

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
Departamento de Tecnologia de Alimentos

ESTUDO DE MEIO DE CULTIVO INDUSTRIAL PARA PRODUÇÃO DE
CEFALOSPORINA C POR *Cephalosporium acremonium*

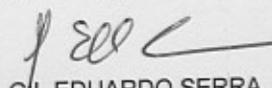
Maria da Graça Stupiello Andrietta

Gil Eduardo Serra
(orientador)

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Maria da Graça Stupiello Andrietta aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de julho de 1998.

Campinas, 03 de julho de 1998.


Prof. Dr. GIL EDUARDO SERRA
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

1998

5819057

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
T/Unicamp	
An 28e	
V. _____	Et. _____
TOMBO BC/	35131
PROC.	395/98
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/09/98
N.º GPD	

CM-00116281-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

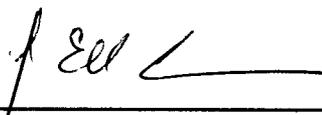
An28e^{ok} Andrietta, Maria da Graça Stupiello
Estudo de meio de cultivo industrial para produção de
cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium* / Maria da
Graça Stupiello Andrietta. - Campinas, SP [s.n.], 1998.

Orientador: Gil Eduardo Serra
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

I. Antibióticos. 2. Cefalosporina^{iv}. 3. Acremonium^{iv}.
4. Fermentação^x. 5. Meio de cultura^{iv}. I. Serra, Gil Eduardo.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Aprovada em 03/07/98



Prof. Dr. Gil Eduardo Serra



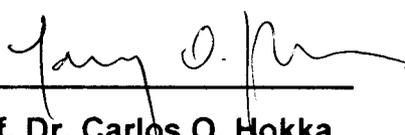
Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues



Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho



Prof. Dr. Carlos O. Hokka

Profa. Dra. Lúcia Durrant (suplente)

Profa. Dra. Dejanira F. de Angelis (suplente)

Ofereço esse trabalho

a Deus

que me permitiu chegar até aqui

***Dedico esse trabalho a minha família
que sempre me acompanha nos momentos mais difíceis
(Aurora, Érica, Jaime, Sílvio, Jô, Zeca e Sílvio)***

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Gil Eduardo Serra pela confiança depositada durante a realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Carlos O. Hokka pelo exemplo de pesquisador.

À Professora Maria Isabel Rodrigues não só pelo auxílio na elaboração desse trabalho, mas também pela sincera amizade.

Ao CPQBA (Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas da UNICAMP) pela oportunidade da realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Fermentações do CPQBA Mileni e Daniel pela grande ajuda na parte prática desse trabalho.

Ao Sr. Antônio Rubens R. Ciasca (BaCilmpex Imp. e Exp.) pelo fornecimento das matérias primas.

A Érica Stupiello pelo auxílio na elaboração do summary

As amigas Cláudia e Cibeli pela paciência.

Ao meu marido Sílvio pelo constante cuidado e dedicação demonstrado durante todo o tempo em que somos companheiros.

ÍNDICE

RESUMO.....	i
SUMMARY.....	iii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1.Antibióticos.....	3
2.2. Os Antibióticos Cefalosporinas.....	3
2.3. Modo de Ação das Cefalosporinas	5
2.4. Classificação das Cefalosporinas.....	5
2.5. Microrganismos Produtores de Cefalosporina C.....	7
2.6. Biossíntese da Cefalosporina C.....	8
2.7. Meio de Cultivo para Produção de Cefalosporina C.....	8
2.7.1. Fontes de Carbono.....	8
2.7.2. Fontes de Nitrogênio.....	12
2.7.3. Outros Compostos.....	14
2.8. Parâmetros da Fermentação.....	16
2.8.1. Tempo.....	16
2.8.2. Temperatura e pH.....	16
2.8.3. Oxigênio Dissolvido.....	17
2.8.4. Forma de Alimentação.....	18
2.9. Decomposição da Cefalosporina C.....	18
2.10. Análise de Cefalosporina C.....	19
2.11. Substrato para Fermentação em Larga Escala.....	20
2.12. Frascos Agitados como Método para Estudo de Fermentações Industriais.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Microrganismo, Manutenção e Propagação da Cultura.....	23
3.2. Métodos Analíticos.....	26
3.2.1. Análise de Cefalosporina C.....	26
3.2.2. Análise de Açúcares - Glicose, Frutose e Sacarose.....	26

3.2.3. Análise de Massa Celular Produzida.....	27
3.2.4. Medida do pH do Meio de Cultivo.....	27
3.3. Delineamento Experimental.....	28
3.3.1. Seleção de Matérias Primas.....	28
3.3.1.1. Matérias Primas Testadas Isoladamente.....	28
3.3.1.2. Cinética da Produção de Cefalosporina C.....	32
3.3.1.3. Matérias Primas Testadas em Associação.....	33
3.3.2. Otimização do Meio de Cultivo.....	36
3.3.3. Escalonamento.....	40
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	43
4.1. Matérias Primas Testadas Isoladamente.....	43
4.2. Cinética da Produção de Cefalosporina C.....	46
4.3. Matérias Primas Testadas em Associação.....	52
4.4. Otimização do Meio de Cultivo.....	61
4.5. Escalonamento.....	77
4.6. Considerações Finais.....	82
5. CONCLUSÕES.....	83
6. BIBLIOGRAFIA.....	85

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar um meio de cultivo industrial para produção de cefalosporina C, utilizando a linhagem C-10 de *Cephalosporium acremonium* (ATCC 11550) em experimentos conduzidos em frascos agitados. Foram testadas diferentes fontes de proteína padronizadas, de uso indicado para fermentações industriais, fornecidas pela QUEST INTERNACIONAL - Divisão SHEFFIELD, constituídas à base de soja (Hy-Soy), lacto albumina (Edamin'S), caseína (N-Z Amine A e N-Z Amine As), milho (Hydrolyse Corn Gluten) e algodão (Hydrolyse Cottonseed). As fontes protéicas foram adicionadas a um meio basal, em quantidade equivalente a 4g/l de nitrogênio total. O meio de cultivo que apresentou uma maior produção de cefalosporina C (0,63 g/l) foi formulado à base de soja, sendo o meio à base de caseína (N-Z Amine A) o que apresentou uma menor produção do antibiótico. A partir disto foi feito um estudo de cinética da produção de cefalosporina C com esses dois meios de cultivo. Os resultados confirmaram a soja como melhor substrato para produção do antibiótico e mostraram também, ser esta a matéria prima mais produtiva, uma vez que com 144 horas de fermentação houve a produção de 0,93 g/l de cefalosporina C. A caseína precisou de 192 horas de fermentação para produzir apenas 0,64 g/l do antibiótico. Para os dois substratos testados foi verificado ainda a degradação do antibiótico após o pico de máxima produção.

Em uma segunda etapa do trabalho foi avaliada a associação de fontes protéicas na formulação do meio de cultivo. Além de Hy-Soy e Edamin'S, que foram as que apresentaram os melhores resultados na primeira fase, foi introduzido um extrato protéico padronizado, à base de soja (Samprosoy), que é produzido no Brasil pela SANTISTA ALIMENTOS divisão SAMBRA. Neste experimento foram formulados sete diferentes meios de cultivo contendo 4 g/l de N total. Os resultados mostraram um sinergismo na associação de Samprosoy, Hy-Soy e Edamin'S, com uma maior produção do antibiótico (1,43 g/l em 144 horas). Esta composição foi utilizada como ponto central (36 g/l de sacarose, 27 g/l de glicose e 4 g/l de N total) na primeira fase da otimização do meio de cultivo utilizando planejamento fatorial completo de dois níveis e três variáveis. As variáveis estudadas foram a concentração de sacarose, glicose e nitrogênio, e a variável resposta foi a concentração de cefalosporina C no caldo

fermentado. Os resultados obtidos mostraram que maiores concentrações de glicose e nitrogênio levam a um aumento na produção do antibiótico, sendo a variação da concentração de sacarose não significativa na produção da cefalosporina C. Em uma segunda fase da otimização do meio de cultivo o ponto central foi deslocado de modo que esse meio apresentasse maiores concentrações de glicose e nitrogênio (37 g/l de glicose e 6 g/l de N total) e menor quantidade de sacarose (26 g/l). Confirmou-se que altas concentrações de glicose(acima de 45 g/l) e nitrogênio (acima de 6 g/l) direcionam a um aumento na produção, e que a concentração de sacarose não influencia no aumento da produção do antibiótico.

Em uma última etapa foi conduzida uma fermentação simultânea em fermentador e em frascos agitados para o estudo do efeito da aeração na produção de cefalosporina C. Parte do meio preparado e inoculado no fermentador foi transferido para frascos Erlenmayer. Os resultados mostram que no fermentador a quantidade de cefalosporina C produzida foi 2,82 vezes maior que as obtidas em frascos agitados. A diferença certamente está associada ao nível constante da concentração de oxigênio no meio de fermentação, possível de se controlar no fermentador mas não em frascos agitados.

SUMMARY

The purpose of this work was to study an industrial growing medium for cephalosporin C production in a shaker, using the C-10 strain of *Cephalosporium acremonium* (ATCC 11550). Different sources of standard protein have been tested, all of which recommended for industrial fermentation, and provided by QUEST INTERNACIONAL - SHEFFIELD Division, soy-based (Hy Soy), Lactoalbumin (Edamin'S), casein (N-Z Amine and N_Z Anime A), corn (Hidrolyse Corn Gluten) and cotton (Hydrolyse Cottonseed). The protein sources were added to a basic medium amounting to 4 g/l of the total nitrogen. The growing medium that reached the highest cephalosporin C production (0.63 g/l) was soy-based, and the medium that had the lowest amount of the antibiotic was the casein-based (N-Z Amine A). These two growing mediums were then used for a kinetic study of cephalosporin C production. The results have confirmed soybean as the best substratum for the antibiotic production as well as the most productive raw material, since there was a 0.93 g/l cephalosporin C production within 144 hours of fermentation. The casein took 192 hours of fermentation to produce only 0.64 g/l of the antibiotic. It has been observed for both substrata that there was a degradation of the antibiotic after the maximum production peak was reached.

In the second stage of the trial, the association of protein sources in the growing medium formulation was evaluated. In the addition to Hy-Soy and Edamin'S, proteins that presented the best results in the first stage, a standard soy-based proteinic extract (Samprosoy) produced in Brazil by SANTISTA ALIMENTOS - SAMBRA division was introduced. Seven different growing mediums containing 4 g/l of total N were formulated. The results have showed a synergism in the association among Samprosoy, Hy-Soy and Edamin'S, with a higher antibiotic production (1,43 g/l within 144 hours). This composition was used as a central point (36 g/l sucrose, 27 g/l glucose and 4 g/l of total N) at the first optimization stage of growing medium a complete two-level and three-variable factorial design. The variable studied were the sucrose, glucose and nitrogen concentration, and the response variable was the cephalosporin C concentration in the fermented broth. The results have shown that higher glucose and nitrogen concentration have led to an increase in the antibiotic production, even though the variation in sucrose concentration was insignificant for cephalosporin C production. In the second stage of growing medium optimization the central point was dislocated in order to present higher glucose and

nitrogen concentrations (37 g/l of glucose and 6 g/l of N total) and lower sucrose concentration (26 g/l). It has been confirmed that high glucose (over 45 g/l) and nitrogen (over 6 g/l) concentration result in an increase in the production, and that sucrose concentration has no effect in the increase of antibiotic production.

In the last stage, a simultaneous fermentation in a fermenter and in a shaker was performed for the purpose of studying the aeration effect in cephalosporin C production. Part of the medium prepared and inoculated in the fermenter was transferred to Erlenmeyer flasks. The results have shown that in the fermenter, the amount of cephalosporin C produced was 2.82 times higher than in the shaker. The difference is surely associated with the constant oxygen concentration level in the fermentation medium, which was possible to be controlled in the fermenter but not in the shaker.

1. INTRODUÇÃO

Grande parte dos antibióticos de última geração estão incluídos no grupo de β -lactâmicos. Destes, mais de 50% são derivados da molécula de cefalosporina C e correspondem a um faturamento na ordem de US\$ 3,5 bilhões/ano (EARL, 1991).

A molécula de cefalosporina C é sintetizada por diferentes microrganismos, mas é o fungo *Cephalosporium acremonium* o microrganismo utilizado na biossíntese desse composto nas grandes indústrias farmacêuticas.

Os avanços alcançados na indústria de produção de antibiótico por via fermentativa passam por 2 diferentes caminhos: melhoramento do microrganismo e/ou a otimização do meio de cultivo e das variáveis de processo.

A otimização das variáveis de processo (agitação, pH, temperatura, forma de alimentação) assim como a formulação dos meios de cultivo, da mesma maneira que o melhoramento das linhagens, são realizados dentro da própria planta industrial não existindo o acesso a esses dados por parte da comunidade científica

A complementação do meio de cultivo com proteínas, em condições industriais, utiliza produtos de composição padronizada em razão da sensibilidade dos microrganismos a pequenas variações de formulação. Essas fontes são produzidas por empresas que adquirem matéria prima de baixo custo, normalmente proveniente do processamento de produtos de origem animal e vegetal, e as padronizam dentro de limites aceitáveis. Com isso, os custos dessas matérias primas as tornam atraente para o uso na indústria da fermentação.

No Brasil não existe nenhuma empresa que produza as fontes padronizadas para este fim sendo necessário a importação desses produtos com conseqüente aumento no custo da produção do antibiótico, assim como, de outros produtos obtidos a partir de

fermentação.

No Brasil foi identificado uma única empresa, a SANTISTA ALIMENTOS, que produz extratos proteicos à base de soja que, embora sejam utilizados como ingredientes para formulação de alimentos, apresentam a padronização necessária com custo acessível para serem utilizados em fermentações industriais. Um desses produtos o Samprosoy foi introduzido no presente estudo de forma a avaliar sua performance e obter dados preliminares que possibilitem ou incentivem o seu uso para a produção de cefalosporina C.

Este trabalho teve como objetivo estudar diferentes fontes de proteína para a composição de um meio de cultivo para produção de cefalosporina C a nível industrial, utilizando como microrganismo a linhagem C-10 de *Cephalosporium acremonium* (ATCC 11550). A primeira fase do trabalho foi realizada em frascos agitados onde se selecionou a melhor composição do meio de cultivo para produção do antibiótico. Nesta fase do trabalho, realizou-se ainda, o estudo de otimização do meio utilizando planejamento fatorial completo de dois níveis e três variáveis. Na última etapa do trabalho foi conduzida uma fermentação simultânea em fermentador e em frascos agitados para o estudo de escalonamento visando avaliar o efeito da aeração na produção de cefalosporina C

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antibióticos

Muitos microrganismos e plantas produzem substâncias a partir de mecanismos que não estão associados ao crescimento celular. Esses compostos são chamados de metabólitos secundários. O papel desses produtos não é bem conhecido no desenvolvimento dos organismos que os produzem. Algumas teorias associam essas substâncias ao processo evolutivo, que deixariam de ser vitais no decorrer da evolução. Muitas dessas substâncias têm importância econômica por serem utilizadas como aditivos em alimentos ou agentes terapêuticos.

Os antibióticos, que por definição são produtos de origem biológica que em pequenas concentrações são capazes de inibir o crescimento de microrganismos, são originados de metabolismo secundário de fungos e bactérias. O gênero *Streptomyces* é o grupo de microrganismos que produz um maior número de compostos com ação de antibiótico. São conhecidos até o momento aproximadamente 2000 diferentes antibióticos, dos quais, apenas 50 são usados para fins terapêuticos.

2.2. Os Antibióticos Cefalosporinas

A venda de antibióticos em 1987 foi estimada em US \$16 bilhões, sendo US \$ 9 bilhões associados à venda do grupo dos β -lactâmicos (WOLFE & DEMAIN, 1987). A cefalosporina C é um antibiótico desse grupo e é produzido principalmente por *Cephalosporium acremonium* e por algumas bactérias do gênero *Streptomyces*. O primeiro registro de microrganismo produtor de cefalosporina C data dos anos 40 e refere-se a uma linhagem de *C. acremonium* isolado perto de lançamento de esgotos nas costas da Sardenha. O composto foi identificado cinco anos mais tarde como um composto secundário originado de tripeptídeo contendo ácido aminoadípico, valina e

cisteína, possivelmente secretado como mecanismo de defesa contra bactérias (WEIL *et al.*, 1995).

A forma natural em que a cefalosporina ocorre é denominada cefalosporina C, que apresenta baixa atividade antimicrobiana. Para que esse antibiótico apresente potente ação contra os microrganismos são realizadas substituições químicas. (JAIPRAKASH & VAYALOMBRON, 1997)

A molécula da cefalosporina C (Figura 1) é composta por um anel didrothiazínico cuja posição 7 está ligada à amida do ácido D- α -aminodípico (CRUEGER & CRUEGER, 1984).

A separação do ácido D- α -aminodípico normalmente é feita por via química, uma vez que a via enzimática é dificultada pela configuração "D" daquele ácido. A separação por via química faz com que o processo envolva grandes perdas (SAVIDGE, 1984). Algumas amidases de origem bacteriana (*Achromobacter*, *Brevibacterium* e *Flavobacterium*) foram patenteadas pela MERCK, mas não foram utilizadas com sucesso (WALTON, 1966).

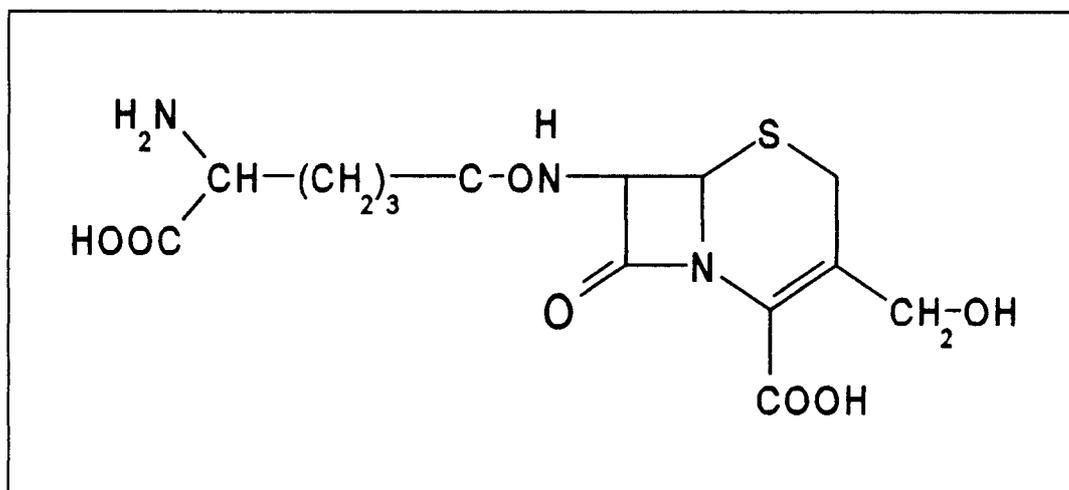


Figura 1 - Estrutura da molécula de cefalosporina C

2.3. Modo de Ação das Cefalosporinas

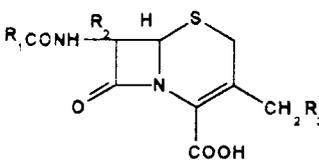
A parede celular de bactérias Gram positivas é constituída de uma camada rígida de peptídeo-glucana e polímero de ácido teioico, enquanto que a das Gram negativas possuem além desta camada uma segunda, a qual é constituída de proteínas, lipoproteínas, lipossacarídeos e fosfolipídios. É esta segunda camada que funciona como barreira para a entrada de antibióticos. A cefalosporina por ser uma molécula pequena, consegue atravessar esta camada e age inibindo a formação das cadeias de oligopeptídios que formam a parede celular (SMITH, 1985; WEIL *et al.*, 1995).

Trabalhos na área médica (JACOBY & MEDEIROS, 1991; BUSCH *et al.*, 1995; MIMIÇA *et al.*, 1996) têm reportado a presença de bactérias Gram negativas produtoras de β -lactamases, e que apresentam resistência à ação dos antibióticos do grupo dos β -lactâmicos. Dessa maneira novas drogas têm sido estudadas de maneira a tornar-se mais estáveis à hidrólise por aquelas enzimas.

2.4. Classificação das Cefalosporinas

A classificação dos antibióticos originários da cefalosporina C é baseada no espectro de atividade do produto (GILMAN *et al.*, 1985). A Figura 2 mostra alguns dos antibióticos originários da cefalosporina C.

As cefalosporinas de 1^o geração apareceram no mercado nos anos 60, como alternativa para o combate de bactérias resistentes à penicilina. Hoje, no mercado, encontram-se as de 4^o geração que apresentam atividade tanto contra bactérias Gram positivas quanto a Gram negativas. As cefalosporinas de última geração incluem, entre outras, a cefpiroma, ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima etc.. A eficiência destas cefalosporinas está associada à estabilidade da molécula contra o ataque das β -lactamases, que são enzimas produzidas por bactérias Gram negativas, que conferem a este tipo de bactéria



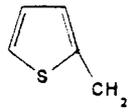
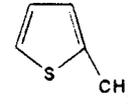
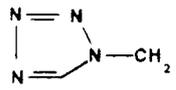
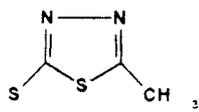
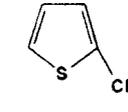
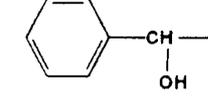
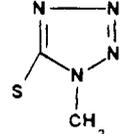
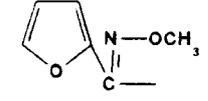
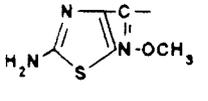
Nome	R1	R2	R3
Cephalothin		H	OCOCH ₃
Cephaloridine		H	
Cefazolin		H	
Cefoxitin		OCH ₃	CONH ₂
Cefamandole		H	
Cefuroxime		H	CONH ₂
Cefotaxime		H	OCOCH ₃

Figura 2 - Alguns antibióticos de uso clínico obtidos a partir da modificação química da cefalosporina C (Fonte: SMITH, 1985).

resistência aos antibióticos do grupo dos β -lactâmicos (JACOBY & MEDEIROS, 1991)

2.5. Microrganismos Produtores de Cefalosporina C

Apesar da produção de antibióticos do grupo dos β - lactâmicos, o qual inclui as penicilinas e cefalosporina C, estar associada a fungos e bactérias filamentosas (MALMBERG & HU, 1991), o microrganismo de maior interesse para a produção de cefalosporina C é o fungo *Cephalosporium acremonium*. Esse microrganismo foi isolado pela primeira vez em 1945 por Giuseppe Brotzu das águas salgadas da Sardenha perto da saída de esgotos. Esse pesquisador verificou que o produto proveniente deste microrganismo inibia o crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Somente em 1953 esse microrganismo foi associado como produtor de cefalosporina C pelos pesquisadores Newton & Abrain.

