



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia
Departamento de Genética e Evolução

Genética e Produção de Cefalosporina C
na Linhagem C-10 de
Acremonium chrysogenum

Airton Vialta

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor em Genética

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (o) candidato (a) Airton Vialta
e aprovada pela Comissão Julgadora

Orientador: Dr. João Lúcio de Azevedo

J. L. Azevedo
05/08/94

Campinas - SP
1994

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
V.	V653g
Ex.	g
MBO BC/	22.8.23
OC.	286/94
	D <input checked="" type="checkbox"/>
	R\$ 11,00
	27.10.94
	(91)

OUT.

NO CAIXA de U653g

CM-00064739-8 ✓

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e em especial:

Ao Professor Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação, amizade, atenção e estímulo.

À Cleide Marques Ferreira, que por dois anos fez parte de nossa equipe na CODETEC, pela inestimável ajuda no desenvolvimento deste trabalho, amizade e estímulo.

Ao Professor Aquiles E. Piedrabuena, pelo valioso auxílio na análise estatística.

Ao Dr. José Carlos Campana Gerez, diretor-superintendente da CODETEC, pelas facilidades concedidas para a realização deste trabalho.

À Ingrid, pela importante ajuda com as técnicas moleculares, amizade e estímulo.

Ao Alfredo e Regina, pela amizade e apoio constantes.

Aos funcionários do Departamento de Genética e Evolução.

Aos amigos da CODETEC, pela importante colaboração em vários segmentos deste trabalho, pela amizade e constante incentivo: Setor de Biotecnologia (Isabel, Anne, Iriani, Sandra, Akira, Yemiko, Mitsugo e Meire); Setor de Análises (Jeane, Fabiana, Paulo, Marili, Ângela, Rosana e Lucimara; e Setor de Apoio (Márcia, Nilva, Norma, Cláudia, Cidinha e Juvenal).

Ao pessoal do CEBMEG, pela colaboração nas maxi-preparações de plasmídeos, em especial Suzi, Maria Helena e Edi. Também à Professora Yoko B. Rosato, pela ajuda com os mutantes resistentes ao selenato.

Ao Professor Wanderley, ao Marcelo e à Fabiana, pela ajuda na preparação dos plasmídeos.

À Sole pela compreensão, dedicação e estímulo.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro recebido através do programa RHAE.

À CODETEC pelo apoio, facilidades e auxílio concedidos.

Dedico este trabalho à memória do Professor Renato Bonatelli Junior que, além de um grande amigo, orientou meu mestrado e parte do doutorado. Infelizmente ele se foi, deixando em sua área de atuação uma lacuna que dificilmente será preenchida. A seriedade, o critério, a dedicação e a competência com que sempre conduziu seu trabalho fez dele um excelente orientador e um pesquisador de expressão dentro da comunidade científica.

Muitas saudades do amigo Renato.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 O gênero <i>Acremonium</i>	5
2.2 Produção de cefalosporina C	7
2.2.1 Microrganismos	7
2.2.2 O processo fermentativo	9
2.2.3 Meios de produção	12
2.2.3.1 Fonte de carbono	12
2.2.3.2 Fontes de nitrogênio	13
2.2.3.3 Fontes de fósforo	13
2.2.3.4 Fontes de enxofre	14
2.2.3.5 Outros nutrientes	15
2.2.4 O processo de extração e purificação	15
2.3 A cefalosporina C	16
2.4 Análise das cefalosporinas	19
2.4.1 Colorimétrica	19
2.4.2 Microbiológica	19
2.4.3 HPLC	20
2.4.4 Análise do crescimento	20
2.4.5 Análise de açúcares	21
2.5 Metabolismo do enxofre	21
2.6 Melhoramento genético de <i>A. chrysogenum</i>	25
2.6.1 Técnicas clássicas	26
2.6.2 Técnicas modernas	28
2.7 Protoplastos	34
2.8 Benomil	37
2.9 Higromina B	38
2.10 Alguns destaques da revisão	39

