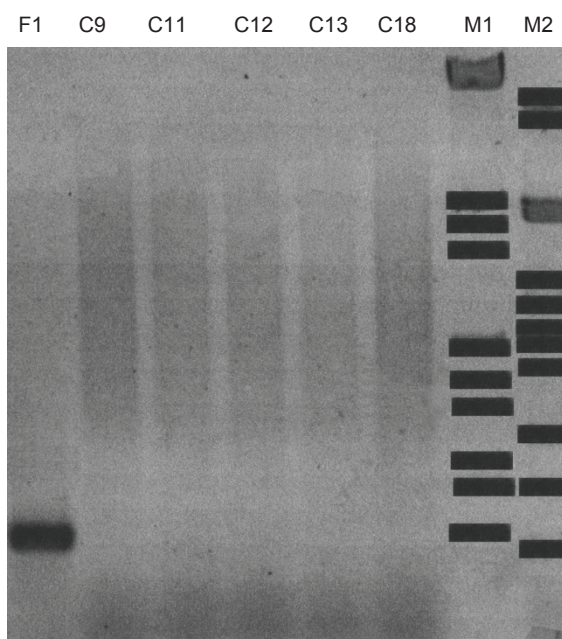
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Inativação da rota biossintética da cefamicina C pela disrupção do gene *lat*

Cefamicina C é um composto  $\beta$ -lactâmico, produzido por *Streptomyces clavuligerus*, que age na biossíntese da parede celular, inibindo as reações de transpeptização e impedindo a formação das ligações entre os tetrapeptídeos, ocasionando a perda da rigidez da parede celular.

O DNA genômico de cinco mutantes *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr$  foi extraído para confirmar se o gene *lat* havia sido realmente sofrido a disrupção (figura 30).



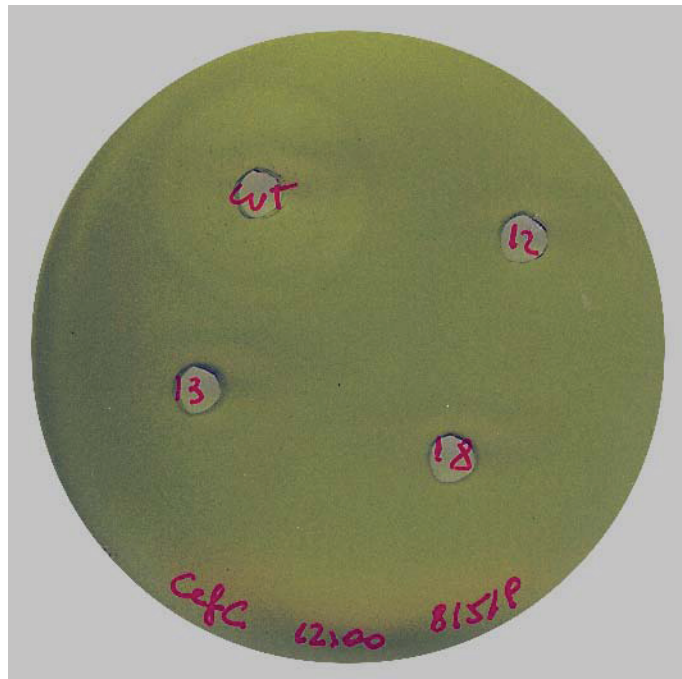


**Figura 30.** Análise eletroforética da amplificação dos produtos de PCR utilizando o par de iniciadores LAT-AK-F e LAT-AK-R, desenhados para amplificar um fragmento de 547 pb de gene *lat*. M1 = Marcador molecular  $\lambda_{HE}$ , M2 = Marcador molecular  $\lambda_{pst}$ , F1 = fragmento de 547 pb do gene *lat* da linhagem selvagem de *S. clavuligerus*, C9-C18 = colunas no gel de agarose com DNA molde dos respectivos clones mutantes de *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr$ .

Como pode ser visto na figura 30 (coluna F1), apenas o DNA genômico utilizado como molde na reação de PCR com o par de iniciadores desenhados para amplificar o gene *lat* de *S. clavuligerus* da linhagem selvagem foi amplificado. Não houve amplificação por PCR quando foi utilizado o DNA genômico dos mutantes *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr$ , comprovando mais uma vez a disrupção do gene *lat*.

*Streptomyces clavuligerus* produz cefamicina C em vários meios de cultivo, e neste trabalho o meio TSB/Agar foi escolhido para este bioensaio. Cefamicina C é usualmente quantificada pelo ensaio microbiológico utilizando uma linhagem super sensível a compostos  $\beta$ -lactâmicos de cefalosporinas, chamada de *Escherichia coli*

Ess22-35. O bioensaio proposto por Romero et al., (1984) mede todos os antibióticos presentes na amostra, como por exemplo: cefamicina C, deacetoxicefalosporina C, e deacetylcefalosporina, porém estes dois últimos estão presentes em pequenas quantias no caldo de fermentação.



**Figura 31. Bioensaio mostrando a produção de cefamicina C pela linhagem selvagem (wt). Note que os mutantes (números 12, 13 e 18) *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta$ lat::apr, não produzem Cef C.**

Cefamicina C é um composto  $\beta$ -lactâmico e de maneira similar às penicilinas e as cefalosporinas, que atua na biossíntese da parede celular inibindo a enzima envolvida na transpeptização, responsável pela ligação entre as cadeias de tetrapeptídeos do peptideoglicano, ocasionando uma perda na rigidez da parede celular. No entanto, cefamicina C em frente à penicilina G ou Cefalosporina C, só é produzido por bactérias. *Streptomyces clavuligerus* produz cefamicina C em vários meios de cultivo, entre eles o TSB. Cefamicina C é quantificada por um teste

---

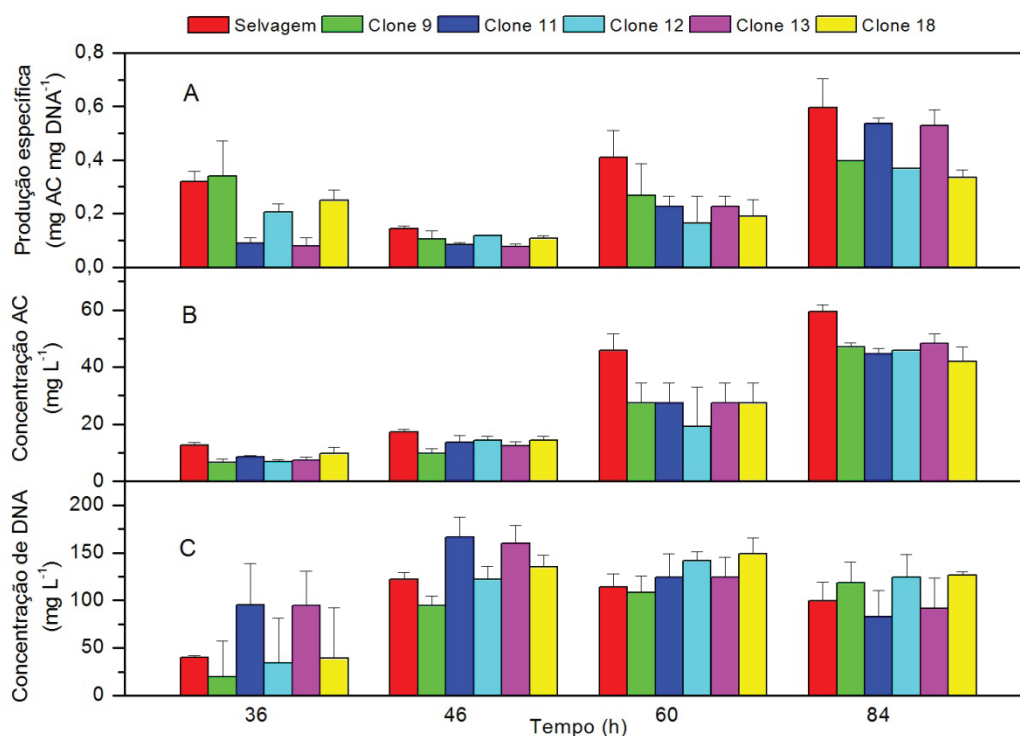
microbiológico utilizando uma linhagem supersensível à antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, chamada *Escherichia coli* Ess22-35.

O bioensaio consiste em adicionar uma alíquota (60  $\mu$ L) do caldo fermentativo na placa contendo meio LB/agar e a linhagem de *Escherichia coli* Ess22-35 e quando cefamicina C está presente no caldo de fermentação um halo de inibição é formado, constatando sua presença. Neste trabalho o bioensaio (figura 31) acima descrito foi utilizado para mais uma comprovação da disrupção do gene *lat* de *Streptomyces clavuligerus*, do mutante denominado  $\Delta$ lat::apr. Como pode ser visto na figura 31, os mutantes *S. clavuligerus*  $\Delta$ lat::apr produzidos por disrupção gênica não produzem cefamicina C, mas produzem ácido clavulânico detectado por HPLC, segundo o método de Foulstone e Reading (1982).