Desde o isolamento da linhagem original de *C. acremonium* há quarenta anos, esta vem sendo manipulada geneticamente pelas indústrias produtoras de cefalosporina C no sentido de aumentar a produção do antibiótico. MATSUMURA *et al.* (1982) trabalharam com mutante análogo, resistente a metionina, para atingir maior produção de cefalosporina C. Esses autores relatam que aumentou em três vezes a produção de cefalosporina C com a utilização de meio contendo sulfatos e linhagem mutante (SMR - 13), quando comparada com a selvagem (CW -19)

SHEN *et al.* (1986) descrevem que uma linhagem de *C. acremonium* (C -10) originária do primeiro isolado produz, em meio complexo, 3,6 g/l de cefalosporina C. VIALTA (1994) trabalhando com esta mesma linhagem obteve, em meio sintético, níveis de cefalosporina C de 2,16 g/l.

SKATRUD *et al.* (1989) conseguiram, a partir de DNA recombinante, uma linhagem de *C. acremonium* que produz uma maior quantidade de cefalosporina C. A linhagem

modificada produziu em fermentadores de 150 litros, 30% a mais do antibiótico do que a linhagem original.

Embora *C. acremonium* seja o microrganismo mais estudado no que diz respeito à produção de cefalosporina C, muitos trabalhos com *Streptomyces clavuligerus* têm sido conduzidos no sentido de aumentar a produção de cefalosporina C por este microrganismo (BRANA *et al.*, 1985; BRANA *et al.*, 1986; SANCHES *et al.*, 1988)

2.6. Biossíntese da Cefalosporina C

A biossíntese da produção da cefalosporina C tem sido estudada desde os anos 60 (SMITH *et al.*, 1967) e tem sido constantemente revisada por vários grupos de pesquisadores (SHEN *et al.*, 1986; WEIL *et al.*, 1995). A rota de produção deste antibiótico relatada por SHEN *et al.* (1986) é mostrada na Figura 3.

2.7. Meio de Cultivo para Produção de Cefalosporina C

2.7.1. Fontes de Carbono

Segundo diversos autores o *C. acremonium* pode utilizar diferentes fontes de carbono como galactose, glicose, sacarose, frutose, lactose, ribose, maltose e arabinose, entre outras.

Glicose, maltose, frutose, manose e sacarose são fontes de carbono que inibem a produção de cefalosporina C. A galactose, lactose e ribose também inibem em uma menor intensidade a produção daquele composto.

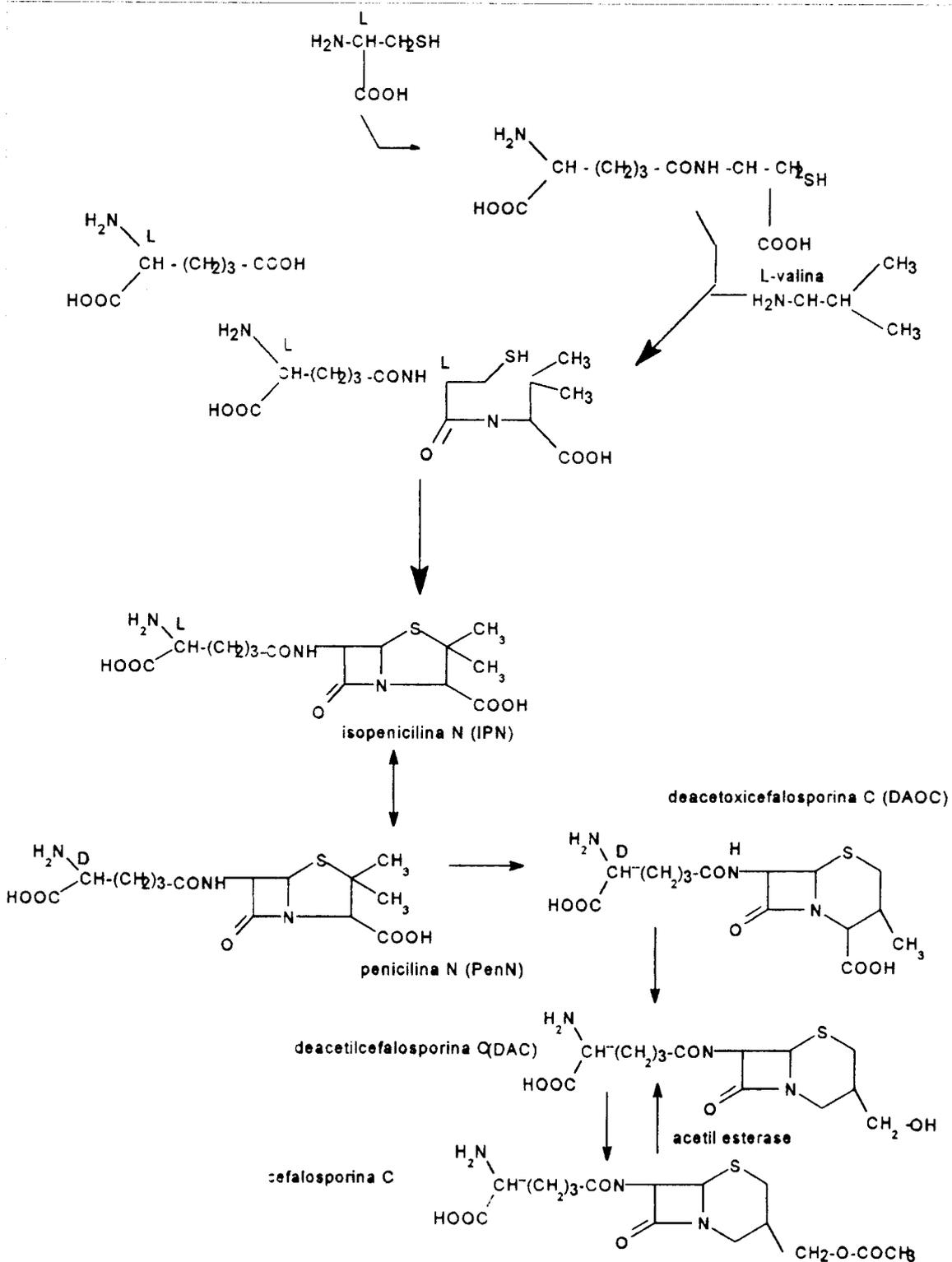


Figura 3 - Rota da biosíntese da cefalosporina C por *C. acremonium*. (SHEN et al., 1986)

As fontes de carbono que não têm efeito inibidor são o glicerol, arabinose, xilose, sorbose, raminose e celobiose (ZHANG & DEMAIN, 1991).

Embora a glicose tenha sido reportada como substância inibidora da síntese de cefalosporina C (MARTIN, 1978; DEMAIN *et al.*, 1983; ZHANG *et al.*, 1988), é largamente utilizada industrialmente por ser de fácil obtenção, relativamente de baixo custo e facilmente assimilada pelo microrganismo. Trabalhos no sentido de minimizar o efeito inibitório deste açúcar têm sido realizados. SCHEIDEEGGER *et al.* (1988) e VICIK *et al.* (1990) acreditam que é possível aumentar a produção de cefalosporina C com a manutenção de baixos níveis de glicose durante a fermentação.

Um número elevado de trabalhos conduzidos para estudos da produção de cefalosporina C utilizam duas diferentes fontes de carbono, com 2,7% de glicose e 3,6% de sacarose (DEMAIN *et al.*, 1963; MATSUMURA *et al.*, 1982; SHEN *et al.*, 1986). ARAÚJO *et al.* (1994) estudaram a influência dos açúcares glicose, sacarose e frutose tanto na obtenção do inóculo como na fermentação para produção da cefalosporina C. Esses autores concluíram que um maior rendimento e produtividade foram alcançados quando se faz o uso da glicose para a obtenção do inóculo e da glicose e sacarose para a condução da fermentação.

Alguns trabalhos têm utilizado outras fontes de carbono para produção de cefalosporina C. PAN *et al.* (1982) trabalhando com mutante de *C. acremonium* (M8650) comparou a utilização de açúcares e óleos. Para a linhagem estudada os autores afirmam que o metil oleato quando utilizado como única fonte de carbono aumenta os níveis de cefalosporina C produzida. Após 160 horas de fermentação a concentração deste antibiótico em meio contendo 30 g/l de metil oleato atingiu 18 g/l, contra 10 g/l quando glicose, sacarose e metil oleato foram utilizados em conjunto, em concentrações de 35, 15 e 6 g/l respectivamente.

MATSUMURA *et al.* (1978) estudando diferentes açúcares (em concentração de 2%) como fonte de carbono para a produção de cefalosporina C relatam que quando a glicose é associada à sacarose ou lactose a concentração de 100 µg/ml de cefalosporina C é atingida em frascos agitados contra 25 µg/ml quando glicose e frutose são associadas. Os autores acreditam que os açúcares facilmente absorvidos, como a glicose por exemplo, são responsáveis por uma inibição da produção de cefalosporina C. Esses mesmos autores sugerem que a glicose pode ser utilizada na produção de cefalosporina C sem apresentar efeito inibitório, se for feita a alimentação deste açúcar de forma intermitente.

SHEN *et al.* (1986) citam que a glicose para a linhagem C-10 de *C. acremonium* possui um menor efeito inibidor na produção de cefalosporina C que para a linhagem CW-19, uma vez que foi detectado o aparecimento de enzimas envolvidas na produção do antibiótico antes da exaustão completa da glicose na fermentação quando a linhagem C-10 foi utilizada.

ZHOU *et al.* (1992) estudando o efeito de meio de cultivo complexo na produção de cefalosporina C por uma linhagem de *C. acremonium* altamente produtora daquele composto, relatam que baixa concentração de glicose associada à adição de fosfato, causa um aumento na produção do antibiótico, quando cessa o crescimento celular.

YANG *et al.* (1996) postulam que o efeito inibitório da glicose na produção de cefalosporina C está associado à reação deste açúcar com um composto intermediário (6-APA) da biossíntese do antibiótico. Os autores acreditam que com esta reação, que ocorre também quando se faz uso de outros açúcares redutores, diminui a quantidade de 6-APA livre e conseqüentemente ocorre uma queda na quantidade de cefalosporina C produzida.

2.7.2. Fontes de Nitrogênio

As fontes de nitrogênio normalmente utilizadas para produção de cefalosporina C incluem nitratos, sais de amônio como acetato, cloreto ou sulfato, assim como proteínas complexas as quais incluem as peptonas, extrato de leveduras, etc. (NASH *et al.*, 1985).

Quando a cefalosporina C é produzida em escala industrial as fontes de proteínas são provenientes de matérias primas complexas, as quais contêm compostos diversos em baixas concentrações, na maioria das vezes não identificados, e que apresentam importante ação nutricional. Entretanto, trabalhos básicos referentes à ação de alguns compostos adicionados em meio definido têm sido realizados para o melhor conhecimento no que diz respeito à rota de produção da cefalosporina C.

DEMAIN *et al.* (1963) estudaram o efeito da metionina, norleucina e derivados de lisina na produção de cefalosporina C. Esses autores relatam que alguns derivados de lisina quando associados (N-acetil-L-lisina e ácido amino *n* - capróico) estimulam a produção de cefalosporina C. Esses autores associam a metionina como estimulador da produção de cefalosporina C por ser um aminoácido que substitui a cisteína intracelular, que é um precursor da cefalosporina C em reações metabólicas.

CALTRIDER & NISS (1966) investigando a produção de cefalosporina C, quando diferentes aminoácidos contendo enxofre são adicionados ao meio de fermentação, afirmam que a metionina é o único composto que estimula a produção do antibiótico por *C. acremonium*. Estes autores sugerem que presença de L-cisteína no meio de fermentação, que é o aminoácido doador direto do átomo de enxofre presente na molécula de cefalosporina C, não estimula a produção uma vez que o enxofre do antibiótico é preferencialmente suprido pela sulforação da metionina.

MATSUMURA *et al.* (1978) trabalhando com a linhagem M8650 de *Cephalosporium*

acremonium estudaram o efeito da adição de metionina em diferentes tempos de fermentação. Os dados mostram que quando esse aminoácido é adicionado a 24 horas de fermentação, o valor final da produção de cefalosporina C (120 h) atinge 110 µg/ml e é maior que quando a adição foi feita a 0, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação que obtiveram as concentrações de 97, 68, 30, 28 e 40 µg/ml respectivamente.

MATSUMURA *et al.* (1980^a) acreditam que altos níveis de metionina intracelular em *C. acremonium* são responsáveis pela produção de cefalosporina C, pois a presença desse aminoácido pode induzir modificações no metabolismo e promover a produção do antibiótico. Outros autores também acreditam que além de doadora do átomo de enxofre a metionina tem papel regulador na produção de cefalosporina C (DREW & DEMAIN, 1973; DREW & DEMAIN, 1975^a; DREW & DEMAIN, 1975^b; DREW & DEMAIN, 1975^c).

MATSUMURA *et al.* (1982) trabalharam com uma linhagem metionina análoga resistente de *C. acremonium*, que produziu três vezes mais cefalosporina C que a linhagem selvagem. Os pesquisadores associam essa super produção de antibiótico ao fato dessa cepa ser capaz de sintetizar metionina a partir de sulfato inorgânico e acumular esse aminoácido em seu interior.

Alguns outros aminoácidos têm sido estudados quanto à sua influência na produção de cefalosporina C. MEHTA *et al.* (1979) associaram a lisina quando em concentração de 0,5 mg/ml como um estimulador da síntese de cefalosporina C. A adição de quantidades maiores desse aminoácido diminuiu a quantidade de cefalosporina produzida. Estes autores descrevem uma diferenciação morfológica do fungo, resultante da adição da lisina, e associam essa diferenciação ao aumento na produção do antibiótico. A diferenciação inclui a fragmentação das hifas e diferenciação dos artrosporos. Esta mesma correlação, ou seja, diferenciação celular associada ao aparecimento da cefalosporina C, foi feita por MATSUMURA *et al.* (1980^b) quando metionina foi

adicionada ao meio. Embora esses autores tenham feito estas associações, QUEENER & ELLIS (1975) acreditam que não pode ser estabelecido nenhuma relação entre a quantidade de cefalosporina C produzida e a diferenciação celular. Mutantes não produtores de cefalosporina C apresentaram estas diferenciações celulares segundo NASH & HUBER (1971).

A utilização de amônia como fonte de nitrogênio também tem sido estudada. SHEN *et al.* (1984) relatam a repressão na produção de cefalosporina C quando sulfato de amônio é utilizado. Esses autores trabalharam com meio composto de sulfato de amônio suplementado com asparagina, e constataram que um aumento na concentração deste sal diminui a produção de cefalosporina C mas aumenta a produção de penicilina N, que é um composto intermediário na formação da cefalosporina C.

Os trabalhos que utilizam matérias primas complexas como fonte de proteína para a produção de cefalosporina C, citam como substrato a farinha de soja (HUBER & TIETZ, 1983; PEREZ - MARTINEZ & PEDERDY, 1985; SHEN *et al.*, 1986) e a de amendoim (BAYER *et al.*, 1989; HILGENDORF *et al.*, 1987; ZHOU *et al.*, 1992).

ZHOU *et al.* (1992) estudaram diferentes concentrações de farinha de amendoim como matéria prima para produção de cefalosporina C em fermentadores de 40 l e encontraram a dosagem de 100 g/l como a melhor para a composição do meio de cultivo. Quando essa concentração foi utilizada foram produzidas 11,84 g/l de cefalosporina C por *C. acremonium*.

2.7.3. Outros Compostos

Além das fontes de carbono e nitrogênio, se faz necessário a utilização de outros compostos no preparo de meio de cultivo para produção de cefalosporina C, onde se

incluem as fontes de fósforo e micronutrientes.

Os fosfatos têm sido estudados como reguladores da produção de antibióticos e alguns autores os descrevem como inibidores de metabólitos secundários, incluindo a cefalosporina C (DEMAIN *et al.*, 1983; CRUEGER & CRUEGER, 1984; NASH *et al.*, 1985).

WEINBERG (1974) acredita que o efeito inibitório do fosfato na produção de metabólitos secundários está associado à ausência de íons metálicos. Trabalhos com *Streptomyces clavuligerus* (LUBBE *et al.*, 1984) e com *C. acremonium* (ZHANG *et al.*, 1988) relatam que quando Fe^{2+} e fosfato são adicionados no meio de cultivo, é possível reverter o efeito inibitório do fosfato na produção das enzimas envolvidas com a produção de cefalosporina C, sem entretanto aumentar a produção desse produto no final da fermentação.

KUENZI (1980) acredita que altas concentrações de fosfatos aumentam a taxa de assimilação da glicose e portanto aumenta a repressão da produção dos β -lactâmicos. Essa opinião não coincide com a postulada por Martin¹ citado por ZHANG *et al.*, (1988) que mesmo trabalhando com uma linhagem de *C. acremonium* diferente da que KUENZI trabalhou, acreditam que o efeito inibitório na produção de cefalosporina C exercido pelo fosfato é independente da regulação pela glicose.

A adição de carbonato de cálcio em meios de fermentação tem sido utilizada como elemento de tamponamento do meio de cultivo (SHEN *et al.*, 1986; BAYER *et al.*, 1989). YANG *et al.* (1996) acreditam que a reação do 6-APA com dióxido de carbono proveniente da adição de carbonato de cálcio ao meio de cultivo, como agente tamponante, é responsável pela diminuição na produção de β -lactâmicos. Esses autores recomendam a substituição do carbonato de cálcio por outro composto.

¹ MARTIN, J.F.; REVILLA, G. ZANCA, D.M.; LOPEZ-NETO, M.J. Carbon catabolite regulation penicillin and cephalosporin biosynthesis. IN: UMEZAWA, H.; DEMAIN, A.L.; HATA, T.; HUTCHINSON, C.R. Trends in antibiotic research. Japan Antibiotics Research Association, p 258.

2.8. Parâmetros da Fermentação

É difícil determinar as condições ideais de fermentação para produção de metabólitos secundários, uma vez que as condições ótimas para o crescimento nem sempre são as mesmas para a produção do produto de interesse.

2.8.1. Tempo

De uma maneira geral a produção de cefalosporina C tem início quando a glicose se esgota. Esse açúcar embora apresente um efeito repressor na produção do antibiótico, é uma fonte de carbono promotora do crescimento celular (MATSUMURA *et al.*, 1978). O esgotamento desse açúcar, que ocorre em média após 48 horas de fermentação, desencadeia o início da produção da cefalosporina C. Entretanto, isto é variável em função da linhagem de microrganismo utilizada, da composição do meio de cultivo e do tipo de fermentação que pode ser conduzida em frascos agitados ou fermentadores operando em modo contínuo ou em batelada.

2.8.2. Temperatura e pH

A faixa de temperatura de fermentação encontrada nos trabalhos pode variar de 25 (KUPKA *et al.*, 1983; SHEN *et al.*, 1986;) até 28 °C (DREW & DEMAINE , 1973; MATSUMURA *et al.*, 1980^(a); KOZMA *et al.*, 1993; KOZMA & KARAFFA, 1996).

KUENZI (1978) associam temperaturas menores com a produção de hifas mais longas, o que dificulta a difusão do oxigênio.

SMITH (1985) descreve que o pH não é um parâmetro crítico na produção de cefalosporina C, recomendando que este seja mantido estável entre 6,0 a 7,0, pela adição de amônia.

Os estudos de CHU & CONSTANTINIDES (1988) que trabalharam com modelagem na produção de cefalosporina C, reduziram o tempo de fermentação de 180 horas para 100 horas com um aumento na produção de cefalosporina C de 480 para 561 ug/ml através da otimização do controle de temperatura e pH.

2.8.3. Oxigênio Dissolvido

A biossíntese da cefalosporina C inclui três diferentes etapas que envolvem reações de oxidação. Em função disso é possível entender a sensibilidade deste processo em relação ao oxigênio dissolvido (KOZMA & KARRAFA, 1996).

A fermentação de cefalosporina C exige altas concentrações de oxigênio dissolvido no meio de cultivo. A queda no suprimento de oxigênio no meio de fermentação ocasiona o acúmulo de um composto intermediário, a penicilina N, com redução na produção de cefalosporina C (SMITH, 1985; HEROLD *et al.*, 1988).

HILGENDORF *et al.* (1987) estudaram a influência do oxigênio dissolvido na produção de cefalosporina C e relatam que quando o oxigênio dissolvido se encontra em 40% de saturação ocorre uma elevação na produção deste antibiótico. Em ensaios onde se trabalhou com apenas 10% de oxigênio dissolvido houve um decréscimo na produção de cefalosporina C com um aumento na produção da penicilina N, que é um intermediário da biossíntese desse antibiótico.