3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Linhagens	41
3.2 Meios de cultura	44
3.2.1 Meio mínimo - MM	44
3.2.2 Meio mínimo sem enxofre - MMS-	44
3.2.3 Meio completo - MC	44
3.2.4 Meio de pré-fermentação	45
3.2.5 Meio de fermentação	45
3.2.6 Meio sólido de produção	45
3.2.7 Meio de produção de micélio - MPM	46
3.2.8 Caldo soja tripticaseína ou "tryptic soy broth" - TSB	47
3.2.9 Agar soja tripticaseína ou "tryptic soy agar" - TSA	47
3.2.10 Meio TSA 50%	47
3.2.11 Meio TSA com 10,3% de sacarose	47
3.2.12 Meio completo com 10,3% de sacarose	47
3.2.13 Meio completo com 20% de sacarose	48
3.2.14 Meio LB	48
3.3 Soluções	48
3.3.1 Solução salina	48
3.3.2 Soluções de selenato de sódio	48
3.3.3 Solução de cromato de sódio	49
3.3.4 Solução de benomil	49
3.3.5 Solução reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS)	49
3.3.6 Solução estabilizante de cor	49
3.3.7 Tampão para protoplastos - TPC	50
3.3.8 Solução de ditiotreitól 0,01 M	50
3.3.9 Solução de Novozym 324	50
3.3.10 Solução de Lysing Enzymes (Novozym 324)	50
3.3.11 Solução NaCl 0,8 M	50
3.3.12 Solução estoque de Tris - HCl 1 M, pH 8,0	51

3.3.13	Solução estoque de Tris - HCl 1 M, pH 7,5	51
3.3.14	Solução estoque de EDTA 0,5 M, pH 8,0	51
3.3.15	Solução estoque de NaCl 5 M	51
3.3.16	Solução estoque de SDS	51
3.3.17	Solução estoque de glicose	52
3.3.18	Solução I	52
3.3.19	Solução II	52
3.3.20	Solução III	53
3.3.21	Tampão TE	53
3.3.22	Tampão R	53
3.3.23	Solução L	53
3.3.24	Tampão Tris de equilíbrio	53
3.3.25	Tampão Tris para estocagem	54
3.3.26	Tampão NCM	54
3.3.27	Tampão CCM	54
3.3.28	Solução clorofane	55
3.3.29	Solução clorofil	55
3.3.30	Solução estoque de RNase (10 mg/ml)	55
3.3.31	Solução de PEG 4000 a 40%	55
3.3.32	Solução estoque de higromicina B (Sigma)	56
3.4	Esterilização e temperatura de incubação	56
3.5	Curvas de resistência à luz ultravioleta	56
3.6	Crescimento da linhagem C-10 em vários meios de cultura	57
3.6.1	Em meio sólido	57
3.6.1.1	Em diluição para contagem	57
3.6.1.2	Em inóculo por ponto	57
3.6.2	Em meio líquido	58
3.6.3	Em meio líquido com agitação	58
3.7	Metodologia utilizada nos testes de produção de cefalosporina C	58
3.7.1	Acúmulo de cefalosporina C em função do tempo	58
3.7.1.1	Pré-fermentação	58
3.7.1.2	Fermentação	59
3.7.2	Dosagem de cefalosporina C	59

3.7.2.1	Método microbiológico	59
3.7.2.2	Dosagem por HPLC	60
3.7.3	Determinação de açúcares redutores pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS)	61
3.7.3.1	Determinação de açúcares redutores	61
3.7.3.2	Determinação de açúcares redutores totais	61
3.8	Curva do halo de inibição em função do tempo de incubação	62
3.9	Isolamento ao acaso de colônias com maior produção de cefalosporina C em meio sólido	62
3.10	Isolamento e teste das colônias de crescimento vegetativo reduzido	63
3.11	Teste dos isolados "+"	63
3.12	Teste dos mutantes de crescimento reduzido "+" e dos três melhores produtores entre os isolados ao acaso "+"	64
3.13	Curvas de resistência ao selenato	64
3.13.1	Em MMS ⁻ contendo D,L-metionina	64
3.13.2	Em MMS ⁻ sem D,L-metionina	65
3.14	Curva de resistência ao cromato de sódio	65
3.14.1	Em MMS ⁻ contendo 10 mg/l de D,L-metionina	65
3.15	Isolamento de mutantes espontâneos resistentes ao selenato	65
3.16	Teste de confirmação de resistência ao selenato	66
3.17	Caracterização dos mutantes resistentes ao selenato	66
3.18	Caracterização dos mutantes resistentes ao selenato quanto a serem cromato sensíveis ou cromato resistentes	66
3.19	Curvas de resistência ao benomil	67
3.20	Isolamento de mutantes resistentes ao benomil	67
3.20.1	Espontâneos	67
3.20.2	Induzidos	67
3.21	Caracterização dos prováveis resistentes ao benomil	68
3.22	Resistência comparativa ao benomil em MC contendo 10,3% de sacarose	68