#### **4.2 Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* $\Delta$ lat::apr e *Streptomyces clavuligerus* $\Delta$ lat::apr $\Delta$ cvm7P::neo**

##### **4.2.1 Produção de ácido clavulânico em meio SA por *Streptomyces clavuligerus* $\Delta$ lat::apr e *Streptomyces clavuligerus* $\Delta$ lat::apr $\Delta$ cvm7P::neo**

Primeiramente dosou-se a produção de ácido clavulânico em meio SA, a base de amido e L-asparagina. A linhagem selvagem e cinco clones mutantes *S. clavuligerus*  $\Delta$ lat::apr foram comparados quanto à produção de ácido clavulânico (figura 32).



**Figura 32. Produção de ácido clavulânico em meio SA da linhagem selvagem e mutantes *S. clavuligerus*  $\Delta lat::apr$ . (A) produção específica, (B) concentração de ácido clavulânico e (C) concentração de DNA.**

Embora os resultados pareçam apontar para uma maior produção de AC (figura 32) pela linhagem selvagem, a análise de variância (ANOVA) mostrou que não há diferença estatística significativa, ao nível de 5% de significância, entre os dados, quando comparados entre a linhagem selvagem e os mutantes *S. clavuligerus*  $\Delta lat::apr$ . Comparando-se a concentração de DNA e a produção específica, também não há diferença estatística significativa ao mesmo nível de significância.

Paradkar e colaboradores (2001) também utilizaram a tecnologia do DNA recombinante para desenvolver uma linhagem mutante por interrupção do gene *lat* em *Streptomyces clavuligerus*. A produção de AC destes mutantes foi duas a duas vezes e meio maior em relação à linhagem selvagem. Os seus resultados foram

apresentados de uma forma não convencional, os dados foram expressos em concentração de AC (mg/L) pela densidade óptica a 600 nm do cultivo analisado. Para efeito de comparação, e supondo-se OD = 10, a máxima concentração de ácido clavulânico para os mutantes foi 118,0 mg/L em meio de cultivo SA, valores estes superiores encontrados neste trabalho.

Zhihan e Yanping (2006) na Coréia também mutaram *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585 por disrupção no gene *lat* e seus títulos máximos de ácido clavulânico foram 269,8 mg/L em cultivo de seu mutante. Este valor foi o dobro da concentração encontrada na linhagem selvagem. Nos dois casos, quando se compara a produção de ácido clavulânico entre a linhagem selvagem e o mutante não produtor de cefamicina C, parece haver uma correlação direta do efeito da mutação do gene *lat* na produção de ácido clavulânico, ou seja, o mutante produz quase sempre o dobro de ácido clavulânico.

Os resultados encontrados neste trabalho estão em desacordo com as pesquisas realizadas por Paradkar e colaboradores (2001) e Zhihan e Yanping (2006). O mutante *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr$  não produtor de cefamicina C não apresentou nenhuma mudança na produção de ácido clavulânico quando comparado com a linhagem selvagem.

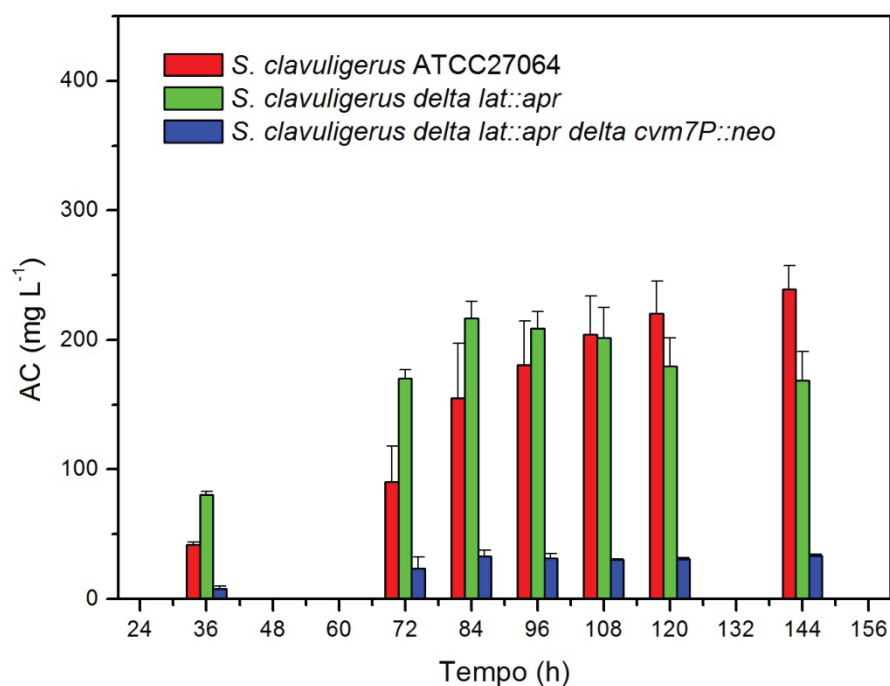
#### **4.2.2 Produção de ácido clavulânico em meio a base de óleo vegetal por *Streptomyces clavuligerus* $\Delta lat::apr$ e *Streptomyces clavuligerus* $\Delta lat::apr \Delta cvm7P::neo$**

Lipídios são considerados componentes essenciais do meio de cultivo na indústria de antibióticos porque possuem propriedades naturais como

antiespumantes, por apresentarem-se como uma fonte de carbono e, segundo Large et al., (1999), também podem aumentar a produção de metabólitos secundários.

O meio de cultivo a base de óleo e farinha de soja, estabelecido por Maranesi (2005) é rotineiramente utilizado no laboratório de bioquímica do PPGEQ-UFCar. E quando utilizado em processos fermentativos com *Streptomyces clavuligerus* apresenta altos títulos de ácido clavulânico.

O meio de cultivo a base de óleo e farinha de soja (MARANESI, 2005) foi utilizado para as fermentações neste trabalho e os resultados estão apresentados na figura 33.



**Figura 33.** Produção de ácido clavulânico em meio a base de óleo vegetal e farinha de soja da linhagem selvagem e mutante *S. clavuligerus*  $\Delta$ lat::apr e *S. clavuligerus*  $\Delta$ lat::apr  $\Delta$ cvm7P::neo.

O tempo total das fermentações foi de 144 horas, e nos tempos 84 e 96 horas, o mutante *S. clavuligerus*  $\Delta$ lat::apr produziu mais AC que a linhagem selvagem. Porém, ao nível de 5% de significância a análise de variância mostrou

---

não haver diferença estatística significativa nos resultados. Estes resultados estão em oposição aos encontrados por Paradkar et al., (2001), e por Zhihan e Yanping (2006), onde se aponta que, a inativação completa da rota biossintética da cefamicina C, implicaria em uma maior produção de AC pelo mutante com disrupção no gene *lat*.

O duplo mutante, *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr$   $\Delta cvm7P::neo$ , que sofreu duas disrupções gênicas, dos genes *lat* e *cvm7P*, é deficiente da produção de cefamicina C e das clavamas 5S, pois suas rotas biossintéticas foram completamente eliminadas. O intuito de produzir este mutante foi ampliar a produção de ácido clavulânico pela eliminação de vias bioquímicas, porém, contrariamente o esperado, se observou a menor produção de ácido clavulânico neste mutante.

Paradkar et al., (2001), ainda delecionaram o gene *cvm1* da rota biossintética das clavamas 5S, e junto com o outro mutante com a disrupção no gene *lat* produziram o duplo mutante delecionado nas rotas da cefamicina C e das clavamas 5S. Este duplo mutante aumentou apenas em torno de 10% a produção de ácido clavulânico em relação à linhagem selvagem.

Um passo importante na produção do duplo mutante foi a construção do mutante *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta cvm7P::neo$ , incapaz de produzir as clavamas 5S. O cultivo deste mutante não foi estabelecido no laboratório de bioquímica do PPGEQ-UFSCar e conseqüentemente não foi possível avaliar o padrão de fermentações deste mutante. Como este mutante representa uma etapa intermediária na construção do duplo mutante, a produção de ácido clavulânico desta linhagem é uma incógnita, e seus resultados talvez pudessem esclarecer melhor a baixa produção de ácido clavulânico do duplo mutante.

Neste trabalho, o mutante não produtor de cefamicina C mostrou nenhuma variação na produção de ácido clavulânico, neste caso a eliminação da via bioquímica da cefamicina C não trouxe efeitos benéficos na produtividade de ácido clavulânico. Por outro lado, o duplo mutante diminuiu drasticamente o título de AC, quando comparado com a linhagem selvagem. A base para este fenômeno de produtividade é difícil de analisar, desde que a natureza da mutação não é determinada. Respostas para estas questões podem depender do tipo de interação que existe entre as rotas biossintéticas da cefamicina C e do ácido clavulânico (ZHIHAN e YANPING, 2006).