SCHEIDEGGER *et al.* (1984) descrevem que concentrações de oxigênio menores que 50% de saturação são limitantes na produção de cefalosporina C.

BAYER *et al.* (1989) estudaram o efeito do tipo de aeração na produção de cefalosporina C. Esses autores relatam que quando se utilizam reatores agitados por aeração ("airlift") os resultados em relação à produtividade de cefalosporina C são

menores do que em fermentadores com agitação mecânica. Essa menor produtividade é atribuída a uma menor concentração celular naquele tipo de reator, que é resultado da dificuldade da transferência de oxigênio em reatores tipo "airlift".

2.8.4. Forma de Alimentação

A forma de alimentação do meio de cultivo, na maioria das vezes, pode aumentar os rendimentos do composto de interesse. A forma mais utilizada na indústria de fermentação é a alimentação contínua.

O efeito inibitório da glicose na produção de cefalosporina C foi exaustivamente elucidada por vários grupos de pesquisadores. A alimentação contínua em baixos níveis desse açúcar tem sido uma estratégia utilizada para diminuir este efeito (SCHEIDEGGER *et al.*, 1988; VICIK *et al.*, 1990; ZHOU *et al.*, 1992).

2.9. Decomposição da Cefalosporina C

A molécula de cefalosporina C é instável, decompondo-se no meio de fermentação. A reação envolve a hidrólise do anel β -lactâmico. Essa degradação pode chegar em alguns casos a valores de 30% do total produzido (BAYER *et al.*, 1989).

HINNEN & NUESCH (1976), estudando uma linhagem mutante de *C. acremonium*, atribuem a hidrólise da cefalosporina C a uma enzima extracelular produzida por essa linhagem.

USHER *et al.* (1988) acreditam que a decomposição química da cefalosporina C tem maior importância quando comparada à decomposição enzimática (β -lactamases). Esses autores estudaram a influência da temperatura e pH na decomposição da cefalosporina C e relatam que em temperatura de 25 °C atinge taxas de 0,48% por hora

contra 6,40% quando a 60 °C. Com a decomposição do antibiótico aparece no caldo de fermentação um outro composto que não foi identificado, embora saiba-se que é um produto da decomposição da cefalosporina C.

2.10. Análise de Cefalosporina C

A dosagem de cefalosporina C normalmente é feita microbiologicamente ou por cromatografia líquida.

A dosagem microbiológica utiliza microrganismos sensíveis à cefalosporina C (SMITH *et al.*, 1967; ZANCA & MARTIN, 1983; PEREZ-MARTINEZ & PEBERDY, 1985). O diâmetro do halo de inibição da amostra é comparado com o halo formado com concentrações conhecidas do produto. O microrganismo mais utilizado para este fim é uma linhagem de *Alcaligenes faecalis* (ATCC 8750).

A dosagem por cromatografia líquida é a mais utilizada por ser mais rápida, precisa e em alguns casos permite a identificação de outros compostos formados durante a fermentação. A coluna normalmente utilizada é uma C 18 de fase reversa. A detecção é feita em 254 nm, fluxo de 0,3 - 2,0 ml/minuto, sensibilidade perto de 0,08 AUFS. Os eluentes podem ser à base de carbonato de amônio (WHITE *et al.*, 1977), metanol e hidróxido de tetrabutilamônio (KENNEDY, 1978), acetato de acetonitrila (ZANCA & MARTIN, 1983) ou ainda acetato de amônio (DWYER, 1984).

2.11. Substratos para Fermentação em Larga Escala

Normalmente os meios que são utilizados para crescimento de microrganismos em laboratórios são meios quimicamente definidos. Esses meios contêm concentrações pré estabelecidas de cada grupo de componentes.

No caso de fermentações em escala industrial são realizados grandes esforços no sentido de se obter altos rendimentos em relação à concentração do composto de interesse e barateando, entre outras coisas, o custo do meio de cultivo. Em função disso os ingredientes utilizados são provenientes de matérias primas complexas onde muitos componentes minoritários são desconhecidos.

MILLER & CHURCHILL (1986) discorrem sobre substratos para fermentações em escala industrial, e suas considerações para a produção de antibiótico estão descritas a seguir.

No caso da produção de antibióticos, os meios utilizados para produção diferem dos meios utilizados para os primeiros estágios da fermentação que inclui a obtenção de massa celular. Os estágios de semeadores, onde se visa a obtenção de massa celular, são feitos de maneira que não ocorra falta de nutrientes, autólise celular ou mudança drástica de pH. Como o volume desta fase normalmente corresponde a apenas 5% do volume final do fermentador, as indústrias trabalham com matérias primas com segurança de uniformidade. As matérias primas mais utilizadas para este fim incluem os produtos provenientes da indústria beneficiadora de leite (caseína, lactoalbumina). Outras fontes de proteínas utilizadas incluem as farinhas de soja, algodão, amendoim, milho, cevada, linhaça, arroz ou trigo. Estão incluídos ainda alguns preparados originados do processamento de alimentos de origem animal como farinhas de sangue, peixe ou pena, ou ainda extratos de leveduras.

Normalmente mais de uma fonte de carbono é utilizada nos processos de produção de

antibióticos. Glicose, sacarose, maltose, dextrinas e xilose têm sido utilizados. Alguns óleos também têm sido largamente utilizados, pois são de baixo custo, funcionam como anti-espumante, e podem atuar como protetores de células microbianas frágeis. O uso de óleo, ao contrário da glicose, não inibe a produção de antibióticos. As fontes de óleos mais utilizadas são: soja, palma, açafrão, amendoim ou girassol.

Embora as fontes de nutrientes para a produção industrial devam ser de baixo custo, existem alguns requisitos para que possam ser utilizadas como substrato para fermentação. As fontes de carbono devem ser estáveis e uniformes nos diversos lotes. Nutrientes complexos, como por exemplo as proteínas, devem ser adquiridas na forma de pó, pois podem ser melhor conservados quando comparados às formas líquidas.

Os minerais, embora sejam utilizados em pequenas quantidades, têm papel importante na produção de antibióticos. As matérias primas utilizadas como fonte de proteína ou mesmo carbono, normalmente fornecem parte dos minerais necessários para produção de antibióticos pois, por serem complexas, contêm diversos compostos que normalmente auxiliam no balanço mineral do meio. Até mesmo a água utilizada no preparo do meio, pode fornecer alguns dos minerais necessários.

LIGGET & KOFFLER (1948) relatam que a variação de minerais em lotes de água de maceração de milho (sub produto da fabricação de óleo de milho) pode chegar até 10 vezes. A importância de minerais na produção de antibióticos foi relatada por pesquisadores da UPJOHN Co. que revelam um aumento de 4 vezes na produção de antibióticos apenas com um balanço mineral no meio de cultivo (resultados não publicados citados por MILLER & CHURCHILL, 1986).

2.12. Frascos Agitados como Método para Estudo de Fermentações Industriais

A condução de estudos de fermentação em frascos agitados tem sido uma ferramenta para a otimização de meios para produção de vários produtos, inclusive os antibióticos. Embora esta prática tenha grande utilidade para os estudos, é preciso alguns cuidados para a condução desse tipo de ensaio. CALAM (1986) faz algumas considerações a este respeito que vão ser descritas a seguir.

Os volumes a serem utilizados nos frascos devem ser pequenos, para que o oxigênio possa ter uma dissolução facilitada. O fechamento dos frascos deve ser feito com material homogêneo no que diz respeito à espessura, uma vez que influencia os resultados de frasco para frasco. A agitação e a temperatura devem ser controladas, e não é aconselhável a paralização da agitação por mais que alguns minutos.

A desvantagem da utilização dos frascos está na ausência de controles como pH e alimentação de substrato. No caso de cefalosporina C é reconhecidamente sabido que a prática de alimentação contínua de substrato aumenta a produção desse antibiótico. Em relação à disponibilidade de oxigênio, existem diferenças significativas. Em frascos agitados o oxigênio é dissolvido no meio pela agitação e dessa forma, é absorvido diretamente do ar. No caso de fermentadores a obtenção do oxigênio é feita por injeção de ar, o que aumenta sua disponibilidade. Essa diferença pode muitas vezes, mudar o comportamento da cultura. KOZMA & KARAFFA (1996) utilizaram pérolas de vidro nos frascos Erlenmeyer para eliminar o vortex aumentando assim a interface líquido/ar.

Embora com limitações, a utilização de frascos agitados é uma ferramenta de grande valia para o estudo de otimização de meios, uma vez que permite, em um curto período de tempo avaliar inúmeras combinações de composição do meio de cultivo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo, Manutenção e Propagação da Cultura

O microrganismo utilizado foi o *Cephalosporium acremonium* também denominado *Acremonium chrysogenum*. A linhagem utilizada foi a C - 10, adquirida na forma de cultura congelada junto à Coleção de Culturas Tropical (Fundação Tropical de Pesquisas André Tosello - Campinas; SP). Essa linhagem foi modificada geneticamente a partir da original isolada por BROTZU (ATCC 11550) e segundo SHEN *et al.* (1986) é capaz de produzir 3,6g/l de cefalosporina C sendo procedente da American Type Culture Collection (ATCC 48272) e depositada na coleção pela PANLABS (empresa que trabalha com melhoramento genético de microrganismos de interesse industrial).

A manutenção das características originais da cultura é um fator de relevante importância, uma vez que estão normalmente associadas à produção do composto de interesse. É sabido que a repicagem sucessiva de qualquer microrganismo é prejudicial no que se refere à estabilidade das propriedades da cultura. Em função disto foi adotado o armazenamento de microrganismo, suficiente para a realização de todo o trabalho, a partir de um lote único da cultura a partir do crescimento do *C. acremonium* em meio de SHEN *et al.* (1986) modificado, o qual está descrito na Tabela 1. As condições de incubação foram: frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 20 ml de meio em temperatura de 28 °C ± 1, sob agitação de 250 rpm ± 5 por 72 horas.

A seguir foi adicionado aos frascos, contendo a cultura cultivada, uma solução de glicerol 40% (crioprotetor) de modo que sua concentração final na mistura fosse 20%. A mistura foi distribuída em criotubos de capacidade de 3,6 ml e imediatamente congelados em solução de gelo seco e álcool e armazenada a -18°C ± 2.

Embora aumente o risco da redução da viabilidade da cultura nos ensaios optou-se por

trabalhar com as culturas congeladas, uma vez que existe a garantia de que a linhagem mantém suas características.

Para se obter inóculo (semeador) para os ensaios a serem realizados foram utilizados criotubos do lote de cultura congelada. O criotubo foi descongelado e foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250ml contendo 20 ml de meio (Tabela 1). As condições de incubação foram: 28 °C \pm 1, sob agitação de 250 rpm \pm 5 por 72 horas.

Esse procedimento de obtenção do semeador foi utilizado para todos os testes. A quantidade de inóculo utilizada foi sempre de 10% em relação ao volume de meio a ser fermentado. Para que a quantidade de fungo semeado fosse a mesma para todos os frascos Erlenmeyer, as culturas de inóculo (semeador), preparadas para cada experimento, foram homogeneizadas em um único frasco.

Alguns cuidados quanto à padronização dos ensaios foram tomadas. Em relação à variação de entrada de oxigênio nos frascos fez-se a substituição do “rodilhão” de algodão por lâmina (Lamino® Padding roll) de algodão coberta por papel não absorvente para o fechamento de todos os frascos.

Tabela 1 - Meio de cultivo utilizado para produção do lote de cultura congeladas e do inóculo (semeador).

Ingredientes	g/l
Glicose	25,00
Extrato de levedura	5,00
Extrato de carne	3,00
Triptona	10,00
K ₂ HPO ₄	1,00
KH ₂ PO ₄	1,00
Solução de sais*	10,00
Solução de sais*	
Cloreto de cobalto	0,02
Sulfato de ferro	1,50
Sulfato de zinco	0,20
Sulfato de manganês	0,20

3.2. Métodos Analíticos

3.2.1. Análise de Cefalosporina C

As análises da concentração da cefalosporina C foram conduzidas por cromatografia líquida de alta pressão utilizando os seguintes acessórios e condições operacionais:

Bomba HP série 1050;

Injetor Rheodyne 20 μ l;

Coluna Brownlee C18 250 x 4,6mm x 5 μ ;

Eluente: Tampão 1,36% de KH₂PO₄, pH 6,0 com KOH/ CH₃CN: 100/3;

Vazão: 1ml/min;

Detector UV Waters 484, λ = 254nm, sensibilidade = 0,002 AUFS;

Integrador HP 3396 A, at = 2², cs = 0,2, PW = 0,16.

Os resultados foram calculados utilizando curva de calibração previamente construída a partir de padrão de cefalosporina C na forma de sal de potássio (90% de pureza).

3.2.2. Análise de Açúcares - Glicose, Frutose e Sacarose

As análises de glicose, frutose e sacarose foram conduzidas por cromatografia líquida de alta pressão utilizando um equipamento Dionex Dx - 50 utilizando os seguintes acessórios e condições operacionais:

Coluna CarboPac PA1 (250x 4 mm) com pré coluna (4x50 mm);

Eluente : 150 mM NaOH;

Vazão : 1ml/min;

Detector: Amperométrico;

Integrador Dionex at = 128 , cs = 0,5, PW = 6;

Solvente : Água.

Os resultados foram calculados utilizando curva de calibração previamente construída a partir de padrão de glicose, frutose e sacarose.

Devido ao fato de aparecer em algumas matérias primas testadas um interferente no pico da sacarose, as análises dos açúcares foram feitas em duas etapas. Na primeira foi dosada a glicose presente no caldo fermentado. A partir disto as amostras foram hidrolisadas utilizando-se invertase (Invertina - Merck, em concentração final de 1 g/l) por 1 hora a 50 °C. Com as amostras totalmente invertidas, contendo apenas glicose e frutose, foi feita nova dosagem para esses açúcares. O valor da sacarose foi calculado pela diferença do total de glicose inicial com a quantidade de frutose e glicose obtida para a segunda injeção.

3.2.3. Análise de Massa Celular Produzida

A análise da massa celular produzida foi feita como descrito a seguir. Aliquotas de 10 ml do fermentado foram filtradas em funil de Buchner sob vácuo, em papel de filtro WHATMAN n° 5 previamente tarado . O papel de filtro foi seco em estufa à temperatura de 80 °C ± 5 até o peso permanecer constante (cerca de 10 horas).

3.2.4. Medida do pH do Meio de Cultivo

As medidas do pH do meio de fermentação foram medidas em potenciômetro.

3.3. Delineamento Experimental

3.3.1. Seleção de Matérias Primas

3.3.1.1. Matérias Primas Testadas Isoladamente

As matérias primas utilizadas foram fornecidas pela QUEST INTERNACIONAL - Divisão SHEFFIELD, empresa americana que as produz para o uso como substrato de fermentações industriais. Para serem utilizadas em escala industrial, esses substratos, são de uma maneira geral, complexos protéicos de baixo custo que mantêm uma padronização no que diz respeito à sua composição, uma vez que os processos que envolvem microrganismos são sensíveis a micro variações.

As Tabelas 2 e 3 mostram, respectivamente, as características químicas e distribuição de aminoácidos nas matérias primas testadas. Esses dados foram fornecidos pelo fabricante.

O meio de fermentação adotado, denominado meio basal, foi baseado no meio descrito por DEMAIN *et al.* (1963) cuja composição está mostrada na Tabela 4, onde as fontes originais de nitrogênio foram substituídas pelas matérias primas testadas.

As fontes de proteínas testadas como substrato para fermentação foram adicionadas isoladamente ao meio basal nas concentrações de 4g/l de nitrogênio total, o que representa a faixa normalmente utilizada nas fermentações industriais. O cálculo da quantidade de matéria prima a ser introduzida foi feita em função da quantidade de nitrogênio total de cada substrato. A Tabela 5 mostra essas quantidades para cada uma das matérias primas.

O ensaio foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 250 ml com 50ml de meio de cultivo. O inóculo foi obtido segundo 3.1. As condições de incubação foram 28 °C ± 1, sob

agitação de 250 rpm \pm 5 por 96 horas.

Amostras em duplicata foram coletadas com 72 e 96 horas de fermentação, uma vez que, segundo SHEN *et al.* (1984), a produção de cefalosporina C pode se prolongar até 100 horas em processos conduzidos em batelada. As análises realizadas no caldo fermentado, para controle do experimento, compreenderam a determinação da cefalosporina C, massa celular, sacarose e pH. Entre os açúcares apenas a sacarose foi analisada no tempo 96 horas, uma vez que o esgotamento desse açúcar está associado ao final da produção de cefalosporina C.

Tabela 2 - Composição das matérias primas

Matéria Prima	<i>Hy-Soy</i>	<i>Edamin'S</i>	<i>N-Z Amine A</i>	<i>N-Z Amine AS</i>	<i>Hydrolyze Corn Gluten</i>	<i>Hydrolyze Cottonseed</i>
Origem	Soja	Lacto albumina	Caseína	Caseína	Milho	Algodão
N Total (%)	9,50	12,40	13,10	13,00	10,10	8,70
N Amínico(%)	1,90	6,90	6,50	6,50	2,60	2,90
pH	7,30	6,50	6,60	6,70	6,00	6,30
Umidade (%)	2,80	3,50	3,40	3,50	3,00	3,40
Sódio (%)	2,70	0,73	2,41	2,49	10,70	8,50
Potássio (%)	3,00	0,89	0,09	0,08	0,11	1,29
Cálcio (%)	0,20	0,67	0,02	0,04	0,25	0,25
Magnésio (%)	0,25	0,03	0,02	0,02	0,04	0,47
Cloretos (%)	2,72	0,58	1,02	0,99	1,03	2,11
Sulfatos (%)	0,36	0,09	0,08	0,06	0,11	0,18
Fosfatos (%)	0,74	1,11	2,27	2,85	0,28	0,16

Tabela 3 - Distribuição dos aminoácidos nas matérias primas

Aminoácidos (mg/g)	<i>Hy-Soy</i>	<i>Edamin'S</i>	<i>N-Z Amine A</i>	<i>N-Z Amine AS</i>	<i>Hydrolyze Corn Gluten</i>	<i>Hydrolyze Cottonseed</i>
Alanina	22,9	50,7	30,1	28,5	52,6	24,6
Arginina	50,0	26,0	31,3	31,9	20,6	68,0
Ác. Aspártico	76,2	84,5	67,4	66,7	27,1	61,4
Cisteína	6,1	21,9	3,0	3,1	2,7	2,4
Ác. Glutâmico	126,5	159,8	185,8	180,0	117,4	112,1
Glicina	23,7	25,3	18,9	18,2	17,5	27,1
Histidina	13,9	14,5	22,2	24,0	13,0	15,7
Isoleucina	26,0	51,0	43,6	47,4	26,0	18,4
Leucina	42,6	100,6	74,6	77,0	94,8	32,2
Lisina	36,7	75,3	67,7	69,8	11,8	26,2
Fenilalanina	25,5	35,3	39,8	41,2	34,2	30,0
Metionina	10,4	23,9	27,2	24,6	11,5	8,2
Prolina	31,5	34,0	88,4	90,8	57,5	21,2
Serina	30,8	43,4	51,4	51,0	28,3	25,5
Treonina	25,0	45,3	41,8	39,0	18,9	19,2
Triptofano	6,2	14,2	9,8	10,3	3,0	5,9
Tirosina	18,2	7,3	28,2	13,2	29,0	16,3
Valina	25,6	50,2	59,0	60,2	28,4	28,7

Tabela 4 - Meio basal para fermentação

INGREDIENTE	g/l
Sacarose	36,00
Glicose	27,00
Óleo de soja	1,50
KH_2PO_4	1,08
Carbonato de cálcio	2,00
Sulfato ferroso	0,16
K_2HPO_4	2,97
Solução de sais*	50,00
Solução de sais*	
Na_2SO_4	15,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,20
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,80
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,08
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,60
CuSO_4	0,04

Tabela 5 - Quantidade de cada matéria prima utilizada para obtenção de 4 g/l de nitrogênio total no meio basal de fermentação.

Matéria Prima	g/l
Hy-Soy	42,0
Edamin'S	32,0
N-Z Amine A	30,0
N-Z Amine AS	30,0
Hydrolyse Corn Gluten	40,0
Hydrolyse Cottonseed	46,0

3.3.1.2. Cinética da Produção de Cefalosporina C

Os resultados do item 3.3.1.1. mostraram que o tempo de 96 horas de fermentação não foi suficiente para a máxima produção de cefalosporina C, uma vez que a presença de sacarose foi detectada em todos os tratamentos no final da fermentação (96 horas).

Em função dos resultados obtidos optou-se por estudar a cinética de produção de cefalosporina C, para conhecimento do momento ideal de término da fermentação.

Foram avaliadas para isto duas das matérias primas, a que apresentou maior produção de cefalosporina C (Hy-Soy) e a que apresentou a menor produção deste antibiótico (N-Z Amine A).

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 ml com 50 ml de meio basal acrescido de 4 g/l de N Total para cada um dos dois substratos testados. O inóculo foi obtido como descrito no item 3.1. As condições de incubação foram 28 °C ± 1 sob agitação de 250 rpm ± 5 por 216 horas.

Amostras em duplicatas foram coletados com 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 horas horas de fermentação. As análises para o controle no caldo fermentado envolveram a determinação de cefalosporina C, massa celular, glicose, frutose, sacarose e pH.



3.3.1.3. Matérias Primas Testadas em Associação

Como os melhores níveis de cefalosporina C foram obtidos com o uso de Hy-Soy, optou-se por testar um outro produto originário de soja. O Samprosoy é um produto também a base de soja, utilizado na indústria de alimentos, disponível no mercado brasileiro na forma de extrato protéico padronizado fabricado pela SANTISTA ALIMENTOS - Divisão SAMBRA. O terceiro produto selecionado para teste foi o Edamin'S que ao lado do Hy-Soy, propiciou a obtenção de níveis mais elevados de cefalosporina C. Na Tabela 6 são apresentadas as características do Samprosoy, Hy-Soy e Edamin'S para efeito de comparação.