3.23	Curva de resistência à higromicina B de micélio e protoplastos da linhagem C-10	68
3.24	Isolamento dos mutantes resistentes à higromicina B	69
3.24.1	Espontâneos	69
3.24.2	Induzidos	69
3.25	Caracterização dos mutantes resistentes à higromicina B	69
3.26	Obtenção de protoplastos	70
3.27	Maxipreparação do plasmídeo <i>pBT 6</i>	71
3.27.1	Obtenção do caldo	71
3.27.2	Extração (método 1)	71
3.27.3	Extração (método 2)	72
3.27.4	Purificação em gradiente de cloreto de céσιο	72
3.28	Transformação da linhagem C-10	73
3.28.1	Método I	73
3.28.2	Método II	73
3.29	Análise estatística	74
3.29.1	Mann-Withney	74
3.29.2	Kolmogorov-Smirnov	75
3.29.3	Análise de variância	76
4.	RESULTADOS	77
4.1	Porcentagens relativas e curva de sobrevivência da linhagem C-10 à luz ultravioleta	78
4.2	Crescimento da linhagem C-10 em vários meios de cultura	79
4.3	Produção de cefalosporina C da linhagem C-10	82
4.3.1	Curva de acúmulo em função do tempo	82
4.4	Curva do halo de inibição em função do tempo de incubação	83
4.5	Produção em meio sólido das colônias isoladas ao acaso	84
4.6	Isolamento de colônias com crescimento reduzido	85
4.7	Testes fermentativos em "shaker" dos isolados "+" e comparação com a linhagem C-10	85
4.8	Testes fermentativos em "shaker" dos mutantes morfológicos e comparação com a linhagem C-10	87

4.9	Comparação de produção entre a linhagem C-10 e seus derivados A-79, A-818, A-1191, M-5, M-76 e M-90	90
4.10	Porcentagens relativas, curva de sobrevivência e frequência de prováveis mutantes da linhagem C-10 ao tratamento com selenato	91
4.11	Porcentagens relativas, curva de sobrevivência e frequência de prováveis mutantes da linhagem C-10 ao tratamento com cromato	95
4.12	Caracterização dos mutantes resistentes ao selenato	97
4.13	Caracterização dos mutantes resistentes ao selenato quanto a serem cromato sensíveis ou cromato resistentes	98
4.14	Crescimento da linhagem C-10 e dos mutantes sC^{-1} , sC^{-2} e sB^{-} em MMS- líquido sob agitação	98
	quanto a serem cromato sensíveis ou cromato resistentes	98
4.15	Comparação de produção entre a C-10 e os mutantes resistentes ao selenato	99
4.16	Porcentagens relativas, curva de sobrevivência e frequência de prováveis mutantes da linhagem C-10 ao tratamento com benomil	100
4.17	Caracterização dos prováveis mutantes resistentes ao benomil	102
4.18	Resistência ao benomil em MC contendo 10,3% de sacarose	102
4.19	Resistência à higromicina B em MC contendo 10,3% de sacarose	103
4.20	Isolamento de mutantes resistentes à higromicina B	104
4.21	Caracterização dos mutantes resistentes à higromicina B	104
4.22	Protoplastização da linhagem C-10	106
	4.22.1 Teste com a enzima	106
	4.22.2 Teste com meios diferentes	106
	4.22.3 Testes com MC contendo 20% de sacarose	107
	4.22.4 Protoplastização utilizando MC + 10,3% de sacarose como estabilizador osmótico	107
4.23	Preparação do plasmídeo pBT 6 em larga escala	108

4.24	Transformação	109
5.	DISCUSSÃO	110
5.1	Crescimento da linhagem C-10 em vários meios de cultura	111
5.2	Produção de cefalosporina C	112
5.2.1	Curva de acúmulo	112
5.2.2	Produtividade da linhagem C-10	112
5.2.3	Produção dos isolados ao acaso	115
5.2.3.1	Em meio sólido	115
5.2.3.2	Em meio líquido sob agitação	116
5.2.4	Produção dos mutantes com crescimento reduzido em "shaker"	117
5.3	Isolamento de mutantes resistentes	118
5.3.1	Ao selenato e/ou cromato	118
5.3.2	Ao benomil	120
5.3.3	À higromicina B	121
5.4	Protoplastização	122
5.5	Preparação do plasmídeo pBT 6	124
5.6	Transformação	124
6.	CONCLUSÕES	126
7.	RESUMO	128
8.	SUMMARY	130
9.	BIBLIOGRAFIA	132