#### **4.2.3 Atividade lipolítica por *Streptomyces clavuligerus* $\Delta lat::apr$ e por *Streptomyces clavuligerus* $\Delta lat::apr \Delta cvm7P::neo$**

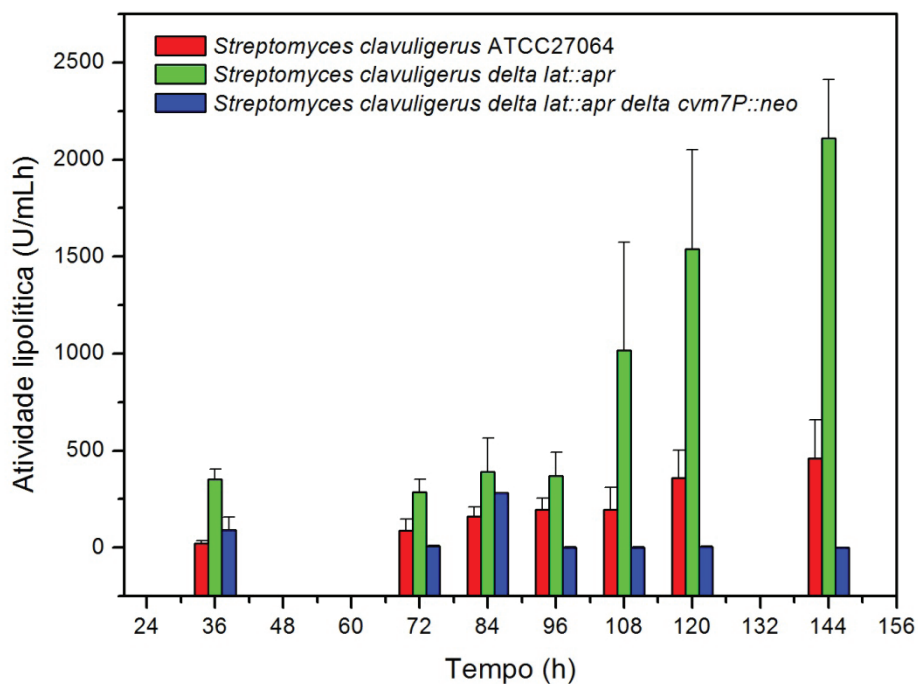
Para que um lipídio seja utilizado como fonte de energia e carbono, é preciso que ocorra a hidrólise do triacilglicerol pela ação de lipases. Lipases frequentemente são enzimas induzíveis e indutores como óleos são necessários para a produção de lipases (MAIA et al., 2001).

Quando ocorre a lipólise, o glicerol liberado na hidrólise enzimática (pela ação de lipases) é fosforilado e oxidado à dihidroxiacetona fosfato, que então é isomerizado à gliceraldeído-3-fosfato. Este é um intermediário das vias glicolíticas e glicogênica. Então o glicerol pode ser convertido em glicose ou piruvato, por outras reações enzimáticas. O processo inverso também pode ocorrer, glicerol e intermediários glicolíticos são prontamente interconvertidos (VOET et al., 2000).

Neste trabalho, para um entendimento melhor da utilização do óleo vegetal, meio de cultivo estabelecido por Maranesi (2005), como fonte de carbono pela



linhagem bacteriana, foi dosado a atividade lipolítica no sobrenadante das fermentações das linhagens selvagem e dos mutantes. Os resultados são mostrados na figura 34.



**Figura 34.** Atividade lipolítica do sobrenadante dos cultivos de *Streptomyces clavuligerus* selvagem e dos mutantes, *Streptomyces clavuligerus* Δlat::apr e *Streptomyces clavuligerus* Δlat::apr Δcvm7P::neo.

Duas análises estáticas foram realizadas para verificar a significância dos dados. A primeira análise de variância (ANOVA) feita com os dados de todas as linhagens não mostrou diferença estatística significativa entre a linhagem selvagem e *Streptomyces clavuligerus* Δlat::apr Δcvm7P::neo (duplo mutante). Já na segunda análise de variância, feita somente entre a linhagem selvagem e o duplo mutante, claramente mostrou diferença estatística significativa entre as linhagens em questão. Vários testes de significância foram realizados após a ANOVA, foram eles: teste

exato de *Fisher*, *Scheffé*, *Tukey*, *Newman-Keuls* e *Duncan*. Todos estes testes, em nível de significância de 5% demonstraram que houve diferença estatística significativa entre os dados da linhagem selvagem e do duplo mutante.

Claramente se observa um padrão de respostas que relaciona a produção de ácido clavulânico e a atividade lipolítica. Neste bloco de mutantes, por disrupção gênica nota-se que a atividade de lipase é maior onde a produção de AC também é mais alta. Somente nos tempos de 108, 120 e 144 h de cultivo, a atividade lipolítica do mutante *S. clavuligerus*  $\Delta lat::apr$  foi maior que a atividade da linhagem selvagem. Nestes mesmos tempos a atividade lipolítica se elevou significativamente, provavelmente pela exaustão do glicerol. Porém, o comportamento do duplo mutante sempre foi o mesmo; ou seja, a produção de ácido clavulânico e a atividade lipolítica foram sempre diretamente proporcionais.

Esta relação é óbvia e parece estar bem claro nos resultados deste estudo que: (1) o óleo de soja presente no meio de cultivo parece agir sob efeito indutivo na produção da lipase extracelular; (2) o microrganismo pode utilizar também como fonte de carbono, os produtos da lipólise do triglicerídeo, aumentando assim a produção de ácido clavulânico; (3) conseqüentemente, de uma maneira geral pode-se dizer que: quanto maior a atividade lipolítica, maior a produção de AC; e (4) parece haver uma relação entre as rotas biossintéticas do AC e da indução de lipase.

De uma maneira geral a produção de lipase por todas as linhagens de *Streptomyces clavuligerus* neste trabalho é muito superior a encontrada por outros autores. Esses dados podem ser visualizados por meio da análise da tabela 5.

**Tabela 5.** Atividade lipolítica encontrada em vários microrganismos

Microrganismo	Atividade lipolítica (U/L)	Referência
<i>Geobacillus</i> sp.	350,0	ABDEL-FATTAH, 2002.
<i>Burkholderia multivorans</i>	49.000,0	GUPTA, et al., 2007
<i>Antrodia cinnamomea</i>	25.000,0	CHIN-HANG, et al., 2006
<i>Metarhizium anisopliae</i>	4.970,0	SILVA, et al., 2005
<i>Aspergillus niger</i>	41.000,00	MAHADIK, et al., 2004
<i>Aspergillus niger</i>	4.230,0	ELLAIAH, et al., 2004
<i>Thermus thermophilus</i>	120,0	DOMINGUEZ, et al., 2005
<i>Pichia pastoris</i> KM71 (recombinante)	15.300,0	JIANG, et al., 2006
<i>Rhizopus chinensis</i>	13.875,0	TENG e XU, 2008
<i>Stretomyces clavuligerus</i> (selvagem)	13.657,43	Este trabalho, 2010
<i>Stretomyces clavuligerus</i> RA	10.594,95	Este trabalho, 2010
<i>Stretomyces clavuligerus</i> <i>pRAneoZ</i>	24.595,79	Este trabalho, 2010
<i>Stretomyces clavuligerus</i>	45.310,61	Este trabalho, 2010

*pAMB4*

<i>Streptomyces</i>	<i>clavuligerus</i>	22.345,48	Este trabalho, 2010
---------------------	---------------------	-----------	---------------------

*pAMB3RpoZneo*

<i>Streptomyces</i>	<i>clavuligerus</i>	14.439,03	Este trabalho, 2010
---------------------	---------------------	-----------	---------------------

*Δlat::apr*

<i>Streptomyces</i>	<i>clavuligerus</i>		Este trabalho, 2010
		301,83	

*Δlat::apr Δcvm7P::neo*


---

Observação: a atividade lipolítica encontrada no sobrenadante dos cultivos da linhagem selvagem e dos mutantes, neste trabalho, são valores médios.

Relevante ressaltar que quando Gupta e colaboradores (2007) estudaram a lipase produzida por *Burkholderia multivorans*, foi em processo fermentativo em biorreator em uma condição otimizada.

Os valores da atividade lipolítica das linhagens deste trabalho estão entre os encontrados por outros autores relacionados na tabela 5, porém a comparação é relativa, pois as condições e os meios de cultivos, bem como os microrganismos são outros.

Existem apenas dois trabalhos que tratam de lipases de *Streptomyces*, o primeiro realizado por Large *et al.* (1999) que explorou a atividade lipolítica por várias espécies de *Streptomyces*, tais como: *Streptomyces lividans*, *clavuligerus*, *coelicolor*, *rimosus*, e uma linhagem recombinante, *Streptomyces erythreus*.