O ensaio foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 250 ml com 50 ml de meio basal acrescido de 4 g/l de N Total para cada um dos meios compostos. A Tabela 7 mostra as quantidades de matéria prima e nitrogênio adicionados em cada um dos meios testados.

O inóculo foi obtido segundo 3.1. As condições de incubação foram $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, sob agitação de $250\text{ rpm} \pm 5$ por 216 horas.

Em vista dos resultados do experimento anterior foram planejadas amostragem em diferentes tempos para localização do ponto máximo de produção de cefalosporina C para cada um dos tratamentos estudados. Amostras em duplicatas foram coletados com 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 horas de fermentação. As análises realizadas para o controle da fermentação consistiram na determinação de cefalosporina C, massa celular, glicose, frutose, sacarose e pH.

Tabela 6 - Composição em nitrogênio total (%) e aminoácidos (mg/g) do Samprosoy em comparação com as outras matérias primas utilizadas para a seleção do meio de fermentação.

<i>Matéria Prima</i>	<i>Samprosoy</i>	<i>Hy-Soy</i>	<i>Edamin'S</i>
ORIGEM	Soja	Soja	Lacto albumina
N Total (%)	14,72	9,50	12,40
Aminoácidos(mg/g)			
Alanina	37,00	22,90	50,70
Arginina	71,00	50,00	26,00
Ac. Aspártico	107,00	76,20	84,50
Cisteína	12,00	6,10	21,90
Ac. Glutâmico	180,00	126,50	159,80
Glicina	0,00	23,70	25,30
Histidina	24,00	13,90	14,50
Isoleucina	38,00	26,00	51,00
Leucina	69,00	42,60	100,60
Lisina	57,00	36,70	75,30
Fenilalanina	48,00	25,50	35,30
Metionina	12,00	10,40	23,90
Prolina	47,00	31,50	34,00
Serina	50,00	30,80	43,40
Treonina	32,00	25,00	45,30
Triptofano	9,00	6,20	14,20
Tirosina	36,00	18,20	7,30
Valina	40,00	25,60	50,20

Tabela 7 - Composição dos meios de fermentação de cada tratamento do experimento com associação de matérias primas, em quantidade equivalente de cada uma das matérias primas.

	<i>N Total (g/l)</i>			<i>Matéria Prima (g/l)</i>		
	<i>Samprosoy</i>	<i>Hy-Soy</i>	<i>Edamin'S</i>	<i>Samprosoy</i>	<i>Hy-Soy</i>	<i>Edamin'S</i>
<i>T1</i>	0,00	4,00	0,00	0,00	42,00	0,00
<i>T2</i>	4,00	0,00	0,00	27,00	0,00	0,00
<i>T3</i>	0,00	0,00	4,00	0,00	0,00	32,00
<i>T4</i>	2,00	2,00	0,00	13,50	21,00	0,00
<i>T5</i>	2,00	0,00	2,00	13,50	0,00	16,00
<i>T6</i>	0,00	2,00	2,00	0,00	21,00	16,00
<i>T7</i>	1,33	1,33	1,33	9,00	14,00	10,60

3.3.2. Otimização do Meio de Cultivo

Após a seleção do meio de cultivo foi feito o estudo da otimização do mesmo utilizando como ferramenta o planejamento fatorial completo para três variáveis. Foi realizado um planejamento 2^3 (8 ensaios) para determinação dos efeitos das variáveis e da verificação de um modelo de 1º ordem, 3 pontos centrais para determinação do erro puro e mais seis ensaios nos pontos axiais para ajuste de um modelo quadrático no caso da 1º ordem não ser estatisticamente válido, totalizando 16 ensaios. O ponto central adotado foi o meio T7 selecionado no item 3.3.1.3.

As variáveis estudadas foram concentração de sacarose, concentração de glicose e concentração de nitrogênio total no meio fermentativo. A variável resposta foi a concentração de cefalosporina C. A Tabela 8 apresenta os níveis estudados para cada uma das variáveis, assim como seus valores em concentração.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 ml de capacidade com 50 ml de meio de cultivo. O inóculo foi obtido segundo item 3.1. As condições de incubação foram em shaker a $28\text{ °C} \pm 1$, sob agitação de $250\text{ rpm} \pm 5$ por 168 horas.

Amostras foram coletadas com 144 horas e 168 de fermentação. As análises realizadas para o controle da fermentação envolveram a determinação de cefalosporina C, que é a variável resposta do ensaio.

Tabela 8 - Níveis estudados, com suas respectivas concentrações (g/l), para glicose, sacarose glicose e nitrogênio utilizados no estudo de otimização.

<i>Tratamentos</i>	<i>Níveis</i>			<i>g/l</i>		
	<i>Glicose</i>	<i>Sacarose</i>	<i>Nitrogênio</i>	<i>Glicose</i>	<i>Sacarose</i>	<i>Nitrogênio</i>
1	-1	-1	-1	17	26	2
2	-1	-1	+1	17	26	6
3	-1	+1	-1	17	46	2
4	-1	+1	+1	17	46	6
5	+1	-1	-1	37	26	2
6	+1	-1	+1	37	26	6
7	+1	+1	-1	37	46	2
8	+1	+1	+1	37	46	6
9	-1,68	0	0	10	36	4
10	+1,68	0	0	44	36	4
11	0	-1,68	0	27	19	4
12	0	+1,68	0	27	53	4
13	0	0	-1,68	27	36	0,6
14	0	0	+1,68	27	36	7,4
15*	0	0	0	27	36	4
16*	0	0	0	27	36	4

* Ponto central

Foi realizado ainda uma segunda etapa na otimização do meio de cultivo uma vez que na primeira fase não obteve-se o ponto de máxima produção de cefalosporina C. O planejamento foi montado da mesma maneira que a primeira fase, apenas com deslocamento do ponto central. A Tabela 9 apresenta os níveis estudados para cada uma das variáveis, assim como seus valores em concentração para essa segunda etapa.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 ml de capacidade com 50 ml de meio de cultivo. O inóculo foi obtido segundo item 3.1. As condições de incubação foram em shaker a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, sob agitação de $250\text{ rpm} \pm 5$ por 168 horas.

Amostras foram coletadas com 144 horas e 168 de fermentação. As análises realizadas para o controle da fermentação envolveram a determinação de cefalosporina C, que é a variável resposta do ensaio.

Tabela 9 - Níveis estudados, com suas respectivas concentrações (g/l), para glicose, sacarose glicose e nitrogênio utilizados no estudo de otimização (segunda etapa).

<i>Tratamentos</i>	<i>Níveis</i>			<i>g/l</i>		
	<i>Glicose</i>	<i>Sacarose</i>	<i>Nitrogênio</i>	<i>Glicose</i>	<i>Sacarose</i>	<i>Nitrogênio</i>
1	-1	-1	-1	27	16	4
2	-1	-1	+1	27	16	8
3	-1	+1	-1	27	36	4
4	-1	+1	+1	27	36	8
5	+1	-1	-1	47	16	4
6	+1	-1	+1	47	16	8
7	+1	+1	-1	47	36	4
8	+1	+1	+1	47	36	8
9	-1,68	0	0	20	26	6
10	+1,68	0	0	54	26	6
11	0	-1,68	0	37	9	6
12	0	+1,68	0	37	43	6
13	0	0	-1,68	37	26	2,6
14	0	0	+1,68	37	26	9,4
15*	0	0	0	37	26	6
16*	0	0	0	37	26	6

* Ponto Central

3.3.3. Escalonamento

Este procedimento permite a comparação da produção de cefalosporina C em fermentador piloto com aquela obtida em frascos agitados.

No fermentador é possível controlar, o oxigênio dissolvido, entre outros parâmetros como alimentação, pH, etc. O fornecimento de oxigênio em fermentadores pode se controlado, permitindo o fornecimento de maneira a suprir sua necessidade em cada fase do processo.

No caso de fermentações conduzidas em frascos agitados o fornecimento do oxigênio é feito pelo movimento da agitação. Esta forma de absorção restringe esse fornecimento que é um fator limitante na produção de cefalosporina C.

Para condução dos testes de escalonamento foi utilizada a técnica de “fermentação cruzada”. Isto significa a fermentação de um mesmo meio de cultivo em fermentador e em frascos agitados. O meio foi preparado (incluindo a esterilização) assim como inoculado no fermentador. Parte do meio já inoculado foi retirado e distribuído em frascos Erlenmeyer. A partir disto os frascos são incubados em “shaker”. Amostras foram retiradas do fermentador e dos frascos nos mesmos intervalos de tempo e analisadas em relação aos parâmetros a serem avaliados.

O fermentador utilizado foi um modelo com agitação mecânica, da NEW BRUNSWICK, com capacidade de 30 litros, e mult loop 4100.

O meio de cultivo para o escalonamento requer o preparo de no mínimo 15 litros do mesmo, volume este que permite a operação adequada do fermentador. Para a condução do experimento teve-se que optar por um meio que fosse formulado com as matérias primas disponíveis nas quantidades requeridas, que foram o Samprosoy e o Edamin'S. A primeira por estar disponível no mercado nacional e a segunda por ter sido

gentilmente cedida pela Pfizer Farmacêutica.

A escolha do meio de cultivo foi feita em função dos resultados obtidos em 3.3.1.3. que apontaram, entre os meios passíveis de serem formulados, o meio T5. A composição deste meio está descrito na Tabela 10.

Tabela 10 - Composição do meio de cultivo utilizado na "fermentação cruzada" (T5).

INGREDIENTE	g/l
Sacarose	36,00
Glicose	27,00
Samprosoy	13,50
Edamin'S	16,00
Óleo de soja	1,50
KH_2Po_4	1,08
Carbonato De Cálcio	2,00
Sulfato Ferroso	0,16
K_2HPO_4	2,97
Solução De Sais*	50,00
SOLUÇÃO DE SAIS*	
Na_2SO_4	15,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,20
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,80
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,08
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,60
CuSO_4	0,04

O meio de cultivo foi preparado em volume igual a 15 litros no fermentador. A obtenção do inóculo (10% em relação ao volume de meio), foi feito em duas etapas, em função do grande volume necessário. A primeira etapa foi conduzida da mesma maneira descrita no item 3.1. A partir disto alíquotas de 10 ml de inóculo foram transferidas para 15 frascos Erlenmeyer de 500ml contendo 100ml do mesmo meio de cultivo. As condições de incubação foram $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, sob agitação de $250\text{ rpm} \pm$ por 72 horas em "shaker".

A partir da obtenção do inóculo (1,5 l), este foi transferido assepticamente ao fermentador o qual já continha o meio preparado e esterilizado no próprio. Após a inoculação foi retirado uma parcela (500 ml) deste meio e transferido assepticamente para frascos Erlenmeyer de 250 ml, em volume de 50 ml cada.

As condições de operação do fermentador foram de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, com ausência de ajuste de pH. O oxigênio dissolvido foi mantido acima de 50%, garantido pela vazão de ar injetado pelo controlador.

As condições de operação do "shaker" foram de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, sob agitação de $250\text{ rpm} \pm 5$.

Frascos e amostras do fermentador foram coletadas desde 0 horas de fermentação em intervalos de 24 horas até que a produção de cefalosporina C cessasse.

As análises realizadas para o controle da fermentação consistiram na determinação de cefalosporina C, massa celular, glicose, frutose, sacarose e pH.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Matérias Primas Testadas Isoladamente

Os ensaios de fermentação foram conduzidos com seis diferentes fontes de proteínas para a investigação da produção de cefalosporina C, massa celular nos tempos 72 e 96 horas e consumo de sacarose no tempo 96 horas.

Os resultados obtidos neste ensaio estão mostrados na Tabela 11. Pode ser observado que Hy-soy foi a matéria prima que produziu o mais elevado teor de cefalosporina C (0,63 g/l), apontando para a presença de nutrientes estimuladores e atuantes nos mecanismos da biossíntese deste antibiótico. Com uma produção de 0,43 g/l vem a seguir a matéria prima Edamin'S. Os valores obtidos para as outras matérias primas são mais baixos com pequena variação de uma para a outra.

A associação em relação à massa celular e cefalosporina C produzida, tem sido feita por muitos pesquisadores. ZHOU *et al.* (1992) acreditam que exista uma estreita relação entre esses dois parâmetros. Pelos resultados da Tabela 9 nota-se que o Hy-Soy foi a matéria prima que permitiu uma maior concentração celular associada a maior concentração de cefalosporina C. As matérias primas que apresentaram menores valores de massa celular, foram as mesmas que apresentaram baixos rendimentos em cefalosporina C. As massas celulares obtidas para Hydrolyse Corn Gluten e Hydrolyse Cottonseed foram desconsideradas pela insolubilidade destas no meio de cultivo.

Vários autores relatam que a metionina é estimuladora da produção de cefalosporina C (CALTRIDER & NISS, 1966; CALTRIDER, *et al.*, 1968; DREW & DEMAINE, 1973; MATSUMARA, *et al.*, 1978; MATSUMARA, *et al.*^(a), 1980). No caso deste ensaio o meio formulado com N-Z Amine A foi o que apresentou uma maior concentração desse

aminoácido (816 mg/l). Entretanto esta não foi a matéria prima que apresentou o melhor rendimento em cefalosporina C, sendo o meio formulado com Hy-Soy, que continha 416 mg/l deste aminoácido, o responsável por uma maior concentração do antibiótico. Apesar da afirmação dos pesquisadores em relação à metionina como estimuladora da produção de cefalosporina C, os trabalhos dizem respeito a esse aminoácido na forma livre, o que não corresponde à sua forma nos meios complexos formulados neste trabalho. Os meios complexos além de conterem nutrientes que não são caracterizados, que muitas vezes podem possuir características que estimulem a produção de cefalosporina C, apresentam os aminoácidos não na forma livre mas sim como constituinte de proteína.

Tabela 11 - Resultados de cefalosporina C, massa celular e sacarose, no caldo fermentado obtidos para todas as matérias-primas testadas com 72 e 96 horas de fermentação.

Matéria - Prima	Cefalosporina C (g/l)		Massa Celular (g/l)		Sacarose (g/l)
	72 h	96 h	72 h	96 h	96 h
Hy-Soy	0,21	0,63	35,9	37,2	29,9
Edamin'S	0,11	0,43	21,3	26,7	35,2
N-Z Amine A	0,08	0,20	13,7	23,0	36,1
N-Z Amine AS	n.d	0,24	19,6	23,1	35,8
Hydrolyse Corn Gluten	0,07	0,21	(1)	(1)	36,0
Hydrolyse Cottonsed	0,19	0,22	(1)	(1)	36,0

(1) Resultados desconsiderados devido a insolubilidade das matérias primas no meio de cultivo.

As altas concentrações de sacarose observadas para todos os tratamentos indicam que o tempo de fermentação utilizado foi insuficiente para que esse açúcar fosse totalmente consumido, indicando que uma maior concentração de cefalosporina C poderia ser obtida. Levando-se em consideração o rendimento e produtividade, optou-se antes de continuar os ensaios, avaliar se o tempo de fermentação estendido modificaria o comportamento das matérias primas estudadas. Para isso foram selecionadas as matérias primas que apresentaram a mais baixa e a mais alta performance quanto à produção de cefalosporina C. As duas selecionadas foram Hy-Soy e N-Z Amine A.

4. 2. Cinética de Produção da Cefalosporina C

Dois ensaios de fermentação conduzidos um com Hy-Soy e outro com N-Z Amine A, como fontes de proteína, foram monitorados a partir da 72 até 216 horas, em intervalos regulares de 24 horas, com determinação de cefalosporina C, massa celular, sacarose, glicose, frutose e pH. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

Os dados referentes à produção de cefalosporina C mostram que a matéria prima Hy-Soy foi a responsável por uma maior produção do antibiótico (0,93 g/l) em um menor tempo (144 horas).

Os dados de produção de cefalosporina C, consumo de açúcares e evolução da massa celular, estão mostrados na forma gráfica nas Figuras 4 e 5 para Hy-Soy e N-Z Amine A, respectivamente.

Embora com um rendimento menor em relação à cefalosporina C produzida, associado a um maior tempo para o pico de produção do antibiótico, o comportamento da fermentação para a N-Z Amine A manteve-se similar à fermentação conduzida com Hy-Soy. O consumo de açúcares mostra o fenômeno de diauxia, isto é, nas primeiras horas de fermentação a glicose é totalmente consumida; após a depleção deste açúcar tem início o consumo da sacarose. A fase de crescimento celular está associada ao consumo da glicose, e confirma-se a estreita relação entre a massa celular obtida e a produção de cefalosporina C, discutida por ZHOU *et al.* (1992). A matéria prima Hy-Soy além de apresentar maiores concentrações do antibiótico, foi também responsável pela maior concentração celular.

Tabela 12 - Resultados para cefalosporina C, massa celular, sacarose, glicose frutose e pH, no caldo de fermentação, nos diferentes tempos, em meio de cultivo formulado com Hy-Soy.

TEMPO (horas)	Cefalosporina C (g/l)	Massa Celular (g/l)	Sacarose (g/l)	Glicose (g/l)	Frutose (g/l)	pH
72	0,01	11,7	34,9	11,7	2,2	6,5
96	0,18	28,1	34,8	nd	2,4	6,6
120	0,60	32,7	26,3	nd	0,8	7,9
144	0,93	35,0	15,6	nd	0,5	8,0
168	0,80	35,8	nd	nd	0,9	8,3
192	0,39	32,2	nd	nd	0,9	8,6
216	0,39	28,2	nd	nd	0,9	8,7

nd - não detectado

Tabela 13 - Resultados para cefalosporina C, massa celular, sacarose, glicose frutose e pH no caldo de fermentação, nos diferentes tempos, em meio de cultivo formulado com N-Z Amine A.

TEMPO (horas)	Cefalosporina C (g/l)	Massa Celular (g/l)	Sacarose (g/l)	Glicose (g/l)	Frutose (g/l)	pH
72	0,06	10,7	33,0	14,6	1,8	6,0
96	0,12	20,0	31,0	6,2	2	5,6
120	0,34	24,8	26,0	nd	nd	6,1
144	0,57	25,9	17,7	nd	nd	6,6
168	0,62	26,1	6,2	nd	nd	6,9
192	0,64	25,6	2,2	nd	nd	6,9
216	0,11	25,0	nd	nd	nd	8,0

nd - não detectado

Embora a glicose tenha efeito inibidor na produção de cefalosporina C, a partir de 72 horas já foi observada a presença do antibiótico no caldo em fermentação, para os dois meios estudados. Esse comportamento foi explicado por SHEN *et al.* (1986) que atribuem à glicose um efeito menos repressor, no que diz respeito à produção do antibiótico, na linhagem (C-10) utilizada neste trabalho. Foram necessárias 120 horas para que toda a glicose fosse consumida quando crescida no meio formulado com N-Z Amine A. Para o meio feito com Hy-Soy 96 horas foram suficientes para o esgotamento total da glicose.

Para ambas as matérias primas, o consumo da sacarose é mais lento quando comparado à glicose estando esse consumo associado a produção de cefalosporina C. A frutose detectada no meio de fermentação pode ser proveniente da hidrólise da sacarose ou mesmo da isomerização da glicose. Os pontos de máxima produção de cefalosporina C coincidem com o esgotamento da sacarose. A partir desse ponto inicia-se a degradação da cefalosporina C. A estabilidade da cefalosporina C no caldo de fermentação tem sido estudada por muitos autores. USHER *et al.* (1988) reportam que a cefalosporina C em caldo de fermentação é instável e, sua taxa de degradação a 25°C é de 0,48% por hora. Essa degradação pode ser enzimática ou química. Esses autores citam que a ação química tem maior peso que a enzimática. A Figura 6 mostra os cromatogramas das análises de cefalosporina C para a maior concentração obtida nos dois tratamentos (192 horas para N-Z Amine A e 144 horas para Hy-Soy) e o ponto onde a cefalosporina C começou a ser degradada (216 horas para N-Z Amine A e 192 horas para Hy-Soy). Os cromatogramas onde a cefalosporina C começa a ser degradada (Figura 6) mostram o aumento da formação de um outro produto (tempo de retenção = 9,41 minutos). Este produto não foi identificado, mas alguns pesquisadores têm mostrado a presença de ácido 2 -D-4 amino-4 carboxibutil tiazole - 4 - carboxílico como produto da decomposição da cefalosporina C.

O pH mais elevado do meio de cultivo formulado com Hy-Soy no final da fermentação pode estar associado a uma maior autólise celular proveniente dos maiores valores de cefalosporina C encontradas neste caldo.