ÍNDICE DE TABELAS

1. Porcentagens relativas de sobrevivência das unidades formadoras de colônias (UFC) da linhagem C-10 ao tratamento com luz UV	78
2. Número de colônias crescidas da linhagem C-10 nos diferentes meios de cultura	80
3. Médias dos diâmetros (em mm) das colônias da linhagem C-10 após 10 e 21 dias de incubação em diferentes meios	81
4. Pesos secos e úmidos da linhagem C-10 crescida em meios de cultura líquido sob agitação	81
5. Dados referentes à curva de acúmulo da cefalosporina C em função do tempo	82
6. Diâmetro dos halos (em mm) obtidos com o uso de <i>Alcaligenes faecalis</i> nos vários intervalos de incubação	84
7. Níveis de produção apresentados pelos isolados selecionados ao acaso após 5 dias de incubação	84
8. Produção de cefalosporina C (g/l) da linhagem C-10 e dos isolados ao acaso	86
9. Produção de cefalosporina C (g/l) dos mutantes com crescimento radial reduzido	88
10. Produção de cefalosporina C da linhagem C-10 e alguns de seus mutantes e derivativos	90

11. Análise de variância dos dados da tabela 10	90
12. Comparação das médias pelo teste de Tukey	91
13. Porcentagens relativas de sobrevivência das unidades formadoras de colônias (UFC) da linhagem C-10 ao tratamento com selenato	92
14. Crescimento e frequência de prováveis mutantes da linhagem C-10 em MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina contendo várias concentrações de selenato	94
15. Crescimento e frequência de prováveis mutantes da linhagem C-10 em MMS ⁻ contendo várias concentrações de selenato e $1,4 \times 10^6$ UFC/placa	94
16. Condições de isolamento dos prováveis mutantes espontâneos resistentes ao selenato	95
17. Porcentagens relativas de sobrevivência das unidades formadoras de colônias (UFC) da linhagem C-10 em MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina contendo várias concentrações de cromato	96
18. Crescimento e frequência de prováveis resistentes da linhagem C-10 em MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina contendo várias concentrações de cromato e 10^6 UFC/placa	96
19. Peso seco (em mg) das linhagens crescidas em meio líquido sob agitação	98
20. Produção de cefalosporina C (g/l) apresentada pela linhagem C-10 e mutantes resistentes ao selenato, utilizando o método de dosagem por HPLC	99

21. Porcentagens relativas de sobrevivência das unidades formadoras de colônias (UFC) da linhagem C-10 ao tratamento com benomil	101
22. Crescimento da linhagem C-10 em MC contendo várias concentrações de benomil	102
23. Crescimento comparativo em MC + sacarose contendo várias concentrações de benomil	103
24. Crescimento comparativo de micélio e protoplastos da linhagem C-10 em MC + 10,3% de sacarose	104
25. Crescimento (em %) da linhagem C-10 e seus mutantes resistentes à higromicina	105
26. Dados referentes à obtenção de protoplastos utilizando enzima de duas procedências	106
27. Dados referentes à obtenção de protoplastos utilizando meios diferentes	107
28. Produção de protoplastos em MC contendo diferentes concentrações de sacarose	107
29. Produção de protoplastos apresentada pela linhagem C-10 em MC + 10,3% de sacarose	108
30. Dados relativos às preparações do plasmídeo pBT 6	108
31. Condições utilizadas para transformação com o plasmídeo pBT 6	109

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Genealogia de linhagens de <i>A. chrysogenum</i> com produção aumentada, utilizadas na indústria e/ou estudos genéticos	8
2. Via biossintética da cefalosporina C	11
3. Núcleo cefalosporânico com as posições que podem receber radicais	17
4. Ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA)	17
5. Vias do metabolismo do enxofre em leveduras e fungos	24
6. Mapa de restrição do plasmídeo pBT6 (5,7 kb)	42
7. Mapa de restrição do plasmídeo pAN7-1	43
8. Curva de sobrevivência da linhagem C-10 à luz UV	79
9. Curva de acúmulo da cefalosporina C em função do tempo	83
10. Níveis de produção dos isolados ao acaso	85
11. Níveis de produção da linhagem C-10 e dos isolados ao acaso "+"	87
12. Níveis de produção da linhagem C-10 e dos mutantes morfológicos	89
13. Curva de sobrevivência da linhagem C-10 ao tratamento com selenato	93