O outro trabalho foi desenvolvido por Hyung-Soo e Park (2007) que trata de uma linhagem de *Streptomyces* que produz tacrolimus, um antibiótico com atividade imunossupressora. Nestes, a atividade lipolítica foi determinada por processo titulométrico e não por espectrofotometria, como neste trabalho, impossibilitando

---

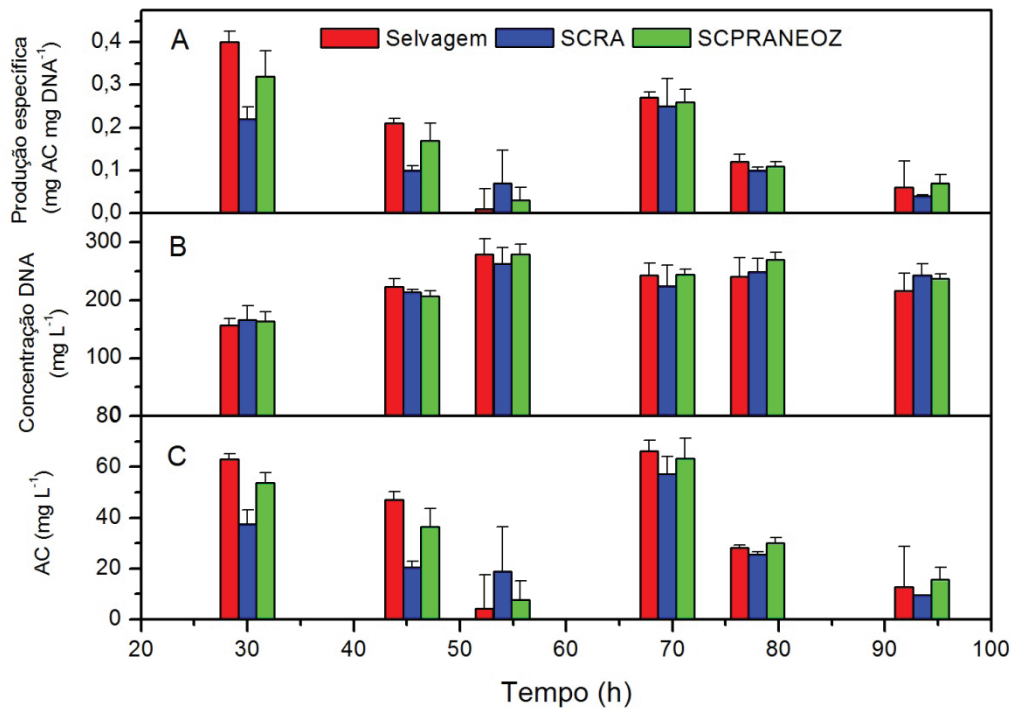
comparações. Outro fato interessante encontrado neste trabalho e cujos resultados estão em desacordo com as pesquisas acima mencionadas é o fato que a lipase neste estudo foi determinada no sobrenadante do caldo de fermentação. Estes resultados acordam com as lipases atualmente seqüenciadas (NZ\_DS570672, NZ\_CM000913) de *Streptomyces clavuligerus*. Nestes seqüenciamentos as lipases são secretadas, e possivelmente apresentam peptídeo sinal.

Large *et al.* (1999) e Hyung-Soo e Park (2007) afirmam que a lipase de *Streptomyces* é encontrada apenas no caldo fermentativo sem centrifugação e no "pellet". Eles concluem que a atividade de lipase está associada com a célula bacteriana e não é extracelular, o que está em contradição com os resultados deste trabalho. Embora os trabalhos designados por Hyung-Soo e Park (2007) tratam de experimentos com uma linhagem nova de *Streptomyces clavuligerus*, designada CKD1119, neste caso, a comparação é apenas referencial.

### **4.3 Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ**

#### **4.3.1 Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ em meio de cultivo SA**

A produção de ácido clavulânico em meio de cultura SA, a base de amido está mostrada na figura 35.



**Figura 35. Produção de ácido clavulânico em meio SA da linhagem selvagem e mutantes *S. clavuligerus* RA e *S. clavuligerus* pRAneoZ. (A) produção específica, (B) concentração de DNA e (C) concentração de ácido clavulânico.**

Ao nível de 5% de significância não houve diferença estatística significativa entre todos os parâmetros analisados: produção de AC, produção específica e concentração de DNA.

Estes resultados apontam que o mutante *S. clavuligerus* pRAneoZ, com a inserção de uma cópia do gene *rpoZ* de *S. coelicolor* em *S. clavuligerus* não tem efeito significativo na produção de AC, quando ambas linhagens cultivadas em meio SA.

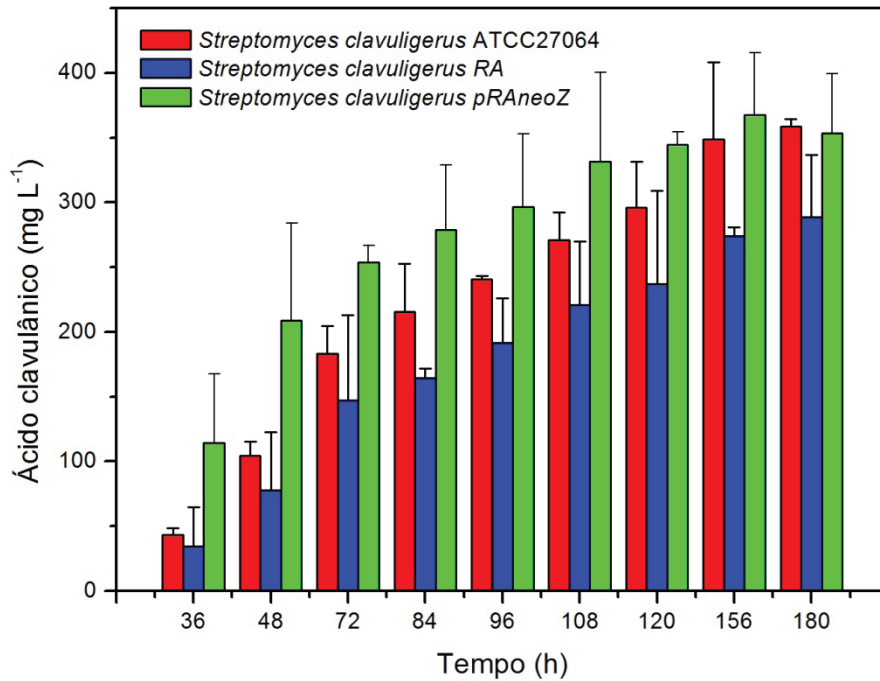
---

#### 4.3.2 Produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ em meio de cultivo a base de óleo soja

O gene *rpoZ* (gene *SCO1478*) de *Streptomyces coelicolor* codifica uma proteína pequena, aproximadamente com 90 aminoácidos, uma subunidade hipotética da cadeia ômega ( $\omega$ ) de RNA polimerase.

Em outros microrganismos como *Streptomyces kasugaensis*, foi verificado que este gene está relacionado com a produção do antibiótico kasugamicina e com o processo de diferenciação morfológica (KOJIMA et al., 2002).

O mutante *Streptomyces clavuligerus* RA foi utilizado como controle do mutante *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ, o que realmente contém o gene *rpoZ* de *S. coelicolor*. A produção de ácido clavulânico para este conjunto de mutantes é apresentada na figura 36.



**Figura 36.** Produção de ácido clavulânico em meio a base de óleo e farinha de soja, da linhagem selvagem e mutantes *S. clavuligerus* RA e *S. clavuligerus* pRAneoZ.

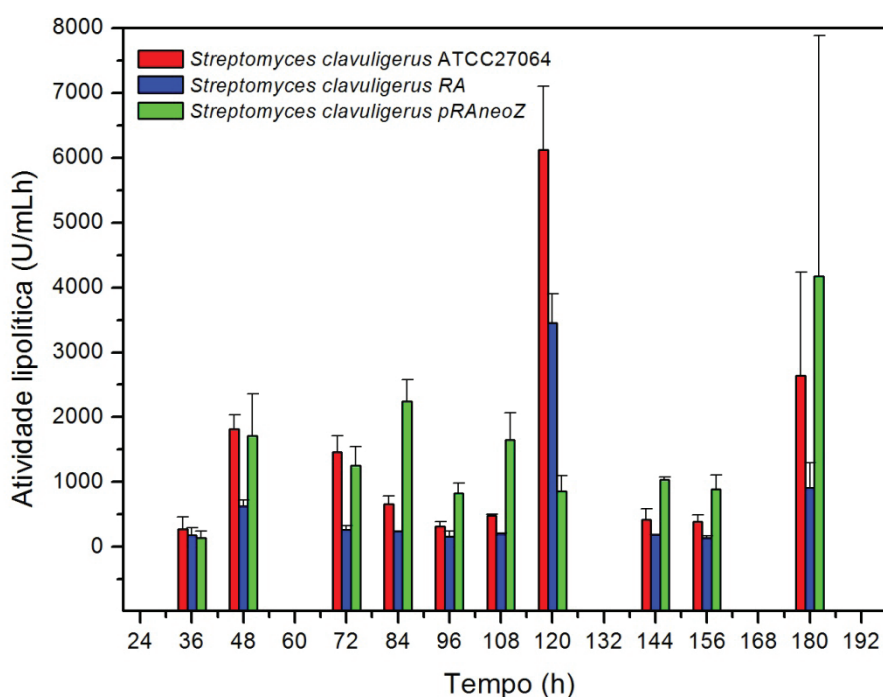
A análise de variância ao nível de 5% de significância mostrou que houve diferença estatística significativa entre os valores de ácido clavulânico entre a linhagem selvagem e o mutante *S. clavuligerus* pRAneoZ. E em todos os tempos nas fermentações a produção de AC pelo mutante *S. clavuligerus* pRAneoZ foi sempre maior em relação a linhagem selvagem.

A inserção de uma cópia do gene *rpoZ* de *S. coelicolor* em *Streptomyces clavuligerus* aumenta a produção de ácido clavulânico, sendo, portanto, este mutante candidato para outros trabalhos de fermentação, seja em biorreator em batelada ou em batelada alimentada.



### 4.3.3 Atividade lipolítica de *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ

O maior valor da atividade lipolítica foi em 120 horas de cultivo para a linhagem selvagem, neste tempo a produção de AC por esta linhagem ainda não tinha atingido seu pico máximo (figura 37).