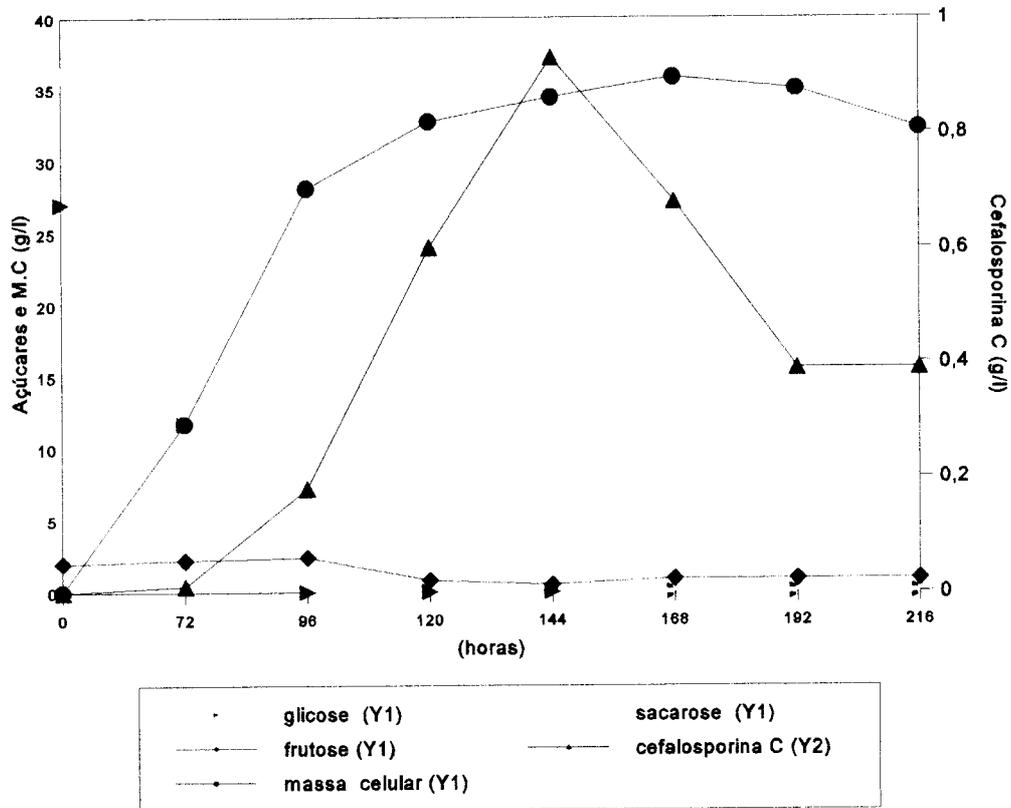


Figura 4 - Perfis de concentração em g/l de glicose, sacarose, frutose, cefalosporina C e massa celular em função do tempo para o meio de cultivo formulado com Hy-Soy.

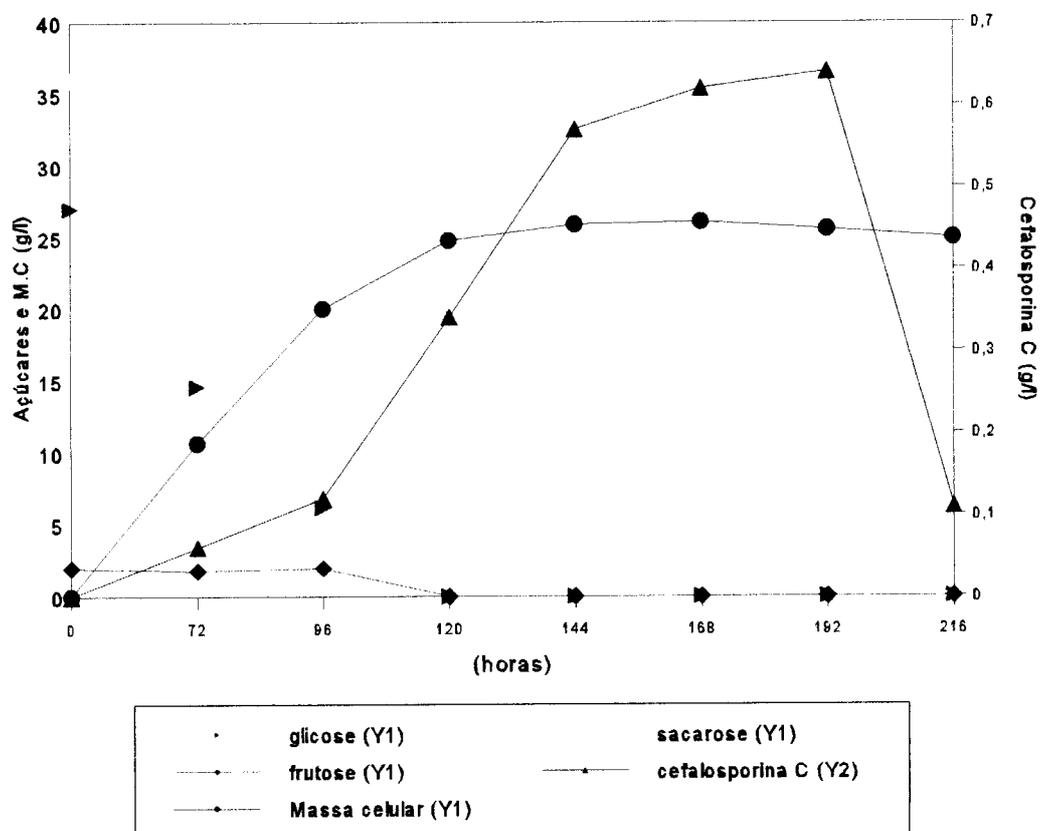


Figura 5 - Perfis de concentração em g/l de glicose, sacarose frutose, cefalosporina C e massa celular, em função do tempo para o meio de cultivo formulado com N-Z Amine.

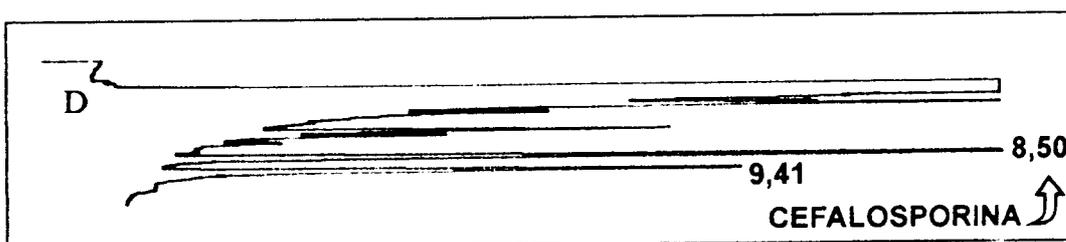
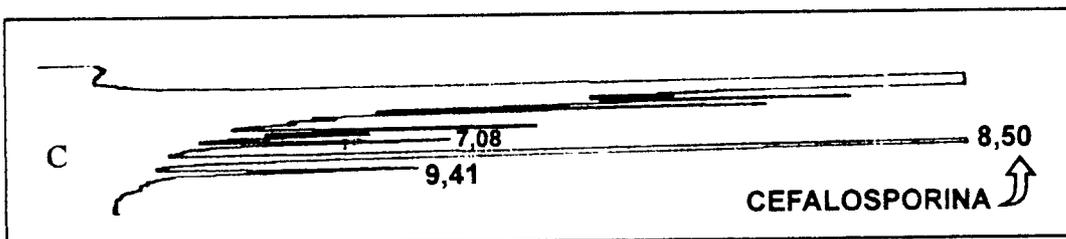
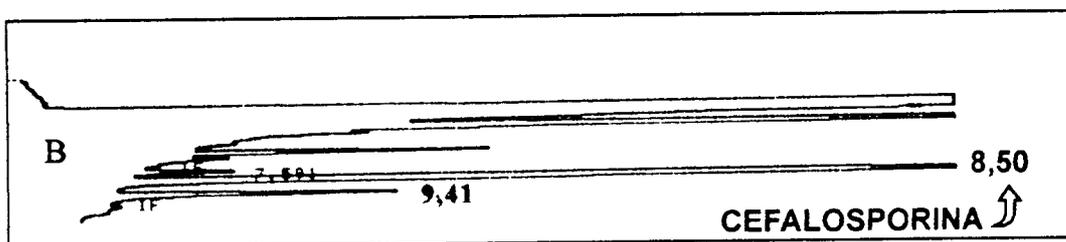
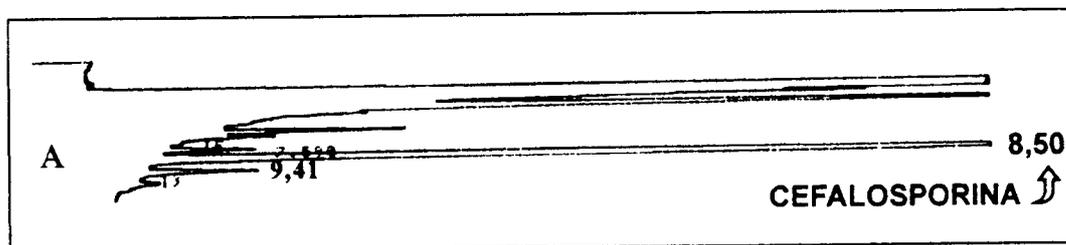


Figura 6 - Cromatograma com os tempos de retenção para: (A) Hy-Soy com 144 horas de fermentação; (B) Hy-Soy com 168 horas de fermentação, (C) N-Z Amine A com 192 horas de fermentação e (D) N-Z Amine A com 216 horas de fermentação.

4.3. Matérias Primas Testadas em Associação

Sete diferentes ensaios de fermentação utilizando meios de cultivo preparados a partir da associação de Hy-Soy, N-Z Amine A e Samprosoy como fontes de proteína, foram monitorados a partir de 72 até 216 horas em intervalos regulares de 24 horas, com determinação de cefalosporina C, massa celular, sacarose, glicose, frutose e pH. A composição dos meios esta descrito na Tabela 7.

Os resultados obtidos para todos os tratamentos se encontram nas Tabelas 14 a 20.

Tabela 14- Resultados para cefalosporina C, massa celular, glicose e frutose e pH, para fermentação nos diferentes tempos, em meio de cultivo T1 (4,20% de Hy-Soy).

TEMPO (horas)	Cefalosporina C (g/l)	Massa Celular (g/l)	Sacarose (g/l)	Glicose (g/l)	Frutose (g/l)	pH
72	0,05	11,37	35,86	17,75	2,65	6,75
96	0,42	31,54	35,92	0,58	nd	7,11
120	0,84	43,03	35,83	0,51	nd	8,54
144	1,00	50,31	28,80	0,05	nd	8,38
168	0,40	51,65	0,05	0,12	nd	8,90
192	0,50	52,22	nd	0,16	nd	8,84

nd - não detectado

Tabela 15 - Resultados para cefalosporina C, massa celular, glicose e frutose e pH, para fermentação nos diferentes tempos, em meio de cultivo T2 (2,70% de Samprosoy)

TEMPO (horas)	Cefalosporina C (g/l)	Massa Celular (g/l)	Sacarose (g/l)	Glicose (g/l)	Frutose (g/l)	pH
72	0,17	16,55	33,25	27,75	1,04	6,27
96	0,36	38,87	35,00	0,51	4,80	6,66
120	0,74	43,66	23,40	0,22	0,23	7,36
144	0,73	50,22	0,43	0,07	0,06	7,63
168	0,72	50,48	0,17	0,75	nd	8,26
192	0,16	31,02	0,75	0,23	0,13	9,09

nd - não detectado

Tabela 16 - Resultados para cefalosporina C, massa celular, glicose e frutose e pH, para fermentação nos diferentes tempos, em meio de cultivo T3 (3,20% de Edamin'S)

TEMPO (horas)	Cefalosporina C (g/l)	Massa Celular (g/l)	Sacarose (g/l)	Glicose (g/l)	Frutose (g/l)	pH
72	0,04	12,46	34,75	17,75	4,65	6,21
96	0,04	11,70	32,50	17,65	5,05	6,34
120	0,08	17,48	30,70	3,72	4,17	6,95
144	0,17	24,99	32,50	0,40	0,26	7,28
168	0,24	29,89	30,60	0,30	0,15	7,13
192	0,05	27,85	32,80	nd	nd	6,35

nd - não detectado

Tabela 17 - Resultados para cefalosporina C, massa celular, glicose e frutose e pH, para fermentação nos diferentes tempos, em meio de cultivo T4 (1,35% de Samprosoy e 2,10% de Hy-Soy) .

TEMPO (horas)	Cefalosporina C (g/l)	Massa Celular (g/l)	Sacarose (g/l)	Glicose (g/l)	Frutose (g/l)	pH
72	0,17	30,53	35,65	17,55	0,74	6,60
96	0,86	39,26	32,50	0,73	4,80	8,26
120	1,03	44,00	35,75	3,72	nd	8,38
144	0,93	49,14	3,24	0,04	0,05	8,07
168	0,48	49,25	0,26	0,06	0,01	8,80
192	0,41	45,03	0,59	0,37	0,29	8,85

nd - não detectado

Tabela 18 - Resultados para cefalosporina C, massa celular, glicose e frutose e pH, para fermentação nos diferentes tempos, em meio de cultivo T5 (1,35 % de Samprosoy e 1,60% de Edamin'S)

TEMPO (horas)	Cefalosporina C (g/l)	Massa Celular (g/l)	Sacarose (g/l)	Glicose (g/l)	Frutose (g/l)	pH
72	0,09	27,35	34,70	17,85	0,46	6,01
96	0,44	40,03	35,70	0,24	nd	6,58
120	0,66	49,32	29,70	0,20	0,11	6,70
144	0,87	47,53	5,96	0,04	0,05	7,12
168	0,56	54,96	0,72	0,13	0,07	8,40
192	0,36	32,34	1,78	0,38	0,13	9,04

nd - não detectado

Tabela 19 - Resultados para cefalosporina C, massa celular, glicose e frutose e pH, para fermentação nos diferentes tempos, em meio de cultivo T6 (2,10% de Samprosoy e 1,60% de Edamin's).

TEMPO (horas)	Cefalosporina C (g/l)	Massa Celular (g/l)	Sacarose (g/l)	Glicose (g/l)	Frutose (g/l)	pH
72	0,09	16,88	36,30	17,70	0,49	6,32
96	0,48	40,18	31,30	0,40	0,45	8,12
120	1,11	48,80	20,05	1,09	0,96	8,05
144	0,88	56,14	0,21	0,04	0,07	8,21
168	0,71	54,12	nd	nd	nd	8,48
192	0,62	53,82	nd	nd	nd	8,35

nd - não detectado

Tabela 20 - Resultados para cefalosporina C, massa celular, glicose e frutose e pH, para fermentação nos diferentes tempos, em meio de cultivo T7 (0,90% de Samprosoy, 1,40% de Hy-Soy e 1,06% de Edamin'S).

TEMPO (horas)	Cefalosporina C (g/l)	Massa Celular (g/l)	Sacarose (g/l)	Glicose (g/l)	Frutose (g/l)	pH
72	0,17	27,91	35,70	12,95	0,49	6,45
96	0,82	42,57	24,45	0,46	0,74	7,94
120	1,15	48,28	19,55	0,63	0,36	8,07
144	1,43	56,84	12,60	0,04	0,04	8,85
168	0,35	35,70	0,72	nd	nd	8,91
192	0,17	24,45	0,23	nd	nd	9,03

nd - não detectado

Os meios de cultivo que apresentaram os melhores rendimentos em relação à produção de cefalosporina C, incluem a adição de Hy-Soy em sua composição (T1, T4, T6 e T7), indicando ser este substrato, como relatado anteriormente, um estimulador da biossíntese da cefalosporina C. Os meios T6 e T7, além de atingirem as maiores concentrações do antibiótico foram também os mais produtivos. As concentrações de cefalosporina C atingidas foram de 1,43 g/l para o T7 e 1,11 para T6, e a produtividade de 0,01g/l x h e 0,0092 g/l x h para os meios T7 e T6, respectivamente.

Os resultados mostram que dos sete tratamentos testados três (T2, T4 e T6) apresentaram o pico de produção de cefalosporina C com 120 horas de fermentação; outros três (T1, T5 e T7) com 144 horas. O T3 foi o meio menos eficiente em todos os parâmetros estudados. Foi o que apresentou uma menor concentração de cefalosporina C (0,24 g/l) necessitando de 168 horas para essa produção, com produtividade de 0,0014 g/l x h.

A Figura 7 mostra a cinética da produção e decomposição da cefalosporina C para todas os meios testados.

O meio formulado apenas com Samprosoy (T2) não atingiu alta concentração de cefalosporina C como esperado. Um fato que se deve considerar neste caso é a alta concentração de proteína total neste substrato (14,72%) quando comparado ao Hy-Soy (9,5%). Como os meios foram formulados para atingir 4 g/l de nitrogênio total, a quantidade de Samprosoy adicionada é menor que a de Hy-Soy. Levando-se em consideração os meios de cultivo onde essas duas matérias primas foram utilizadas isoladamente (T1 e T2), as concentrações utilizadas foram 42 g/l de Hy-Soy contra 27 g/l para Samprosoy. A parcela não protéica que foi introduzida ao meio, que inclui cloretos, sulfatos e fosfatos entre outros compostos não quantificados, possivelmente são os responsáveis pela estimulo na produção de cefalosporina C. De qualquer maneira, a proteína da soja parece ser um substrato adequado para a produção deste

antibiótico pois mesmo quando Samprosoy foi utilizado isoladamente (T2), obteve melhores resultados que quando Edamin's foi utilizado como única fonte de proteína (T3).

Quando Samprosoy, Hy-Soy e Edamin's foram adicionados (T7) na mesma concentração (1,33 g/l de nitrogênio total) foi obtido o maior rendimento em cefalosporina C. Mesmo a soja se mostrando como um excelente substrato para produção de cefalosporina C o sinergismo das três matérias primas resultou em um meio de cultivo mais produtivo. O fato que leva a este aumento na quantidade de antibiótico produzido dificilmente pode ser esclarecido, pois este, assim como os outros meios testados apresentam uma composição extremamente complexa. Em função desta complexidade é difícil relacionar o aumento observado na produção de cefalosporina C.

Quando se trabalha com meios complexos é difícil estabelecer uma relação entre a metionina presente e a maior produção de cefalosporina C. Se essa relação fosse possível, neste caso era esperado que o T3 (Edamin's), que é o meio onde maior concentração de metionina é encontrada, fosse o meio em que maiores concentrações de cefalosporina C seriam obtidas, o que não ocorreu. Como descrito anteriormente, a metionina presente nestes meios está na forma de proteína e não na forma livre como nos estudos que fazem referência à sua ação estimulante (CALTRIDER & NISS, 1966; CALTRIDER, *et al.*, 1968; DREW & DEMAINE, 1973; MATSUMURA *et al.*, 1978; MATSUMURA, *et al.*^(a), 1980).

Em relação ao consumo dos açúcares, foi possível observar que não foi necessária o esgotamento total da glicose para que a cefalosporina C começasse a ser produzida. Isto também foi observado e comentado no item 4.2. A linhagem de *C. acremonium* utilizada neste trabalho, segundo SHEN *et al.* (1986), é menos reprimida pela presença de glicose que outras linhagens. No final do ensaio, com exceção do T3, não foram

foram detectadas concentrações significativas de sacarose para os meios estudados. Nesse tratamento a baixa concentração de massa celular produzida e a discreta variação do pH associada ao alto nível de sacarose residual, explicam o baixo nível de cefalosporina C obtido.

Em relação à massa celular produzida, as mesmas considerações feitas no item 4.1. e 4.2 se aplicam também para este ensaio. A Figura 8 mostra a massa celular obtida em comparação com a cefalosporina C produzida para cada um dos tratamentos estudados. Novamente, as maiores concentrações celulares foram responsáveis pelas maiores produções de cefalosporina C. Essa constatação foi também observada por ZHOU *et al.* (1992).

O perfil de pH para todos os tratamentos, exceto, o T3 foi o esperado; isto é, aumento do mesmo em função da decomposição das matérias primas adicionadas ao meio, assim como pela própria autólise celular do fungo.

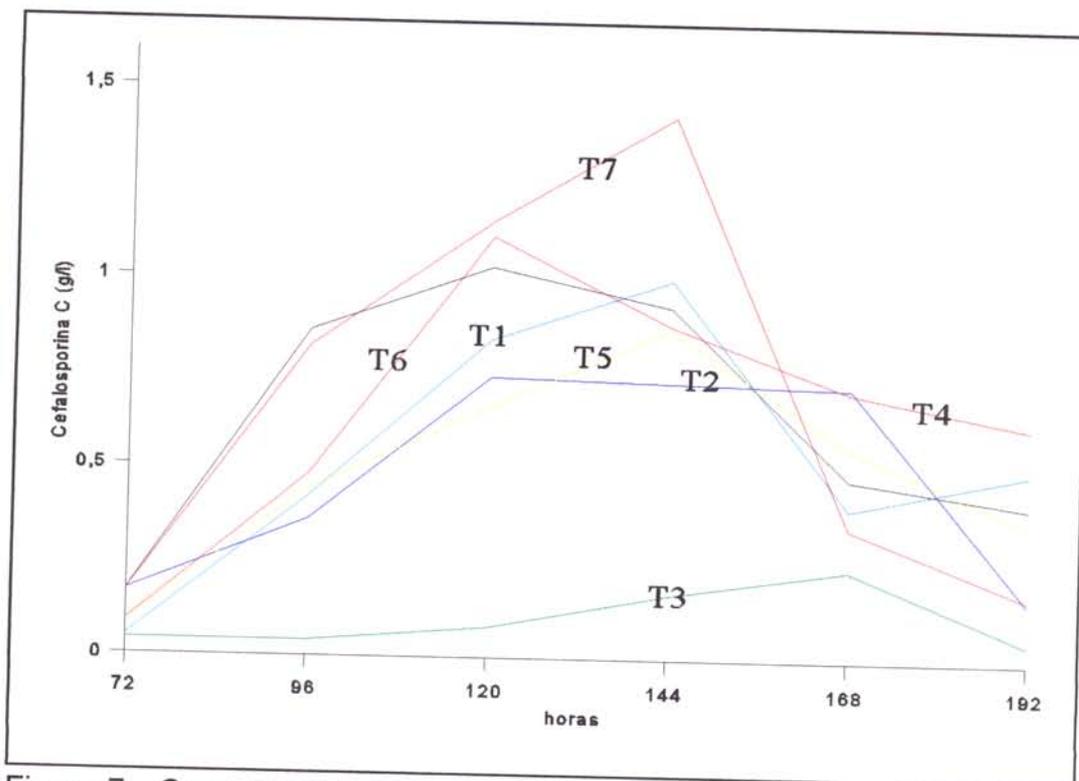


Figura 7 - Concentração de cefalosporina C (g/l) para os tratamentos nos diferentes tempos (horas) de fermentação.