**Figura 37.** Atividade lipolítica do sobrenadante dos cultivos de *Streptomyces clavuligerus* selvagem e dos mutantes, *Streptomyces clavuligerus* RA e *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ.

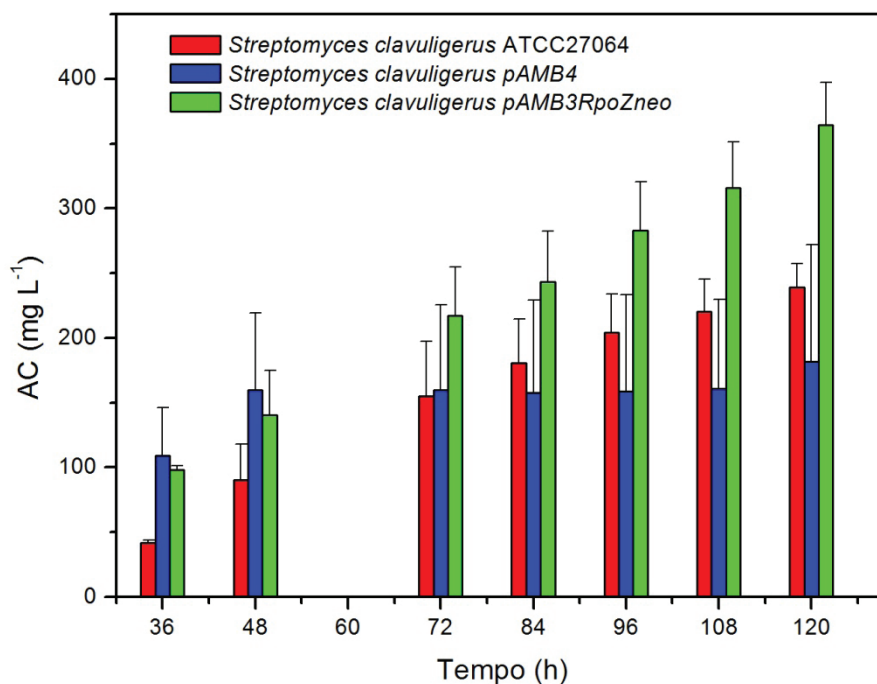
A atividade lipolítica do mutante *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ apresenta títulos maiores do que mutantes construídos por interrupção gênica. Fazendo-se uma comparação entre esses tipos de mutantes, observa-se que; a atividade lipolítica da linhagem *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ chega a 1,7

vezes maior que a atividade do mutante  $\Delta lat::apr$  e 81 vezes maior que o duplo mutante.

Analisando a atividade lipolítica neste mutante, a ANOVA mostra que não há diferença estatística significativa entre os resultados, comparando-se a linhagem selvagem e o mutante *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ, em nível de 5% de significância. Porém, este mutante produz altos níveis de lipase, que poderia ser explorado industrialmente.

#### **4.4 Análise de ácido clavulânico em cultivo a base de óleo e farinha de soja da linhagem selvagem e dos mutantes *Streptomyces clavuligerus* pAMB4 e *Streptomyces clavuligerus* pAMB3RpoZneo**

A produção de ácido clavulânico para a linhagem selvagem e para os mutantes *Streptomyces clavuligerus* pAMB4 e *Streptomyces clavuligerus* pAMB3RpoZneo é mostrada na figura 38.



**Figura 38.** Produção de ácido clavulânico em meio a base de óleo e farinha de soja, da linhagem selvagem e mutantes *S. clavuligerus* pAMB4 e *S. clavuligerus* pAMB3RpoZneo.

O mutante *S. clavuligerus* pAMB4, apresentou níveis semelhantes de ácido clavulânico no processo fermentativo, quando comparados com a linhagem selvagem. Este mutante contém plasmídeo multi-cópia, com replicação autônoma e com marcadores de resistência a ampicilina e a canamicina, sem o gene *rpoZ* de *S. coelicolor* e foi elaborado e utilizado apenas como controle do mutante *S. clavuligerus* pAMB3RpoZneo.

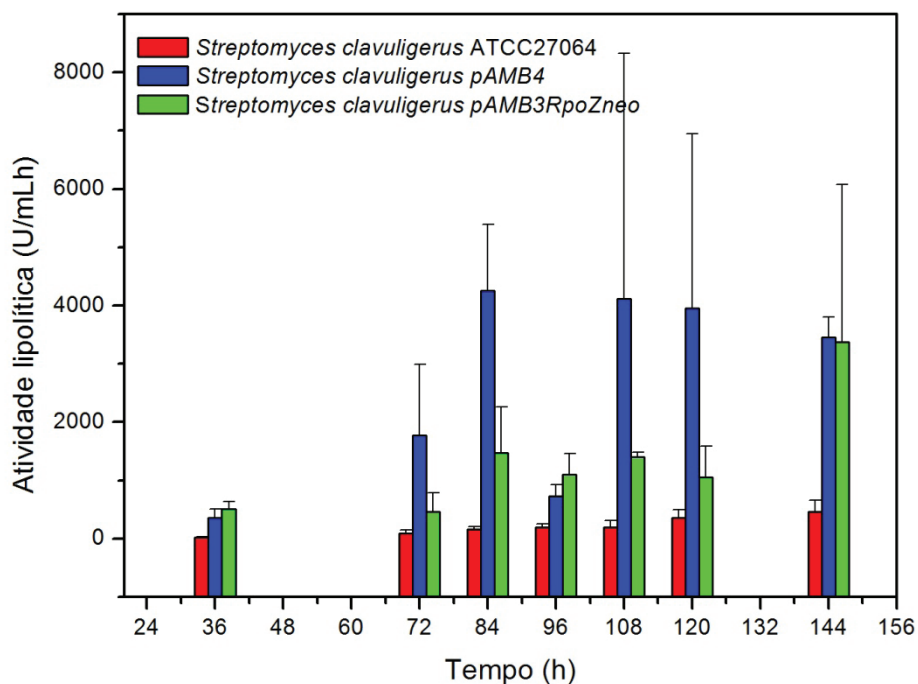
A produção de ácido clavulânico pelo mutante *S. clavuligerus* pAMB3RpoZneo, que contém múltiplas cópias do gene *rpoZ* de *S. coelicolor*, foi maior que da linhagem selvagem. O teste estatístico de *Fisher* em nível de significância de 5% e o teste de *Newman-Keuls* ( $\alpha = 1\%$ ) mostrou que há diferença estatística significativa entre os resultados.

O gene *rpoZ* codifica uma subunidade  $\omega$  de RNA polimerase e está relacionado com a produção de kasugamicina, um antibiótico aminoglicosídeo (KOJIMA et al., 2002) e com a morfogênese de *Streptomyces kasugaensis*. Neste estudo a inserção do plasmídeo contendo cópias do gene *rpoZ* de *S. coelicolor* aumenta efetivamente a produção de ácido clavulânico, por um mecanismo ainda desconhecido, que precisa ser investigado e estudado.

Pelo seu título de ácido clavulânico, o mutante *S. clavuligerus* *pAMB3RpoZneo* poderia ser escolhido também para futuros estudos em processos fermentativos em biorreator.

#### **4.4.1 Atividade lipolítica da linhagem selvagem e dos mutantes *S. clavuligerus* *pAMB4* e *S. clavuligerus* *pAMB3RpoZneo***

A produção de lipase pelo mutante controle *Streptomyces clavuligerus* *pAMB4* foi maior que a da linhagem selvagem (figura 39), analisando-se os dados de atividade de lipase em nível de 5% de significância pela ANOVA. Porém, este mutante não contém o gene *rpoZ* de *S. coelicolor*, e foi construído como plasmídeo controle para o outro mutante (*S. clavuligerus* *pAMB3RpoZneo*).