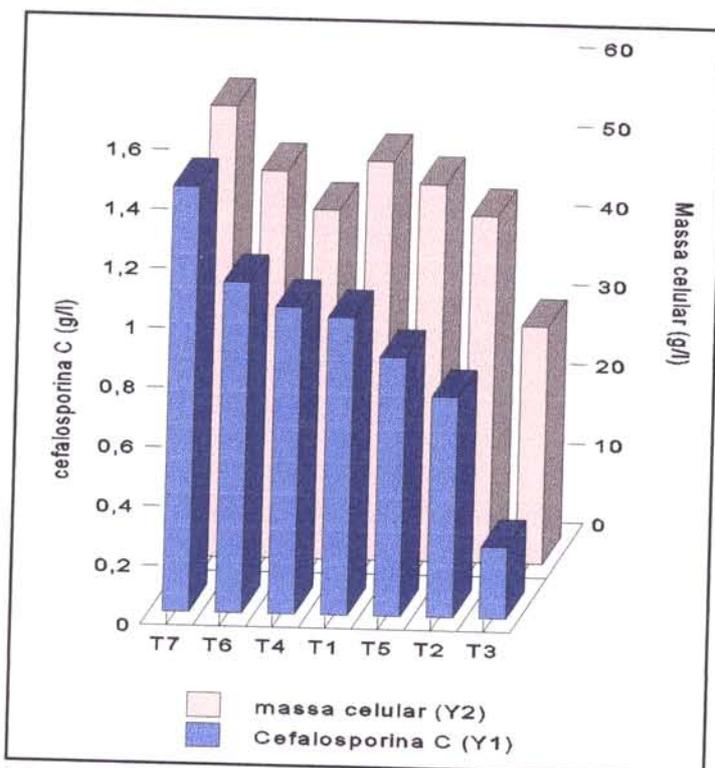


Figura 8 - Massa celular e produção de cefalosporina C para todos os tratamentos.

4.4. Otimização do Meio de cultivo

Para a otimização do meio de cultivo foi feito um planejamento experimental fatorial com cinco níveis (-1,68; -1,0; 0,0; +1,0; +1,68) e análise dos resultados através de superfície de resposta para o aumento da concentração de cefalosporina C. O meio de cultivo utilizado como ponto central foi o T7, que apresentou o melhor resultado no item 4.3. Esse meio utiliza como fonte de proteína a associação de Samprosoy, Hy-Soy e Edamin'S em partes iguais, totalizando uma concentração final de 4 g/l de nitrogênio total. A Tabela 7 mostra a quantidade de cada uma das matérias primas que foram adicionadas ao meio basal (Tabela 4).

As variáveis estudadas foram: concentração de nitrogênio, sacarose e glicose, totalizando 16 ensaios, sendo 2 referentes ao ponto central. A variável resposta foi a concentração de cefalosporina C no caldo fermentado. Os níveis estudados para cada uma das variáveis, assim como seus valores em concentração, C estão descrito na Tabela 8. A Tabela 21 mostra os resultados deste ensaio.

Baseado em experimentos anteriores, era esperado que com 144 horas de fermentação fosse alcançada a produção máxima de cefalosporina C para cada ensaio, mas por segurança a fermentação foi conduzida até 168 horas. Pelos resultados mostrados na Tabela 20 nota-se que a fermentação sofreu um atraso, pois até o sétimo dia (168 horas), onde era esperado o início da degradação da cefalosporina C, notou-se ainda uma tendência de elevação da concentração do antibiótico. Outro indicativo desse atraso está no fato de que em ensaios anteriores, a concentração de cefalosporina C, obtida com o meio de cultivo utilizado como ponto central, atingiu 1,43 g/l após 144 horas de fermentação, enquanto neste experimento não alcançou mais que 0,4 g/l. A diferença de um ensaio para outro é de ocorrência relativamente comum em fermentações de antibióticos. Mesmo em escala industrial as concentrações de

antibiótico obtidas de lote para lote pode variar. O atraso pode estar associado à queda da viabilidade da cultura.

Tabela 21 - Cefalosporina C (variável resposta) em g/l no caldo fermentado nos tempos 144 e 168 horas de fermentação.

<i>Cefalosporina C</i>		
<i>Tratamento</i>	<i>144 h</i>	<i>168 h</i>
1	0,05	0,46
2	0,26	0,52
3	0,10	0,36
4	0,25	0,39
5	0,10	0,41
6	0,29	0,53
7	0,21	0,31
8	0,02	0,59
9	0,17	0,31
10	0,35	0,54
11	0,26	0,62
12	0,28	0,51
13	0,09	0,12
14	0,37	0,51
15	0,15	0,38
16	0,16	0,39

Através de análise estatística dos resultados obtidos, baseados no teste t -Student foram determinados como significativos os seguintes termos do modelo quadrático: termo linear da concentração da glicose, o linear e o quadrático da concentração da sacarose, o linear da concentração do nitrogênio e a interação entre a concentração da glicose e do nitrogênio total. Com base nesses resultados foi montado o modelo que descreve a concentração da cefalosporina C atingida em função das variáveis estudadas. O modelo é representado matematicamente pela equação (1), levando-se em conta somente os termos do modelo considerados significativos pela análise estatística. A Tabela 22 mostra a análise de variância para o ajuste deste modelo.

$$C = 1,6559 - 0,0212xG - 0,0593xS + 0,0064x(S)^2 - 0,0046xN - 0,0019xGxN \quad (1)$$

C = concentração de cefalosporina C (g/l)

G = concentração de glicose (g/l)

S = concentração de sacarose (g/l)

N = concentração de nitrogênio total no meio (g/l)

Tabela 22 - Análise de variância do ajuste do modelo de produção de cefalosporina C em relação a concentração de sacarose, glicose e nitrogênio total.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Nºgl</i>	<i>Média Quadrática</i>
Regressão	0,21661	9	0,024068
Resíduo	0,024584	6	0,004097
F. ajuste	0,024532	5	0,00409
Erro Puro	0,00005	1	0,00005
Total	0,241194	15	

% de variação explicada = 89,8

% máxima de variação explicável = 99,97

$F_{0,95,9,6} = 3,72$

$F_{0,95,5,1} = 230,2$

A significância estatística do modelo foi avaliada através de um teste F da razão entre as médias quadráticas da regressão e a média quadrática do resíduo e a razão entre a média quadrática da falta de ajuste e a média quadrática do erro puro. Com os dados da Tabela 22, obteve-se os valores destas razões como sendo 5,87 e 81,80, respectivamente. Esses valores quando comparados com $F_{9,6} = 3,72$ e $F_{5,1} = 230,2$ indicam que a regressão quadrática é significativa no nível de 95% de confiança.

As Figuras 9, 10 e 11 mostram as superfícies de resposta obtidas a partir do modelo descrito pela equação (1) para a região estudada.

Pela Figura 9, é possível observar que a produção de cefalosporina C aumenta com a elevação da concentração inicial de glicose e de nitrogênio total. O ponto de máxima concentração de cefalosporina C. Para baixas concentrações de nitrogênio, a produção de cefalosporina C é baixa independente da concentração de glicose. Para concentrações baixas de glicose, o comportamento se repete com menor intensidade para as diferentes concentrações de nitrogênio, sendo possível detectar uma região de produção intermediária.

A Figura 10 mostra um comportamento não esperado, apresentando duas regiões de máxima produção de cefalosporina C. A primeira para altas concentrações de glicose e sacarose e a outra para concentrações elevadas de glicose e baixas de sacarose, apresentando uma região de mínimo próximo ao ponto central. Comportamento similar pode ser visto na Figura 11, onde a produção de cefalosporina C é relacionada com a concentração de sacarose e nitrogênio, onde os pontos de máxima produção do antibiótico são obtidos para concentrações elevadas de nitrogênio com sacarose tanto em concentrações baixas, como em concentrações elevadas.

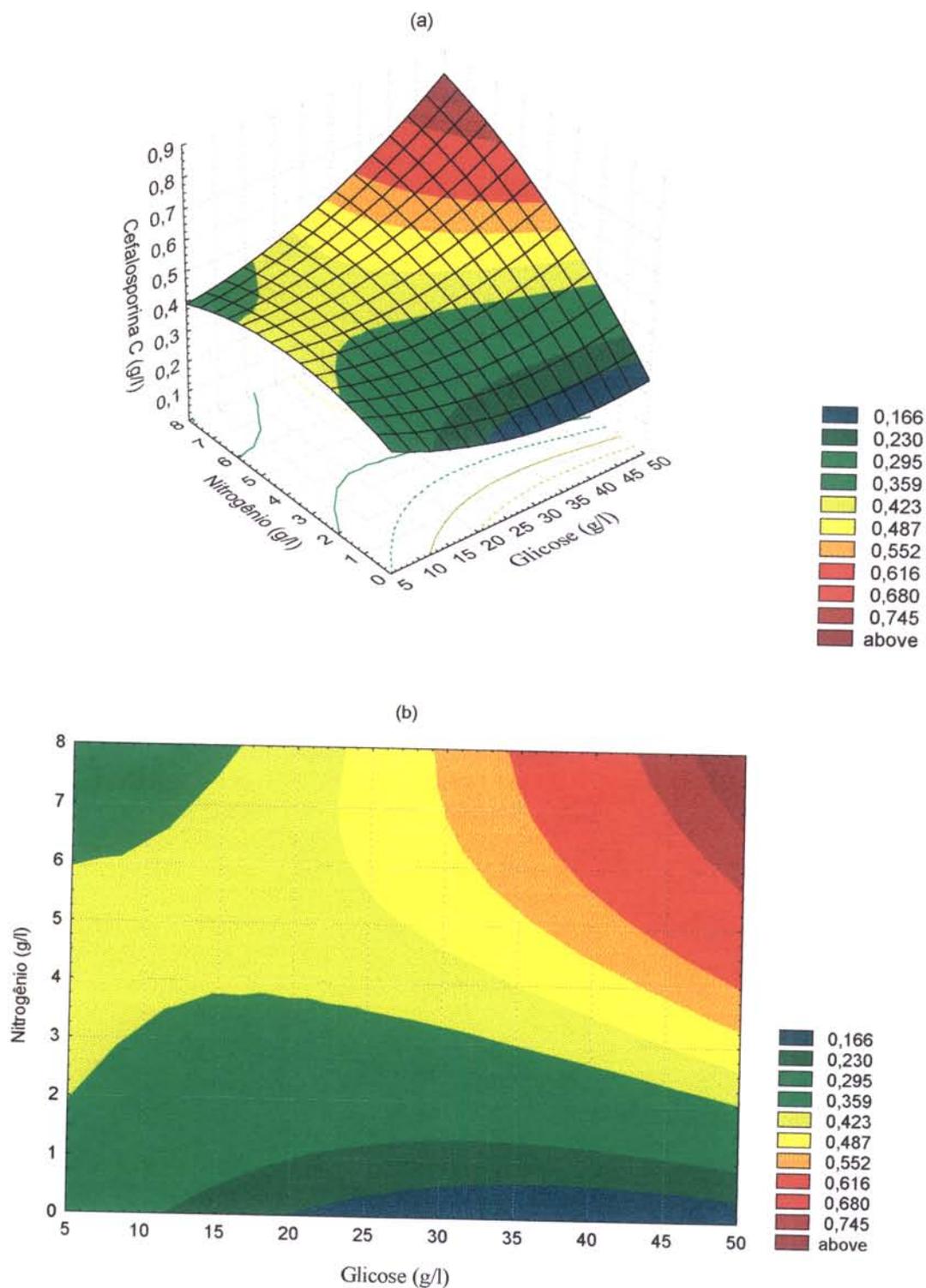


Figura 9 - (a) Gráfico de superfície de resposta para produção de cefalosporina C em função da concentração (g/l) de glicose e nitrogênio (b) curvas de contorno.

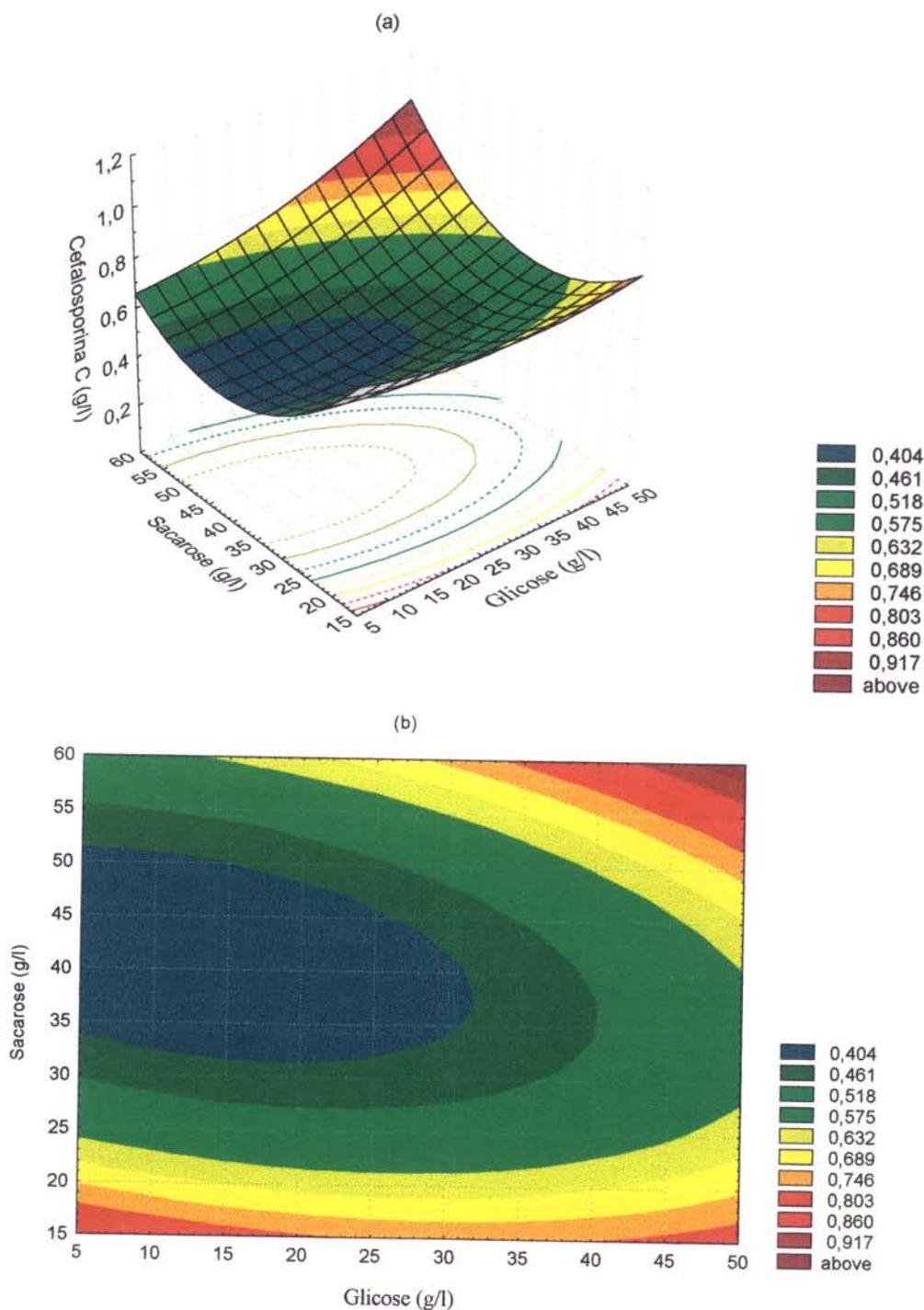


Figura 10 - (a) Gráfico de superfície de resposta para produção de cefalosporina C em função da concentração (g/l) de glicose e sacarose (b) curvas de contorno.

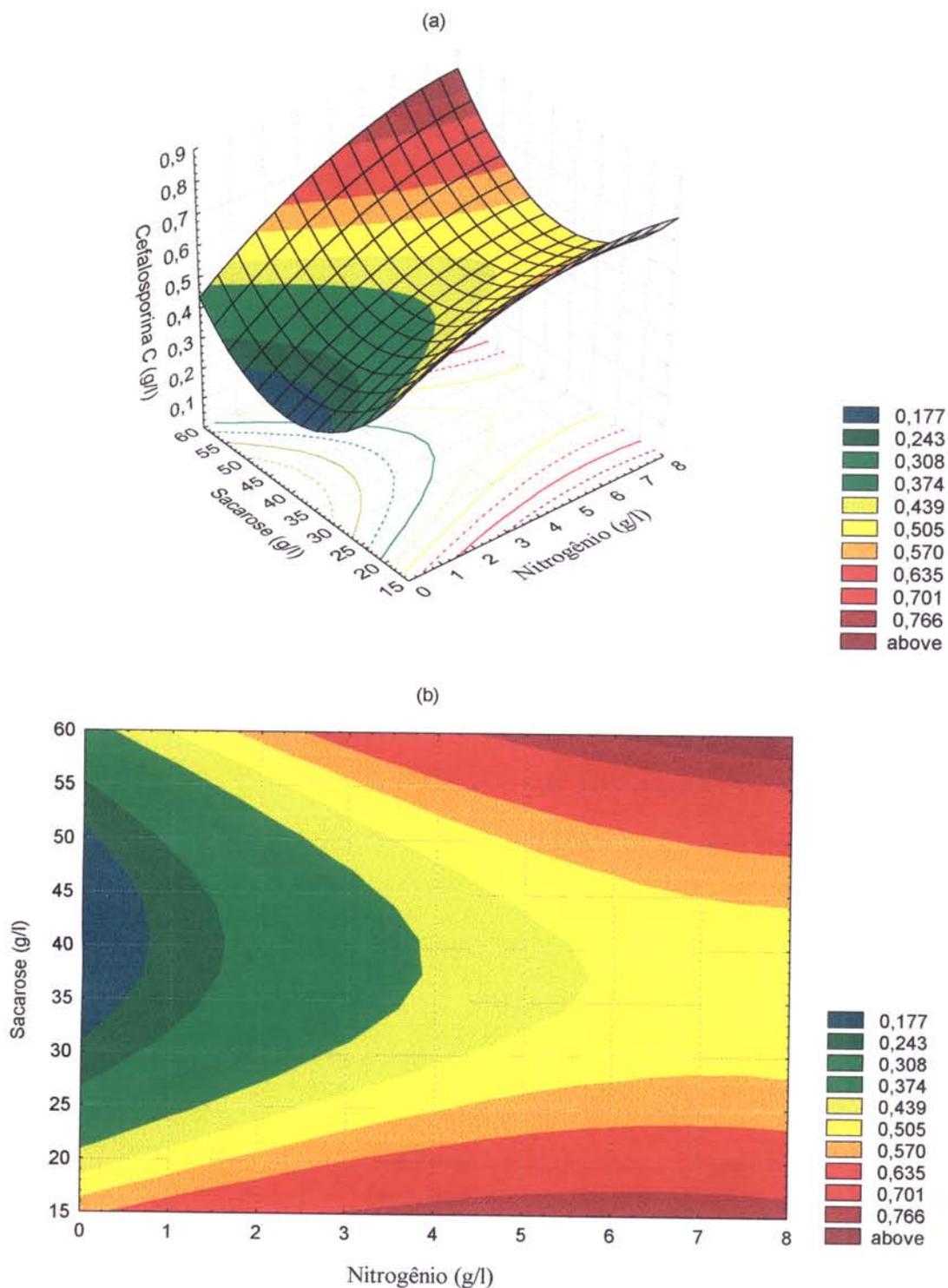


Figura 11 - (a) Gráfico de superfície de resposta para produção de cefalosporina C em função da concentração (g/l) de sacarose e nitrogênio (b) curvas de contorno.

Em função da não obtenção do ponto de máxima produção uma nova região para o estudo foi selecionada, caracterizando assim um estudo de otimização em degraus, onde o ponto central adotado passou a ser o extremo superior do ensaio anterior onde, as concentrações foram de 37 g/l e 6 g/l de glicose e nitrogênio total respectivamente e o extremo inferior para a concentração de sacarose (20 g/l). As Figuras 12, 13 e 14 mostram a direção do ponto de máxima produção de cefalosporina C, e a novas regiões a serem estudadas.

A opção de se trabalhar com concentrações de sacarose baixas é de ordem econômica, pois, a tendência mostrada no experimento anterior indica um aumento na concentração de cefalosporina C tanto para as regiões de alta como de baixa concentração deste açúcar com altas concentrações de glicose

Os ensaios foram conduzidos nas mesmas condições descritas para os outros testes envolvidos neste trabalho em relação a forma de obtenção do inóculo, temperatura e agitação. A Tabela 9 mostra as concentrações de glicose, sacarose e nitrogênio total utilizadas em cada um dos tratamentos realizados para o estudo desta região. As amostras para a determinação da concentração de cefalosporina C.

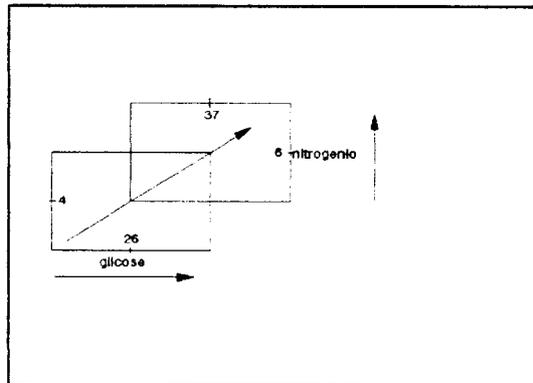


Figura 12 - Tendência do ponto de máxima produção de cefalosporina C em função da concentração de glicose e nitrogênio.