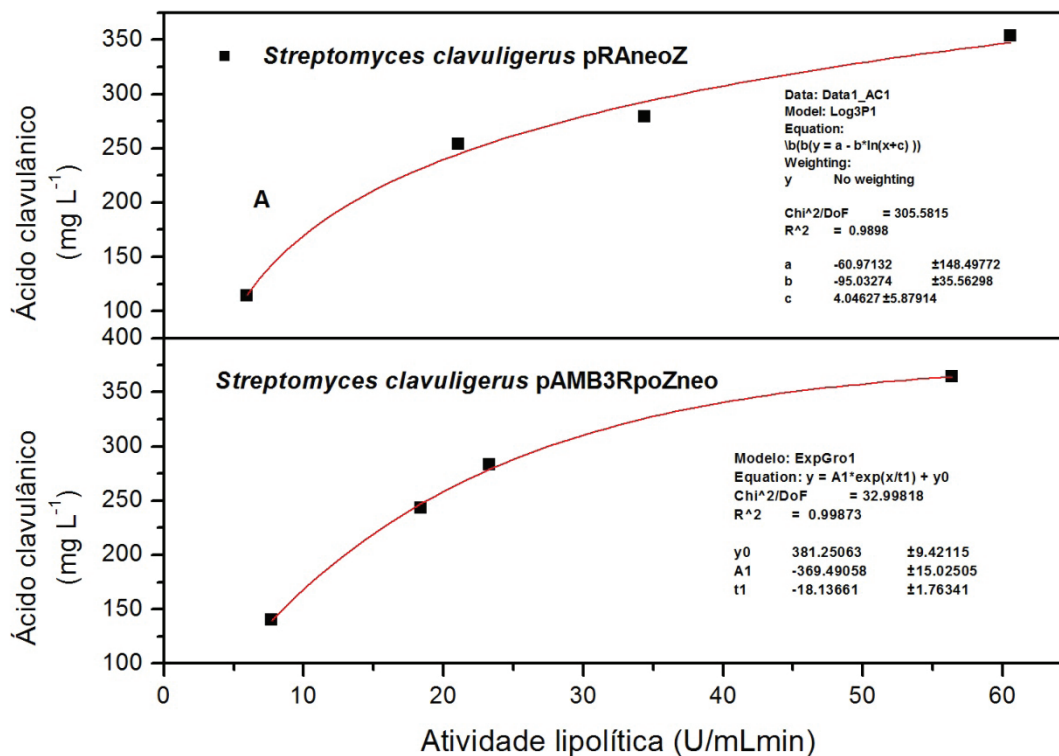
**Figura 39.** Atividade lipolítica do sobrenadante dos cultivos de *Streptomyces clavuligerus* selvagem e dos mutantes, *Streptomyces clavuligerus* pAMB4 e *Streptomyces clavuligerus* pAMB3RpoZneo.

O plasmídeo pAMB4 multi-cópia é constituído dos genes *neo* e *amp* e da origem de replicação oriT (necessária para a replicação em *Streptomyces*), portanto a produção aumentada da lipase não pode ser atribuída ao gene *rpoZ* de *S. coelicolor* e sim ao próprio plasmídeo em questão. Para processos de produção de lipase, este mutante pAMB4 poderia ser utilizado.

Comparando-se a produção de lipase pela linhagem selvagem e o mutante *Streptomyces clavuligerus* pAMB3RpoZneo, observou-se que não houve diferença estatística significativa entre os resultados em nível de 5 e 1% de significância, pelo teste de *Tukey*. Este mutante poderia ser selecionado para estudos de produção de ácido clavulânico e não pela produção de lipase.

Para mostrar a relação direta entre a produção de lipase e do ácido clavulânico, plotou-se a figura 40. Foram escolhidos os mutantes *Streptomyces*

*clavuligerus* pRAneoZ e pAMB3RpoZneo, nos tempos de cultivo de 48, 84, 96 e 120 horas. Os resultados confirmaram a relação existente entre a produção de lipase e de ácido clavulânico. Propõe-se um modelo matemático, na faixa estudada, para esta interdependência com alto coeficiente de determinação ( $R^2$ ) 98,98 e 99,87%, respectivamente para *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ e *Streptomyces clavuligerus* pAM3RpoZneo.



**Figura 40.** Gráfico da produção de ácido clavulânico em relação a atividade lipolítica dos mutantes *Streptomyces clavuligerus*: a) pRAneoZ e b) pAMB3RpoZneo.

A lipase é a primeira enzima envolvida no catabolismo de óleos e sua função específica de hidrólise de tri, di e mono-glicerídeos pode estar acoplada com o seu papel da incorporação de ácidos graxos nas células. E uma vez dentro da célula os ácidos graxos entram no ciclo da  $\beta$ -oxidação para liberar o acetil ou propionil

coenzima A (CoA), e dependendo da composição do substrato lipídico, pode ser o precursor de muitos antibióticos (LARGE *et al.* 1999).

Óleos são indutores de lipases (MAIA *et al.* 2001), e quando estão presentes no meio de cultivo produzem altos índices de lipase. Vários pesquisadores têm desenvolvido estudos na produção de lipases, modificando fontes de carbono entre outros, porém há raros trabalhos que investigam lipase de *Streptomyces clavuligerus*.

Neste trabalho investigou-se a produção de ácido clavulânico concomitantemente com a atividade lipolítica. Determinou-se uma relação direta da produção de ácido clavulânico em função da atividade lipolítica. Este fato pode ser explicado da seguinte maneira: o microrganismo (as linhagens de *Streptomyces clavuligerus*) consome primeiramente o glicerol do meio de cultivo nas fermentações, até sua exaustão. Logo após o triglicerídeo existente na forma de óleo de soja é hidrolisado pela lipase para liberar os ácidos graxos e glicerol, que por sua vez, será novamente incorporado na molécula de ácido clavulânico por meio da rota biossintética do mesmo. E como explanado anteriormente, pode até haver uma relação entre as rotas biossintéticas da lipase e do ácido clavulânico.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os genes *lat* e *cvm7P*, das rotas biossintéticas da cefamicina C e das clavamas 5S, respectivamente, foram deletados por interrupção gênica, por mecanismo de recombinação homóloga com duas permutas.
- O mutante *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr$  não apresentou diferença estatística significativa nos títulos de ácido clavulânico, quando comparado com a linhagem selvagem parental, em meio de cultura SA e no meio de cultivo a base de óleo vegetal.
- O duplo mutante denominado *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr \Delta cvm7P::neo$  apresentou títulos de ácido clavulânico menores do que sua linhagem parental, nos mesmos meios de cultivos anteriormente mencionados. Este fato não pode ser explicado, pois o cultivo do mutante *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta cvm7P::neo$ , não pôde ser estabelecido no laboratório. Seria este mutante o responsável pela baixa produção de ácido clavulânico no duplo mutante? Por qual mecanismo isto teria acontecido?
- O mutante *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ, que contém uma cópia do gene *RpoZ* de *Streptomyces coelicolor*, apresentou títulos maiores de ácido clavulânico, quando comparado com a linhagem selvagem parental, com limite de confiança de 95%. Este mutante foi obtido quando o plasmídeo pRAneoZ, que contém o sítio attP para a inserção no genoma de *Streptomyces clavuligerus*, por conjugação. O gene *RpoZ* codifica uma subunidade ômega de RNA polimerase, e esta estratégia foi eficaz na produção de ácido clavulânico.



- 
- O plasmídeo multi-cópia pAMB3RpoZ é um vetor com replicação autônoma e foi inserido em *Streptomyces clavuligerus* por conjugação. Este mutante apresenta diferença estatística significativa na produção de ácido clavulânico quando comparado com sua linhagem parental, ao intervalo de confiança de 95%, pelo teste exato de *Fisher* e ao intervalo de confiança de 90% pelo teste de *Newman-keuls*.
  - Em virtude da presença de óleo de soja no meio de cultivo a atividade lipolítica foi dosada e apresentou diferenças significativas nos níveis de lipases entre a linhagem selvagem e os mutantes pRAneoZ, pAMB4 e o duplo mutante, pelo teste de *Fisher* ao nível de 95% de confiança. A atividade de lipase do mutante *Streptomyces clavuligerus* pRAneoZ foi maior do que sua linhagem selvagem parental. A lipase é produzida no meio de cultivo por efeito indutivo e uma relação direta entre as produções de lipase e de ácido clavulânico foi observada. Parece haver uma relação entre as vias biossintéticas das lipases e de ácido clavulânico, a qual poderia ser mais amplamente estudada.
  - O meio de cultivo estabelecido por Maranesi (2005) poderia ser reformulado e melhorado. A proporção de farinha de soja em relação aos demais componentes do meio de cultivo (proteína, gorduras totais, fibra dietética, cálcio, carboidratos e uma pequena proporção de ferro) é alta (20 g L<sup>-1</sup>), tornando o meio relativamente insolúvel. Uma reformulação também iria diminuir a proporção de carboidratos que atualmente está presente na farinha de soja e que acaba por inibir a produção de lipases e por consequência a produção de ácido clavulânico.

- Cultivos em batelada em biorreatores poderiam ser realizados com os mutantes para se investigar os títulos de ácido clavulânico, bem como a produção de lipases.
- Outro mutante duplo, por exemplo, *Streptomyces clavuligerus*  $\Delta lat::apr$  pRAneoZ poderia ser construído a partir dos mutantes já disponíveis para se investigar o efeito destas mutações simultâneas na produção de ácido clavulânico e de lipase.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, Y. R. Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. using Box-Behnken experimental design. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1217-1222, 2002.

AHARONOWITZ Y.; COHEN G.; MARTIN J. F. Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 461-495, 1992.

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.

ALEXANDER, D. C.; BRUMLIK, M. J.; LEE, L.; JENSEN, S. E. Early Cephamycin Biosynthetic Genes Are Expressed from a Polycistronic Transcript in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 2, p. 348-356, 2000.

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 Catalyzes the ATP-dependent Formation of N-Glycyl-clavaminic Acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 6, p. 279-287, 2006.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Eds.). Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1994.

BACHMANN, B. O.; LI, R. E.; TOWNSEND, C. A. Beta-lactam synthetase: a new biosynthetic enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, v. 95, p. 9082-9086, 1998.

BALTZ, R. H. Genetic methods and strategies for secondary metabolite yield improvement in actinomycetes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 251-259, 2001.

BRAKHAGE, A. A.; AL-ABDALLAH, Q.; TÜNCHER, A.; SPRÖTE, P. Evolution of  $\beta$ -lactam biosynthesis genes and recruitment of trans-acting factors. **Phytochemistry**, v.66, p.1200-1210, 2005.

BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J. D.; READING, C.; ROLISON, G. N. Naturally occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, p. 668-669, 1976.

BURTON, K. Determination of DNA concentration with diphenylamine. **Methods in Enzymology**, v. 12, Part B, p. 163-166, 1968.

BUSH, K. Classification of beta-lactamases: grupos 2c, 2d, 2e, 3 e 4. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p. 271-276, 1989a.

BUSH, K. Classification of beta-lactamases: grupos 1, 2a, 2b, e 2b'. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p. 264-270. 1989b.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.**, v. 100 Suppl 2, p. 14555-14561, 2003.

CHAMPNESS, W. C. New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 1168-1174, 1988.

CHATER K. F.; MERRICK M.J. Streptomycetes. In: PARISH, J.H. (Ed.), **Developmental biology of prokaryotes**, ed. Oxford: Blackwell Science, p. 93-114, 1979.

CHATER, K. F.; HOPWOOD, D. A. *Streptomyces*. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. **Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 83-99, 1993.

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

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

CHIN-HANG, S.; CHUN-JUN, X.; GEE-CHEN, L. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process biochemistry**, v. 41, p. 734-738, 2006.

---

COMBES, P.; TILL, R.; BEE, S.; SMITH, M. C. M. The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-*attB* Sites for the  $\phi$ C31-encoded site-specific recombination system. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 20, p. 5746–5752, 2002.

COQUE, J. J. R.; ENGUITA, F. J.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. A two-protein component 7 $\alpha$ -Cephem-methoxylase encoded by two genes of the cephamycin C cluster converts cephalosporin C to 7-Methoxycephalosporin C. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 8, p. 2230-2235, 1995.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 657-663, 2000.

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

DEVI, S.; PADMA, S. Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 225-231, 2000.

DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, 241-246, 1999.

DOMINGUEZ, A.; PASTRANA, L.; LONGO, M. A.; RÚA, M. L.; SANROMAN, M. A. Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 95-99. 2005.

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; TALEB, A. T.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process biochemistry**, v. 39, p. 525-528, 2004.

ELSON, S. W.; OLIVER, R. S. Studies on the biosynthesis of clavulanic acid. I. Incorporation of <sup>13</sup>C-labelled precursors. **The Journal of Antibiotics.**, v. 31, n. 6, p. 586-592, 1978.

ELSON, S. W.; BAGGALEY, K. H.; GILLET, J.; HOLLAND, S.; NICHOLSON, N. H.; SIME, J. T.; WORONIECKI, S. R. Isolation of two novel intracellular  $\beta$ -lactams and a novel dioxygenase cyclising enzyme from *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of the American Chemical Society**. v. 22, p. 1736-1738, 1987.

ELSON, S. W.; BAGGALEY, K. H.; FULSTON, M.; NICHOLSON, N. H.; TYLER, J. W.; EDWARDS, J.; HOLMS, H.; HAMILTON, I.; MOUSDALE D. M. Two novel arginine derivatives from a mutant of *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 15, p. 1211-1212, 1993.

ESCRIBANO, J. P. G. **The stringent response in *Streptomyces clavuligerus*: investigation of the role of *relA* and *rplk (relC)* genes**. León-ES, 2006, 232 p. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidad de León-ES, Departamento de Ecología, Genética y Microbiología.

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

FOULSTONE M.; READING, C. Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of Augmentin, in biological fluids with HPLC. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 22, p. 753–762, 1982.

FUENTE, A.; LORENZANA, L. M.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6559-6565, 2002.

GARRITY, G.; BELL, J.; LILBURN, T. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2<sup>nd</sup> ed., Bergey's Manual Trust, New York: Springer-Verlag, 2004.

GOMEZ-ESCRIBANO, J. P.; MARTÍN, J. F.; HESKETH, A.; BIBB, M. J. LIRAS, P. *Streptomyces clavuligerus* *relA*-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C:negative regulation of secondary metabolism by (p)ppGpp. **Microbiology**, v. 154, p. 744-755 . 2008.

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

GUPTA, N.; SAHAI, V. GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42 , p. 518–526, 2007.

---

GUTMAN, A. L.; RIBON, V.; BOLTANSKI, A. Incorporation of  $\beta$ -hydroxypropionate into  $\beta$ -lactam residue of clavulanic acid. **Journal of the American Chemical Society.**, p. 1627-1630, 1985.

GUST, B.; CHALLIS, G. L.; FOWLER, K.; KIESER, T., CHATER, K.F. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, v. 100, n. 4, p. 1541-1546, 2003.

GUST, B.; KIESER, T.; CHATER, K. F. REDIRECT@technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*.', Department of Molecular Microbiology, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UH, UK. Disponível em: <[http://streptomyces.org.uk/redirect/protocol\\_V1\\_4.pdf](http://streptomyces.org.uk/redirect/protocol_V1_4.pdf)>. Acesso em: 13 Jul. 2010.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HANAHAN, D. Techniques for transformation of *E. coli*. In: GLOVER, D. M. (Ed.), **DNA Cloning: a practical approach**, Oxford: IRL Press, chapter 6, p. 109-135, 1995.

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

HOBBS G.; FRAZER C. M.; GADNER D. C. J.; CULLUM J. A.; OLIVER S. G. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 272-277, 1989.

HODGSON, J. E.; FOSBERRY, A. P.; RAWLINSON, N. S.; ROSS, H. N. M.; 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, p. 49-55, 1995.

HOLMES, D. S.; QUIGLEY, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Analytical Biochemistry.**, v. 114, p. 1, p. 193-197, 1981.

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

HU, W.; BRAÑA, A. F.; DEMAİN, A. L. Carbon source regulation of cephem antibiotic production by resting cells of *Streptomyces clavuligerus* and its reversal by protein synthesis inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 155-160, 1984.

HUNG, T. V.; MALLA, S.; PARK, B. C.; LIOU, K.; LEE, H. C.; SOHNG, J. K. Enhancement of clavulanic acid by replicative and integrative expression of *ccaR* and *cas2* in *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 1538-1545, 2007.

HYUNG-SOO, K.; PARK, Y. Lipase activity and tacrolimus production in *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 mutant strains. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 1638-1644, 2007.

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

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, 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.

JIANG, Z.; WANG, H.; MA, Y.; WEI, D. Characterization of two novel lipase genes isolated directly from environmental sample. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 70, p. 327-332, 2006.

JIN, W.; KIM, H. K.; KIM, J. Y.; KANG, S. G.; LEE, S. H.; LEE, K. J. Cephamycin C production is regulated by *relA* and *rsh* genes in *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064. **Journal of Biotechnology**, v. 114, p. 81-87. 2004.

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

KHALEELI, N.; LI, R. F.; TOWNSEND, C. A. Origin of the  $\beta$ -lactam carbons in clavulanic acid from a unusual thiamine pyrophosphatemediated reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 9223–9224, 1999.



---

KIESER, T. e MELTON, R. E. 'Plasmid pIJ699, a multi-copy positive-selection vector for *Streptomyces*.' **Gene.**, v. 65, n. 1, p. 83-91, 1988.

KIESER, T.; BIBB, M.; BUTTNER, M.; CHATER, K. E.; HOPWOOD, D. **Practical *Streptomyces* Genetics**. Norwich, England, The John Innes Foundation, p. 613, 2000.

KIM, H. S.; PARK, Y. Lipase activity and tacrolimus in *Streptomyces clavuligerus* CKD1119 mutant strains. **Journal of Microbiology and Biotechnology.**, v. 17, n. 10, p. 1638-1644, 2007.

KOJIMA, I.; KASUGA., K.; KOBAYASHI., M.; FUKASAWA, A.; MIZUNO., S.; ARISAWA., A.; AKAGAWA., H. The *rpoZ* Gene, Encoding the RNA Polymerase Omega Subunit, Is Required for Antibiotic Production and Morphological Differentiation in *Streptomyces kasugaensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6417-6423, 2002.

KYUNG Y. S.; HU, W.S.; SHERMAN, D. H. Analysis of temporal and spatial expression of the CcaR regulatory element in the cephamycin C biosynthetic pathway using green Fluorescent protein. **Molecular Microbiology.**, v. 40, p. 530–541, 2001.

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 Microbial Technology**, v. 25, p. 569-575, 1999.

LECHEVALIER, H. A. A Practical Guide to Generic Identification of Actinomycetes. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. D.; HOLT, J. G. (Eds.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Baltimore, U.S.A.: Williams & Wilkins, pp. 2344-2347, 1989.

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

LI, R.; KHALEELI, N.; TOWNSEND, C. A. 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.

LI, R.; TOWNSEND, C. A. Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. **Metabolic engineering**, v.8, p. 240-252, 2006.

LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins: Cephamycins produced by actinomycetes. **Antonie Van Leeuwehoek**, v. 75, p. 109-124, 1999.

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

LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Assay Methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*. In: BARREDO, J. L. (Ed.). **Methods in Biotechnology: microbial processes and products**. Totowa, NJ: Humana Press, v. 18, p. 149-163, 2005.

LIRAS, P.; GOMEZ-ESCRIBANO, J. P.; SANTAMARTA, I. Regulatory mechanisms controlling antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 667-676, 2008.