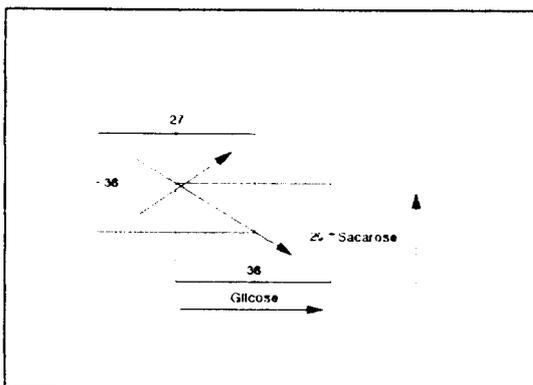


Figura 13 - Tendência do ponto de máxima produção de cefalosporina C em função da concentração de glicose e sacarose.

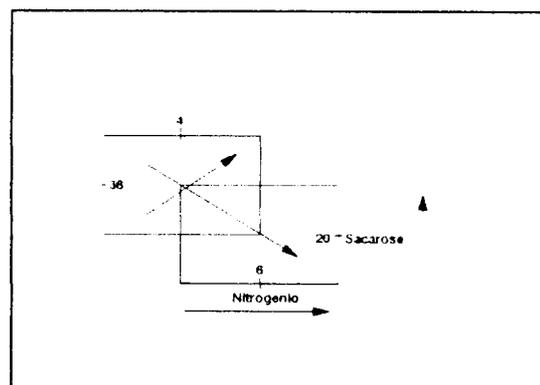


Figura 14 - Tendência do ponto de máxima produção de cefalosporina C em função da concentração de sacarose e nitrogênio.

Tabela 23 mostra os resultados obtidos em relação a cefalosporina C (variável resposta) para cada tratamento.

Tabela 23 - Cefalosporina C (variável resposta) em g/l no caldo fermentado nos tempos 144 e 168 horas de fermentação.

<i>Cefalosporina C</i>		
<i>Tratamento</i>	<i>144h</i>	<i>168h</i>
1	0,19	0,18
2	0,34	0,57
3	0,01	0,32
4	0,27	0,56
5	0,24	0,63
6	0,18	0,90
7	0,21	0,50
8	0,30	0,64
9	0,22	0,34
10	0,17	0,64
11	0,15	0,59
12	0,33	0,46
13	0,10	0,46
14	0,26	0,58
15	0,31	0,56
16	0,29	0,55

Através de análise estatística dos resultados obtidos, baseados no teste t -Student foi determinado como significativo os seguintes termos do modelo quadrático: termo linear da concentração da glicose, o linear da concentração da sacarose, o linear da concentração do nitrogênio, a interação entre a concentração da glicose e da sacarose e a interação da concentração da sacarose com a de nitrogênio total. Com base nestes resultados foi obtido o modelo que descreve a concentração da cefalosporina C atingida em função das variáveis estudadas para esta nova região. O novo modelo é representado matematicamente pela equação (2), levando-se em conta somente os termos considerados significativos pela análise estatística. A Tabela 24 mostra a análise de variância para o ajuste deste modelo.

$$C = -1,5574 - 0,0486xG + 0,0334xS + 0,1590xN - 0,0007xGxN - 0,0018xSx N \quad (2)$$

C = concentração de cefalosporina C (g/l)

G = concentração de glicose (g/l)

S = concentração de sacarose (g/l)

N = concentração de nitrogênio total (g/l)

Tabela 24 - Análise de variância do ajuste do modelo quadrático de produção de cefalosporina C em relação a concentração de sacarose, glicose e nitrogênio total.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Nº gl</i>	<i>Média Quadrática</i>
Regressão	0,35532	9	0,03948
Resíduo	0,03908	6	0,00651
F. ajuste	0,03858	5	0,00772
Erro Puro	0,00050	1	0,00050
Total	0,39440	15	

% de variação explicada = 90,20

% máxima de variação explicável = 99,87

$F_{0,95,9,6} = 3,72$

$F_{0,95,5,1} = 230,2$

Tal como no modelo anterior, a significância estatística do modelo foi avaliada através de um teste F da razão entre as médias quadráticas da regressão e a média quadrática do resíduo e a razão entre a média quadrática da falta de ajuste e a média quadrática do erro puro. Com os dados da Tabela 25, obteve-se os valores destas razões como sendo 6,064 e 15,43 respectivamente. Esses quando comparados com $F_{9,6} = 3,72$ e $F_{5,1} = 230,2$ indicam que a regressão quadrática é significativa no nível de 95% de confiança.

As Figuras 15, 16 e 17 mostram as superfícies de resposta obtidas a partir do modelo descrito pela equação (2) para a região estudada.

Pela Figura 15 observa-se um comportamento similar ao encontrado no ensaio anterior (Figura 9), onde a produção de cefalosporina C aumenta com o aumento da concentração de glicose e nitrogênio total. O ponto de máxima produção do antibiótico ainda não foi encontrado nesta região estudada, mas a tendência se manteve.

A Figura 16 mostra um comportamento onde a máxima produção de cefalosporina C pode ser alcançada em altas concentrações de glicose e baixa concentração de sacarose, similar ao encontrado no ensaio anterior. O mesmo comportamento pode ser observado na Figura 17, onde a tendência de se obter a máxima concentração de cefalosporina C segue o aumento da concentração de nitrogênio total e diminuição da concentração de sacarose.

Com os resultados obtidos para as duas regiões estudadas, confirma-se o caminho para se atingir a máxima produção de cefalosporina C, ou seja, o aumento na concentração de glicose e nitrogênio total e a diminuição da concentração de sacarose.

Considerando a citação feita por ZHOU *et al.* (1992) que quanto maior a massa celular

produzida maior será a produção e a cefalosporina C, as tendências encontradas na otimização coincidem com os resultados encontrados neste trabalho que também são mencionados em estudos feitos por outros pesquisadores. Os resultados obtidos recomendam alta concentração de glicose, açúcar este relacionado ao crescimento celular. Portanto uma maior concentração de glicose, conduz á uma maior concentração de cefalosporina C.

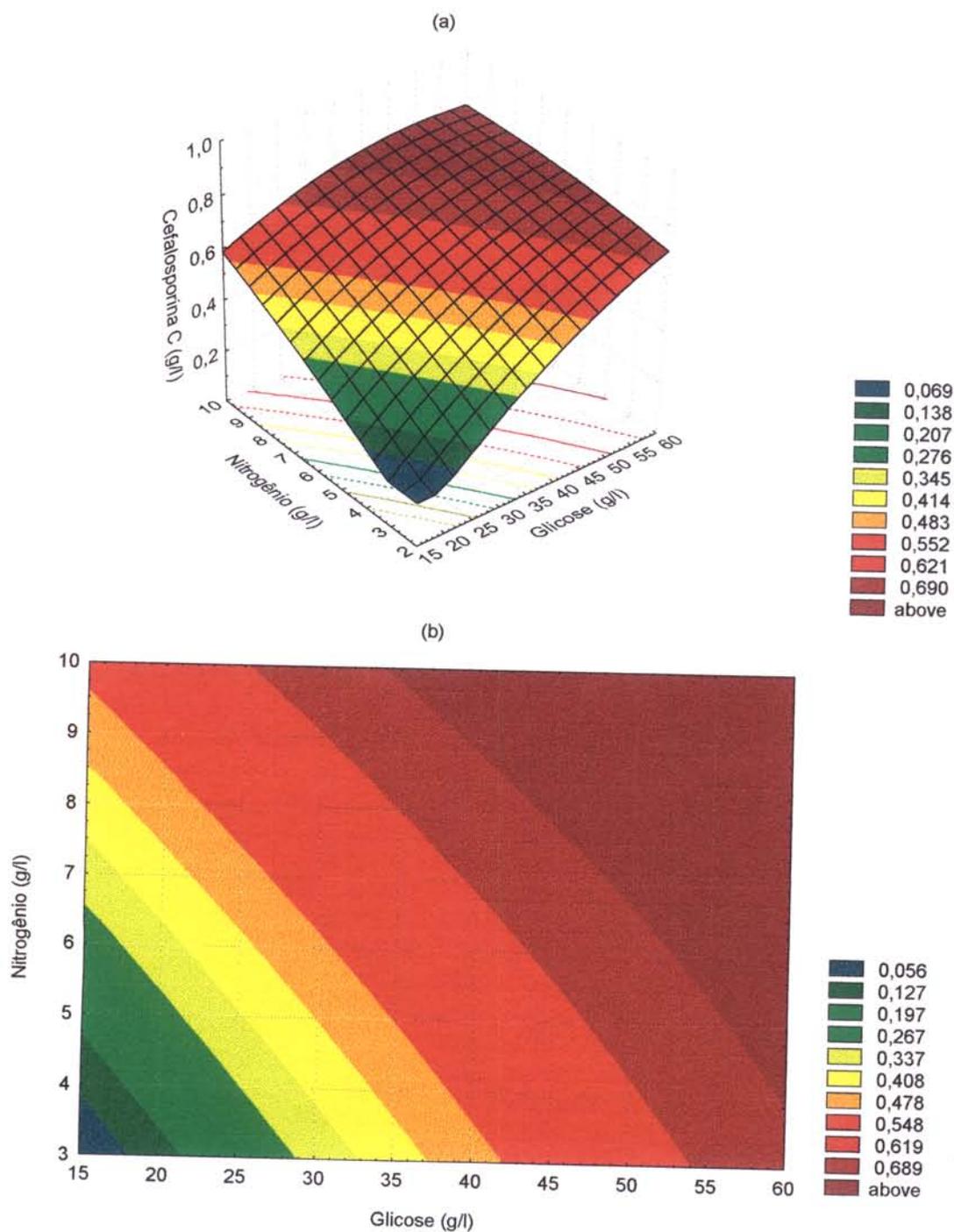


Figura 15 - (a) Gráfico de superfície de resposta para produção de cefalosporina C em função da concentração (g/l) de glicose e nitrogênio (b) curvas de contorno..

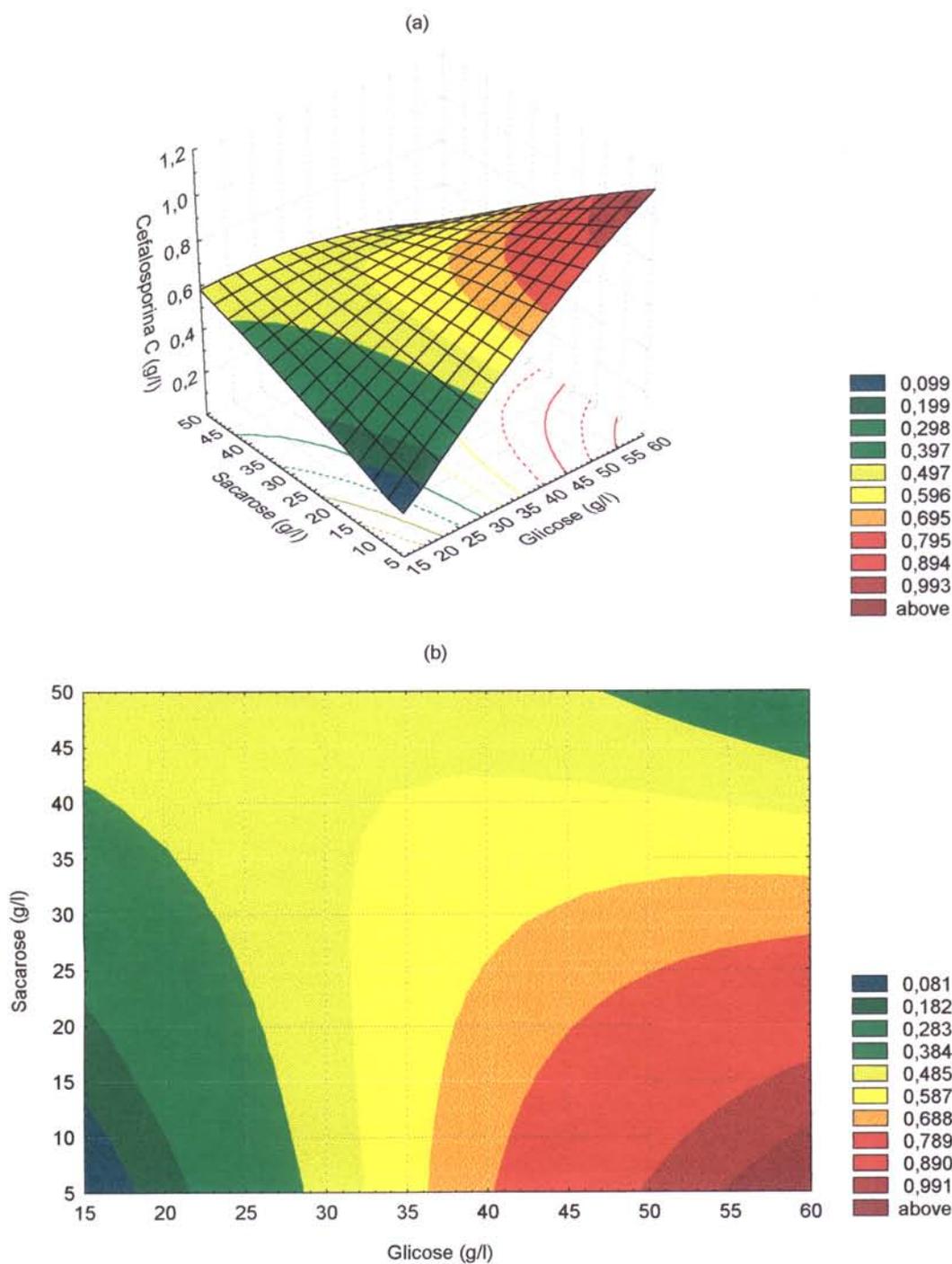


Figura 16 - (a) Gráfico de superfície de resposta para produção de cefalosporina C em função da concentração (g/l) de glicose e sacarose (b) curvas de contorno.

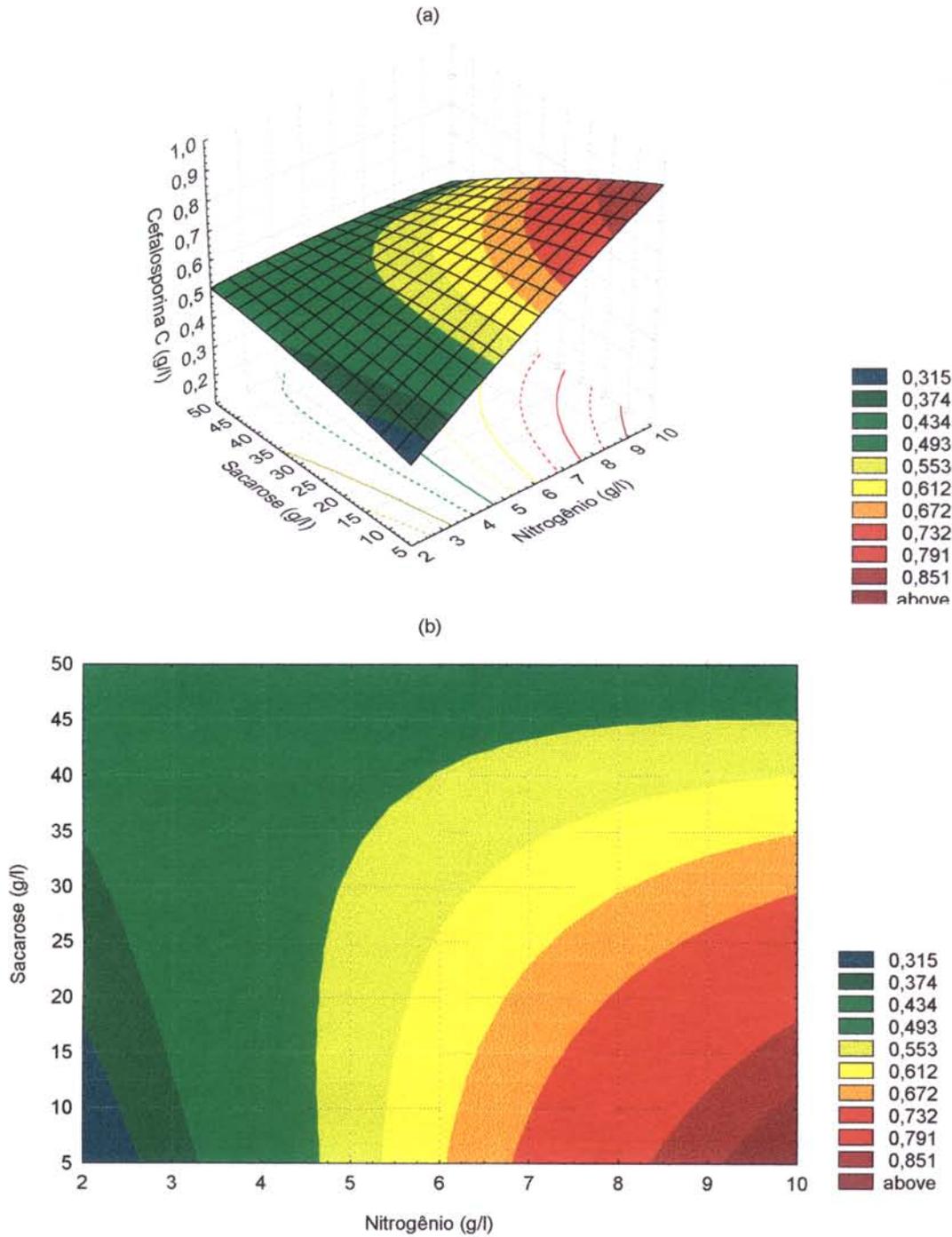


Figura 17 - (a) Gráfico de superfície de resposta para produção de cefalosporina C em função da concentração (g/l) de sacarose e nitrogênio (b) curvas de contorno.

4.5. Escalonamento

Os resultados referentes ao escalonamento foram obtidos a partir de um ensaio de fermentação para produção de cefalosporina C foi conduzido em fermentador e em frascos agitados simultaneamente como descrito em 3.3.3.

As Tabelas 25 e 26 mostram os resultados obtidos.

Tabela 25 - Resultados da fermentação conduzida em "shaker": cefalosporina C, massa celular, sacarose, glicose e frutose e pH, nos diferentes tempos de fermentação.

TEMPO (horas)	Cefalosporina C (g/l)	Massa Celular (g/l)	Sacarose (g/l)	Glicose (g/l)	Frutose (g/l)	pH
24	0,02	16,87	35,74	30,49	0,68	5,69
48	0,05	19,83	26,67	19,75	1,21	5,64
72	0,09	22,15	26,07	nd	0,21	6,07
96	0,19	38,92	19,91	nd	0,09	6,31
120	0,35	35,20	7,88	nd	0,09	6,03
144	0,32	23,00	5,32	nd	0,13	6,23
168	0,25	17,22	n.d	nd	0,19	6,98

nd - não detectado

Tabela 26 - Resultados da fermentação conduzida em fermentador : cefalosporina C, massa celular, sacarose, glicose e frutose e pH nos diferentes tempos de fermentação.

TEMPO (horas)	Cefalosporina C (g/l)	Massa Celular (g/l)	Sacarose (g/l)	Glicose (g/l)	Frutose (g/l)	pH
24	0,02	13,41	36,30	30,40	1,24	5,82
48	0,08	26,14	27,68	22,49	1,31	5,69
72	0,13	36,88	25,54	6,85	0,16	5,72
96	0,40	39,50	24,23	0,15	0,06	6,12
120	0,87	43,80	4,44	nd	nd	6,15
144	1,01	48,22	n.d	nd	nd	7,60
168	0,95	40,81	n.d	nd	nd	8,13

nd - não detectado

As considerações feitas por SCHEIDEGGER *et al.* (1984) e ZHOU *et al.* (1992), entre outros muitos pesquisadores, de que a biossíntese da cefalosporina C demanda altas concentrações de oxigênio dissolvido foram confirmadas neste trabalho. Quando a fermentação foi conduzida em fermentador, onde o fornecimento de oxigênio ao nível de 50% de oxigênio foi garantido durante toda a corrida, obteve-se uma concentração do antibiótico 2,82 vezes maior que a obtida em frascos agitados, onde não existe mecanismo para a manutenção de elevada concentração de oxigênio no meio. A Figura 18 mostra as curvas comparativas de produção de cefalosporina C em ambos os sistemas.

Mesmo sendo a produção de cefalosporina C maior no fermentador que em frascos o pico de produção máxima foi atingida primeiramente na fermentação incubadas no "shaker". Enquanto o término da produção do antibiótico foi atingida com 120 horas para os frascos, para o fermentador essa se estendeu até 144 horas de fermentação. O comportamento em relação ao consumo dos açúcares também diferiu de um sistema

para outro. A glicose foi consumida primeiramente (48 horas) nos frascos e a sacarose ainda estava presente quando se iniciou a degradação da cefalosporina C. Já no fermentador a glicose ainda se fazia presente até 96 horas de fermentação e não foi detectada a presença da sacarose no final da produção do antibiótico.

A Figura 19 compara as condições de operação do fermentador com o “ shaker”. É possível notar que nos tempos entre 96 e 120 horas de fermentação, onde a maior quantidade de antibiótico foi produzida, não foi observado aumento significativo na viscosidade do caldo, e mesmo assim, a vazão de ar necessária assim como, a velocidade de agitação para a manutenção de 50% de oxigênio dissolvido atingiu níveis de 5,5 l/min e 350 rpm respectivamente.

No que diz respeito a concentração celular, o resultado obtido no ponto máximo de produção de cefalosporina C em fermentador é maior que o obtido em frascos. Novamente se confirma a estreita relação entre massa celular e produção de cefalosporina C observadas por ZHOU *et al.*, 1992.

O perfil de aumento do pH pode ser observado para os dois sistemas de fermentação. Entretanto o aumento mais acentuado foi observado quando a fermentação foi conduzida no fermentador. Isso pode ser resultado da ocorrência de maior lise celular decorrente da presença de maiores quantidades de cefalosporina C formada.

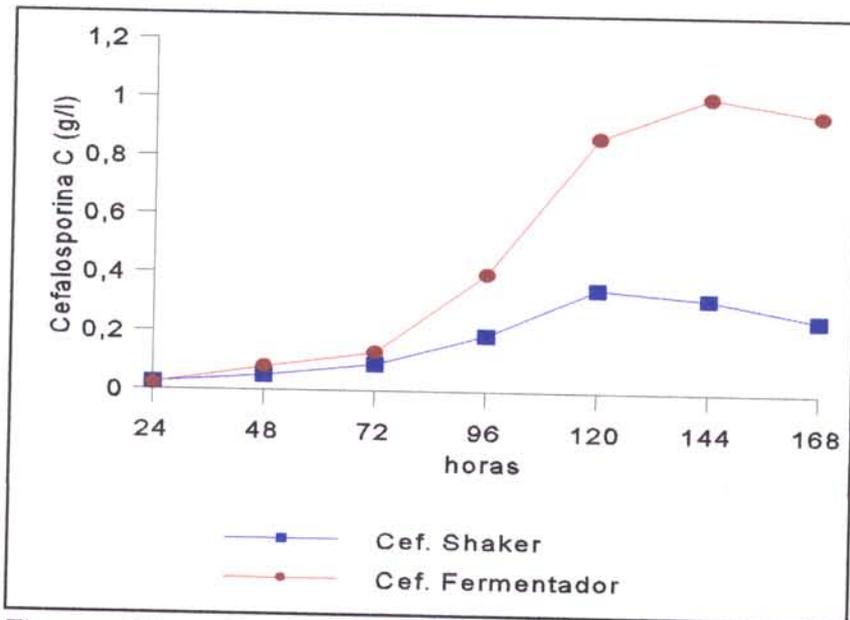


Figura 18 - Produção de cefalosporina C (g/l) em fermentador e shaker, em função do tempo de fermentação.

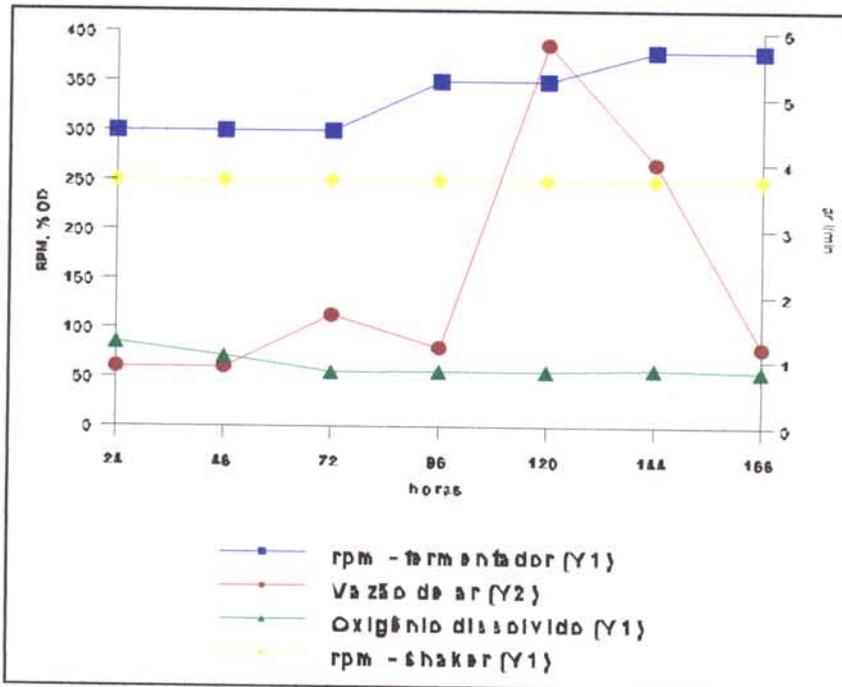


Figura 19 - Condições de operação do fermentador (rpm, vazão de ar e oxigênio dissolvido) e do shaker (rpm) durante a fermentação.

4.6. Considerações Finais

A comparação dos resultados entre os diferentes ensaios deve ser feita com ressalvas, pois apesar de todos os cuidados com a padronização na condução dos experimentos, a produção de metabólicos secundários sofre alterações devido a pequenas variações as quais não podem ser controladas. No caso deste estudo foi possível visualizar, em função da massa celular obtida no inóculo, uma queda da viabilidade da cultura congelada no decorrer do desenvolvimento desse trabalho, o que acarretou em uma menor quantidade de massa celular inicial e conseqüentemente menor produção de cefalosporina C. Isto ocorreu pela forma de preservação da cultura que neste trabalho foi congelada a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto que na indústria produtora de antibiótico essa preservação é feita normalmente em ultra-freezer, onde a temperatura alcança $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. CONCLUSÕES

- O uso de fonte protéica proveniente da soja mostrou-se promissor para ser utilizada como fonte de proteína na produção de cefalosporina C. Em ensaios onde esse substrato foi adicionado houve um aumento na produção daquele antibiótico, quando comparado a meios com fontes protéicas de diferentes procedências. Deve-se considerar, ainda as características entre os diferentes produtos derivados dessa fonte. Produtos que apresentam maiores concentrações de proteínas, são mais puros, e portanto podem não conter alguns fatores promotores da síntese da cefalosporina C.
- Os meios formulados associando-se diferentes fontes de nitrogênio promoveu o aumento na produção de cefalosporina C. Observou-se ainda que os meios mais produtivos sempre apresentaram a soja como uma das fontes. O sinergismo obtido na associação não pode ser explicado em função da complexidade das matérias primas utilizadas.
- A cinética da produção de cefalosporina C muda em função da fonte de proteína utilizada como substrato. O pico de produção para os meios onde foram obtidas as maiores concentrações daquele antibiótico são atingidos precocemente, comparados aos meios de menores rendimentos. Para todos os meios formulados neste estudo foi observado a degradação da cefalosporina C no meio fermentado.
- Existe uma estreita relação entre a massa celular do *C. acremonium* e a quantidade de cefalosporina C produzida. Os maiores valores do antibiótico foram obtidos nos meios de cultivo onde foram observadas maiores concentrações celulares.
- No estudo de otimização foi observado que os maiores rendimentos em cefalosporina C foram obtidos em função do aumento na concentração de glicose e nitrogênio no meio

de cultivo. A sacarose não apresentou influência significativa sobre o rendimento.

● A disponibilidade de oxigênio é um fator limitante na produção de cefalosporina C. O ensaio conduzido em fermentador, onde existe disponibilidade de oxigênio, apresentou uma produção de antibiótico 2,82 vezes maior que nos ensaios em frascos agitados.

6. BIBLIOGRAFIA

- ARAÚJO, M.L.C.; GOMES, L.M.S.; SANTANA, M.H.A.; OLIVEIRA, R.P.; HOKKA, C.O. Estudo cinético do processo de produção de cefalosporina C. In: *Anais 10 ° Congresso de Engenharia Química*, pp. 1240-1245, 1994.
- BAYER, T.; ZHOU, W. HOLZHAUER, K.; SCHUGERL, K. Investigation of cephalosporin C production in an air lift tower loop reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 26-33, 1989.
- BRANA, A.F.; WOLF S.; DEMAIN, A.L. Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.* **31**: 736-743, 1985.
- BRANA, A.F.; WOLF, S.; DEMAIN, A.L. Relationship between nitrogen assimilation and cephalosporin synthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Arch. Microbiol.* **146**: 46-51, 1986.
- BUSCH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, **39**: 1211-1233, 1995.
- CALAM, T.C. Shake-flasks fermentations. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washigton, Amer. Society Microbiolog., 1986.
- CALTRIDER, P.G. & NISS, H.F. Role of methionine in cephalosporin synthesis. *Appl. Microbiol.* **14**: 746-753, 1966.
- CALTRIDER, P.G.; HUBER, F.M.; DAY, L.E. Effect of methionine and sulfate on the metabolism of *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Microbiol.* **16**: 1913-1918, 1968.
-
- Estudo de Meio de Cultivo Industrial para Produção de Cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium*

CHU, W.B.Z. & CONSTANTINIDES, A. Modeling, optimization and computer control of the cephalosporin C fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **32**:277-288, 1988.

CRUEGER, W. & CRUEGER, A. *Biotechnology - A textbook of industrial microbiology*. Sinauer Associates Sunderland, Mass., 1984

DEMAIN, A.L.; NEWKIRK, J.F.; HENDLIN, D. Effect of methionine, norleucine and lysine derivatives on cephalosporin C formation in chemical defined media. *J. Bacteriol.*, **85**: 339-344, 1963.

DEMAIN, A.L. *et al.*, Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. In: VINING, L.C. (Ed), *Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics*. Addison- Wesley. Reding, MA, 1983.

DREW, S.W. & DAMAIN, A.L. Methionine control of cephalosporin C formation. *Biotechnol. Bioeng.* **15**: 743-754, 1973.

DREW, S.W. & DAMAIN, A.L. ^(a) The obligatory role of methionine in the conversion of sulfate to cephalosporin C. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **2**: 121-128, 1975.

DREW, S.W. & DAMAIN, A.L. ^(b) Stimulation of cephalosporin production by methionine peptides in a mutant blocked in reverse transsulfuration. *J. Antibiot.* **28**: 889-895, 1975.

DREW, S.W. & DAMAIN, A.L. ^(c) Production of cephalosporin C by single and double sulfur auxotrophic mutants of *Cephalosporium acremonium*. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, **8**: 5-10, 1975.

-
- DWYER, J.L. Scaling up bio-product separation with high performance liquid chromatography. *Biotechnology*, **11**: 957-964, 1984.
- EARL, A. The genetic engineering approach to β -lactam antibiotic process strain improvement. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **50**: 123-126, 1991.
- GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. Goodman and Gilman's - *The pharmacological of therapeutics*, 7th Edition. MacMillan Publishing Co., New York, 1985.
- HAMLIN, P.F. & BALL, C. Genetic of Industrial microorganisms. IN: *Proc. 3rd Int. Symp. Genet. Ind. Microorg.* pp. 185, 1979.
- HEROLD, T.; BAYER, T.; SCHUGERL, K. Cephalosporin C production in a stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**: 168-173, 1988.
- HILGENDORF, P.; HEISER, V.; DIEKMANN, H.; THOMA, M. Constant dissolved oxygen concentrations in cephalosporin C fermentation: Applicability of different controllers and effect on fermentation parameters. *Appl. Microbiol. Biotechnology*. **27**: 247-251, 1987.
- HINNEN, A. & NUESCH, J. Enzymatic hydrolysis of cephalosporin C by an extracellular acetylhydrolase of *Cephalosporium acremonium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **9**:824-830, 1976.
- HUANG, M.Y. & BUNGAY, H.R. Microprobe measurements of oxygen concentration in mycelial pellets. *Biotechnol. Bioeng.*, **15**: 1193, 1973.

-
- HUBER, F.H. & TIETZ, A.J. Defined media strategies for de biosynthesis of cephalosporin C. *Biotechnol. Letter.* **5**: 385-390, 1983.
- JACOBY, G.A. & MEDEIROS, A.A., More extended-espectrum β -lactamases. *Antimic Agents Ch emother.* **35**: 1697-1704, 1991.
- JAIPRAKASH, G.S. & VAYALOMBRON, K.S. Penicillin V acyclase: Its potencial in the production of 6-aminopenicillanic acid. *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 402-410, 1997.
- KASARENINI, S. & DEMAIN, A.L. A role of alanine in the ammonium regulation of cephalosporin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Indus. Microb.* **13**: 217, 1994.
- KENNEDY, J.H. High performance liquid chromatographic analysis of fermentation broths: cephalosporin C and tylosin. *J. Chromat. Sci.*, **16**: 492-495, 1978.
- KOZMA, J.; LUCAS, L.; SCHUGERL, K. Alternative respiration and antibiotic production of *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 463-465, 1993.
- KOZMA, J. & KARAFFA, L. Effect of oxygen on the respiratory system and cephalosporin-C production in *Acremonium chrysogenum*. *J. Biotechnol.* **48**: 59-66, 1996
- KUENZI, M.T. Process design and control in antibiotic fermentation. In: RUTTER, R. *et al.*, (Eds). Antibiotic and others secondary metabolites. Academic Press, London, 1978.
- KUENZI, M.T. Regulation of cephalosporin synthesis in *Cephalosporium acremonium* by phosphate and glucose. *Arch. Microbiol.* **128**:78-83, 1980.

-
- KUPKA, J.; SHEN, Y.; WOLFE, S.; DEMAINE, A.L. Studie on the ring-expansion enzyme of β -lactam-biosynthesis in *Cephalosporium acremonium*. *Can. J. Microbiol.* **16**: 488-496, 1983.
- LIGGET, R.W. & KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. *Bacteriol. Rev.*, **12**: 297-311, 1948.
- LUBBE, C.; JENSEN, S.E.; DEMAINE, A.L. Prevention of phosphate inhibition of cephalosporin synthetases by ferrous ion. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**: 75-79, 1984.
- LUBBE, C.; SHEN, Y.Q.; DEMAINE, A.L. A simple and rapid chemical method for the determination of cephalosporins. *Appl. Biotechnol. Biotechnol.* **12**: 31-35, 1986.
- MALMBERG L.H. & HU, W.S. Kinetic analysis of cephalosporin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Bioengin.* **38**: 941-947, 1991.
- MARTIN, J.P. Manipulation of gene expression in the development of antibiotic production. In: HUTTER, R. *et al.*, (Eds). *Antibiotics and others secondary metabolites*. Academic Press, London, 1978.
- MATSUMURA, M.; IMANAKA, T.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H. Effect of glucose and methionine consumption rates on cephalosporin C production by *cephalosporium acremonium*. *J. Ferment. Technol.*, **56** (4): 345-353, 1978.
- MATSUMURA, M.; IMANAKA, T.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H. ^(a). Regulation of cephalosporin C production by endogenous methionine in *Cephalosporium acremonium* *J. Ferment. Technol.*, **58** (3): 205-214, 1980.

-
- MATSUMURA, M.; IMANAKA, T.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H. ^(b). Morphological differentiation in relation to cephalosporin C synthesis by *Cephalosporium acremonium*. *J. Ferment. Technol.*, **58** (3): 197-204, 1980.
- MATSUMURA, M.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H. Synthesis of cephalosporin C by a methionine analogue resistant mutant of *Cephalosporium acremonium*. *Eur. J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 114-118, 1982.
- MEHTA, R.J.; SPETH, J.L.; NASH, C.H. Lysine Stimulation of cephalosporin C synthesis in *Cephalosporium acremonium*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 177-182, 1979.
- MILLER, T.L. & CHURCHILL, B.W. Substrate for large - scale fermentation. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington, Amer. Society Microbiolog., 1986.
- MIMIÇA, I.; SEGURA, A.; MONTELLI, A.; KESSELRING, G.L.; RIBEIRO, J.E.; MAMIZUKA, E.; COSTA, L.; SAMPAIO, J.; MENDES, C.M. Avaliação da atividade da nova cefalosporina de quarta geração cefpiroma contra amostras clínicas isoladas em unidades de oncoematologia de vários hospitais brasileiros. *Rev. Bras. Med.*, **53**: 7, 1996.
- NASH, C.H. & HUBER, F.M. Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Microbiol.*, **22**: 6-10, 1971.
- NASH, C.H.; RAJANIKANT, J.M.; BALL, C. *Cephalosporium acremonium*: A β -lactam antibiotic - producing microbe. In: DEMAIN, A.L. & SOLOMON, A.N. Biology of industrial microorganism, The Benjamin Publishing Company Inc. Menlo Park, CA, 1985.

-
- NUESCH, J.; TREICHLER, H.J.; LIERSCH, M. The biosynthesis of cephalosporin C. In: VANEK, Z.; HOSTALKEK, Z.; CUDLIN, J. (Eds.). *Genetic of industrial microorganism*. Amsterdam Elsevier Publishing Co., 1973.
- PAN, C.H.; SPETH, S.V.; MCKILLIP, E.; NASH, C.H. Methyl oleate-based fermentation medium for cephalosporin C production. *Dev. Ind. Microbiol.*, **23**: 315-323, 1982.
- PEREZ-MARTINEZ, G. & PEBERDY, J.F. Production of cephalosporin C, and its intermediates, by raised strains of *Acremonium chrysogenum*. *Enz. Microb. Technol.*, **7**: 389-394, 1985.
- PRAVE, P.; FAUST, U.; SITTING, W.; SUKATSCH, D.A. Fundamentals of biotechnology, VCH, Weinheim, 1987.
- PROSSER, J.I. & TOUGH, A.J. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganism. *Crit. Rev. Microbiol.*, **10**: 253-273, 1991.
- QUEENER, S.W. & ELLIS, L.F. Differentiation of mutants of *Cephalosporium acremonium* in complex medium: the formation of unicelular arthrospores and their germination. *Can. J. Microbiol.*, **21**: 1981-1996, 1975.
- SANCHES, S.M.E. FLORES & DEMAIN, A.L. Nitrogen regulation of penicillin and cephalosporin fermentation. IN: Nitrogen source control of microbial processes (Sanchez-Esquivel, S., ed), CRC Press, Boca Raton, 1988.
- SAVIDGE, T.A. Enzymatic conversions used in production of penicillins and cephalosporins. In: VANDAMME, E.J. *Biotechnology of Industrial antibiotics*, Marcel Dekker, New York, 1984.

-
- SCHEIDEGGER, A.; KUENZI, M.T.; NUUESCH, J. Partial purification and catalytic properties of bifunctional enzyme in the biosynthetic pathway of β -lactams in *Acremonium chrysogenum*. *J. Antibiot.* **37**: 522-531, 1984.
- SCHEIDEGGER, A.; KUENZI, M.T.; FIECHTER, A.; NUUESCH, J. Effect of glucose and oxygen on β -lactam biosynthesis by *Cephalosporium acremonium*. *J. Biotechnol.* **7**:131, 1988
- SHEN, Y.Q.; HEIM, J.; SOLOMON, N.A.; WOLFE, S.; DEMAIN, A.L. Repression of β -lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen source. *J. Antibiot.* **37**: 503-511, 1984.
- SHEN, Y.Q.; WOLFES, S. & DEMAIN, A.L. Levels of isopenicillin N synthetase in *Cephalosporium acremonium* producing high and low levels of cephalosporin C. *Bio/technology*, **4**: 61-64, 1986.
- SKATRUD, P.L.; TIETZ, A.J.; INGOLIA, D.; CANTWELL, C.A.; FISCHER, D.L.; CHAPMAN, J.L.; QUEENER, W. Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. *Bio/Technology*, **7**: 477-485, 1989.
- SMITH, B.; WARREN, S.C.; NEWTON, G.G.F.; ABRAHAM, E.P. Biosynthesis of penicillin N and cephalosporin C. *Biochem. J.*, **103**: 877-890, 1967.
- SMITH, A. "Cephalosporins" In: *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3. Pergamon Press Oxford New York, 168, 1985.

-
- USHER, J.J.; LEWIS, M.A.; DORIS, W.; COMPTON, B.J. Development of cephalosporin C taking into account the instability of cephalosporin C. *Biotech. Let.*, **10**: 543-548, 1988.
- VIALTA, A. Genética e produção de cefalosporina C na linhagem C-10 de *A.chrysogenum*. Campinas. 1994, 147p. (Doutorado - Instituto de Biologia/UNICAMP).
- VICIK, S.M.; FEDOR, A.J.; SWARTZ, R.W. Defining an optimal carbon source/methionine feed strategy for growth and cephalosporin formation by *Cephalosporium acremonium*. *Biotechnol. Prog.* **6**: 333-340, 1990.
- WALTON, R.B. Process for producing 7-aminocephalosporanic acid. U.S. Patented 3.239.394 de 08.03.66, propriedade da Merck & Co.
- WEIL, J.; MIRAMONTI, J.; LADISCH, R. Cephalosporin C: Mode of action and biosynthetic pathway. *Enzyme Microb. Technol.*, **17**: 85-87, 1995.
- WEINBERG, E.D. Secondary metabolism: control by temperature and inorganic phosphate. *Dev. Ind. Microbiol.* **15**:70-81, 1974.
- WHITE, E.R.; CARROL, A.; ZAREMBO, J.E. Reverse phase high speed liquid chromatography of antibiotics. *J. Antibiot.*, **30**: 811-818, 1977.
- WOLFE, S. & DEMAIN, A. The use of enzymes in the synthesis of β -lactam antibiotics. *Pharm. Technol.*, **11**: 28, 1987.
- YANG, Z.; SCHUUGERL, K.; LUCAS, L. The inhibitory mechanisms of glucose and carbon dioxide on the biosyntheses of penicillins and cephalosporins. *J. Biotechnol.* **51**:137-148, 1996.

-
- ZANCA, D.M.; MARTIN, J.F. Carbon catabolite regulation of the conversion of penicillin N into cephalosporin C. *J. Antibiot.*, **36**: 700-708, 1983.
- ZHANG, J.; WOLFE, S.; DEMAIN, A.L. Methionine induction of ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*. *J. Indust. Microbiol.*, **2**: 251-255, 1987.
- ZHANG, J.; WOLFE, S.; DEMAIN, A.L. Phosphate repressible and inhibitable β -lactam synthesis in *Cephalosporium acremonium* strain C-10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**: 242-247, 1988.
- ZHANG, J. & DEMAIN, A.L. Regulation of ACV synthetase in penicillin and cephalosporin producing microorganisms. *Biotech. Adv.* **9**: 623-641, 1991.
- ZHOU, W.; RIEGER, H.R.; DORS, M.; SCHUGERL, K. Influence of medium composition on the cephalosporin C production with a highly productive strain *Cephalosporium acremonium*. *J. Biotechnology*, **23**: 315-329, 1992.