LOTRAKUL, P.; DHARMSTHITI, S. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. **Journal of Biotechnology**, v. 54, p. 113-120, 1997.

MAHADIK, N. D.; BASTAWDE, K. B.; PUNTAMBEKAR, U. S.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2031-2034, 2004.

MAIA, M. M. D.; HEASLEY, A.; CAMARGO DE MORAIS, M. M.; MELO, E. H. M.; MORAIS JR. M. A.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 23-27, 2001.

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 & Biotechnology**, v. 21, p. 509-514, 2005.

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

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

---

MELLADO, E.; LORENZANA, L. M.; RODRÍGUEZ-SÁIZ, M.; DÍEZ, B.; LIRAS, P.; BARREDO, J. L. The clavulanic acid biosynthetic cluster of *Streptomyces clavuligerus*: genetic organization of the region upstream of the car gene. **Microbiology**, v. 148, p. 1427-1438, 2002.

MILLER, J. H. 'Experiments in molecular genetics'. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 466p. 1972.

NAGARAJAN R.; BOECK L. D.; GORMAN M.; HAMILL R. L.; HIGGINS C. E.; HOEHN M. M.; STARK W. M.; WHITNEY J. G.  $\beta$ -lactam antibiotics from *Streptomyces*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 2308-2310, 1971.

NICHOLSON, N. H.; BAGGALEY, K. H.; CASSELS, 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 the American Chemical Society**, v. 11, p. 1281-1282, 1994.

ORTIZ, S. C. A.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1071-1077, 2007.

PAGET, M. S. B.; CHAMBERLIN, L.; ABDELMADJID, A.; FOSTER, S. J.; BUTTNER, M. J. Evidence that the Extracytoplasmic Function Sigma Factor  $\sigma^E$  Is Required for Normal Cell Wall Structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Journal of Bacteriology**, v. 181, n.1, p. 204-211, 1999.

PAN, S. C.; BONANNO, S.; WAGMAN, G. H. Efficient utilisation of fatty oils as an energy source in penicillin fermentations. **Applied Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 176-180, 1959.

PARADKAR, A. S.; MOSHER, R. H.; ANDERS, C.; GRIFFIN, A.; GRIFFIN, J.; HUGHES, C.; GREAVES, P.; BARTON, B.; JENSEN, S. E. Applications of gene replacement technology to *Streptomyces clavuligerus* strain development for clavulanic acid production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2292-2297, 2001.

PARK, Y. S.; MOMASE, I.; TSUNODA, K. OKABE, M. Enhancement of cephamycin C production using soyben oil as the sole carbon source. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 40, p. 773-779, 1994.

PEREZ-LLARENA, F. J., LIRAS, P.; RODRIGUEZ-GARCIA, A.; MARTÍN, J. F. A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both  $\beta$ -lactam compounds. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 6, p. 2053-20059, 1997.

PÉREZ-LLARENA, F. J.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; ENGUITA, F. J.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. The *pcd* gene encoding piperideine-6-carboxylate dehydrogenase involved in biosynthesis of  $\alpha$ -aminoadipic acid is located in the cephamycin cluster of *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 17. p. 4753-4756. 1998.

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, p. 311-321, 1998.

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.; SANTAMARTA, I.; BOVENBERG, R.; MARTÍN, J. F. LIRAS, P. The enigmatic lack of glucose utilization in *Streptomyces clavuligerus* is due to inefficient expression of the glucose permease gene. **Microbiology**, v. 156, p. 1527-1537, 2010.

POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. **Trends in Genetics**, v. 11, p. 217-218, 1995.

RAGHAVA, G. P.; SOLANKI, R. J.; SONI, V.; AGRAWAL, P. Fingerprinting method for phylogenetic classification and identification of microorganisms. **Biotechniques**, v. 29, n. 1, p. 108-112. 2000.

READING, C.; COLE, M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 11, p. 852-857, 1977.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; FUENTE, A.; PÉREZ-REDONDO, R.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Characterization and expression of the arginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Molecular Microbiology Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 543-550, 2000.

---

RODRÍGUEZ-GARCÍA A., SANTAMARTA I., PÉREZ-REDONDO R., MARTÍN J.F.; LIRAS, P. Characterization of a two-gene operon *epeRA* involved in multidrug resistance in *Streptomyces clavuligerus*. **Research Microbiology**, v. 157, p. 559-568, 2006.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; BARREIRO, C.; SANTOS-BENEIT, F.; SOLA-LANDA, A.; MARTÍN, J. F. Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a  $\Delta$ phoP mutant. **Proteomics**, v. 7, p. 2410-2429, 2007.

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

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 20, p. 318-25, 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, 1986.

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 and Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 510-516, 1988.

SALOWE, S. P.; MARSH, E. N.; TOWNSEND, C. A. Purification and characterization of clavamate synthase from *Streptomyces clavuligerus*: an unusual oxidative enzyme in natural product biosynthesis. **Biochemistry**, v. 29, p. 6499-6508, 1990.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SÁNCHEZ, L.; BRAÑA, A. F. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Microbiology**, v. 142, n. 5, p. 1209-1220, 1996.

SANTAMARTA, I.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, A.; PÉREZ-REDONDO, R.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Ccar is an autoregulatory protein that binds to the *ccaR* and *cefD-cmcl* promoters of the cephamycin C-clavulanic acid cluster in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, v.184, n. 11, p.3106-3113, 2002.

SAUDAGAR, P. S.; SINGHAL, R. S. A statistical approach using L<sub>25</sub> orthogonal array method to study fermentative production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* MTCC1142. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, p. 345-360, 2007.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003.

SILVA, W. O. B.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 321-326, 2005.

STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W.; WITT, D. Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses. **Gene**, v. 115, n. 1-2, p. 255-260, 1992.

SUN, Y.; HE, X.; LIANG, J.; ZHOU, X.; DENG, Z. Analysis of functions in plasmid pHZ1358 influencing its genetic and structural stability in *Streptomyces lividans* 1326. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 82, p. 303-310. 2009.

SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 223-238, 2000.

TAHLAN, K.; ANDERS, C.; JENSEN, S. E. The paralogous pairs of genes involved in clavulanic acid and clavam metabolite biosynthesis are differently regulated in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 18, p. 6286-6297, 2004.

TAHLAN, K.; ANDERS, C.; WONG, A.; MOSHER, R. H.; BEATTY, P. H.; BRUMLIK, M. J.; GRIFFIN, A.; HUGHES, C.; GRIFFIN, J.; BARTON, B.; JENSEN, S. E. 5S Clavam Biosynthetic Genes Are Located in Both the Clavam and Paralog Gene Clusters in *Streptomyces clavuligerus*. **Chemistry Biology**, v. 14, p. 131-142, 2007.

TENG, Y.; XU, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3900-3907, 2008.

TEODORO, J. C.; BAPTISTA-NETO, A.; CRUZ-HERNÁNDEZ, I.; HOKKA, C. O.; BADINO, C. A. Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 72, p. 450-455, 2006.



TOBIN, M. B.; KOVACEVIC, S.; MADDURI, K.; HOSKINS, J. A.; SKATRUD, P. L.; VINING, L. C.; STUTTARD, C.; MILLER, J. R. Localization of the Lysine  $\epsilon$ -Aminotransferase (*lat*) and  $\delta$ -(L- $\alpha$ -Aminoadipyl)-L-Cysteinyl-D-Valine Synthetase (*pcbAB*) Genes from *Streptomyces clavuligerus* and Production of Lysine  $\epsilon$ -Aminotransferase Activity in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 19, p. 6223-6229, 1991.

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

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, 1985b.

TRINH-VIET, H.; MALLA, S.; PARK, B. C.; LIOU, K. Y.; LEE, H. C.; SOHNG, J. K. Enhancement of clavulanic acid by replicative and integrative expression of *ccaR* and *cas2* in *Streptomyces clavuligerus* NRRL3585. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 9, p.1538-1545. 2007.

VASCONCELOS, E. S. **Caracterização bioquímica e morfológica de mutantes de *Streptomyces clauligerus* ATCC 27064 através de aplicação de radiação UV e tratamento químico.** São Carlos, 2008. 89 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos-SP, 2008.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica.** Porto Alegre: Artmed Editora, 2000.

WANG, Y.; YANG, B.; REN, J.; DONG, M.; LIANG, D.; XU, A. Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Sreptomyces clavuligerus*. **Process Biochemistry**, v.40, p.1161-1166, 2005.

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.

WHITNEY J. G.; BRANNON D. R.; MABE J. A.; WICKER K. J. Incorporation of labeled precursors into A16886B, a novel beta-lactam antibiotic produced by *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 1, p. 247-251, 1972.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; WELLINGTON, E. M.; SNEATH, P. H.; SACKIN, M. J. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of General Microbiology**, v. 129, n. 6, p. 1743-1813, 1983a.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; WELLINGTON, E. M.; VICKERS, J. C.; ALDERSON, G.; SNEATH, P. H.; SACKIN, M. J.; MORTIMER, A. M. A probability matrix for identification of some *Streptomyces*. **Journal of General Microbiology**, v. 129, n. 6, p. 1815-1830, 1983b.

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

ZHIHAN, Z.; YANPING, W. Application of *lat* gene disruption to increase the clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 102-107, 2006.