14. Curva de sobrevivência da linhagem C-10 ao tratamento com cromato	97
15. Distribuição dos valores apresentados na tabela 20	100
16. Curva de sobrevivência de linhagem C-10 ao tratamento com benomil	101

1: INTRODUÇÃO

Os antibióticos β -lactâmicos constituem atualmente um dos grupos de fármacos mais importantes do ponto de vista comercial. O contínuo valor clínico destas substâncias reflete-se em seu mercado mundial que é da ordem de US\$ 7,5 bilhões/ano (formas acabadas), valor que representa 60% de todos os antibióticos comercializados no mundo. Desse total, US\$ 3 bilhões correspondem às penicilinas e US\$ 3,5 bilhões às cefalosporinas (BOUCOURT, 1981; BROWN e ROBERTS, 1985; EARL, 1991).

Assim como ocorre com outras substâncias naturais de estrutura similar, a cefalosporina C não possui atividade suficiente *in vivo* para ser utilizada clinicamente. Depois de produzida via fermentação, ela é extraída do caldo, purificada e transformada em ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), matéria-prima para a síntese de todas as cefalosporinas.

As primeiras linhagens de *Acremonium chrysogenum* utilizadas industrialmente produziam traços de cefalosporina C. A combinação melhoramento genético e desenvolvimento de processo possibilitou elevar a produção para mais de 25 g/l nas culturas atuais.

Até por volta de 1985, o melhoramento genético das linhagens de *A. chrysogenum* era conduzido utilizando-se exclusivamente técnicas clássicas. Os extensos programas empíricos de mutação e seleção aos quais eram e ainda são submetidas as linhagens, apesar de bem sucedidos, acabam causando problemas pois à medida que a produtividade aumenta, diminui a probabilidade de se isolar mutantes ainda melhores e aumenta a dificuldade de identificar os isolados obtidos contra o "background" da população parental. Além disso, a fim de detectar um evento relativamente raro, é necessário que se teste um grande número de isolados (SMITH, 1985).

A partir da segunda metade da década de 70, o desenvolvimento das técnicas de obtenção e fusão de protoplastos trouxe nova possibilidade de melhoramento (MINUTH e ESSER, 1983) e permitiu elucidar de vez o ciclo parassexual de *A. chrysogenum* (BALL e HAMLYN, 1978).

Somente a partir de 1985, com os trabalhos de SAMSON e seus colegas da empresa Eli Lilly é que foram utilizadas técnicas moleculares nos programas de melhoramento. Uma das maiores vantagens desta estratégia é o direcionamento dos objetivos a serem alcançados, que normalmente permite conseguir isolados com ganho de produtividade testando-se apenas algumas dezenas de colônias, contra as milhares exigidas nos programas de melhoramento envolvendo técnicas tradicionais (SKATRUD et al., 1989).

É bom lembrar que, embora em menor proporção, as técnicas clássicas são empregadas até hoje. LEIN (1983) enumera vários exemplos de como estas técnicas podem ser utilizadas nos programas de melhoramento, como elas podem contribuir para solucionar problemas que

No início da década passada, a empresa PANLABS depositou na American Type Culture Collection, sob número 48272, uma linhagem super-produtora de cefalosporina C chamada C-10, desenvolvida nos laboratórios da referida empresa e utilizada industrialmente por alguns anos. Capaz de produzir 16 g/l de cefalosporina C (SHEN et al., 1986) ou entre 10 a 13 g/l (R. T. ROWLANDS, comunicação pessoal) em meio complexo quando cultivada em agitador, a linhagem C-10 surgiu como uma rara oportunidade para quem deseja desenvolver um processo desta natureza. Ou seja, há a oportunidade de se iniciar com uma linhagem de produção mediana quando comparada com aquelas utilizadas atualmente pela indústria. Na grande maioria dos casos, as linhagens disponíveis em coleções de culturas produzem quantidades insignificantes das substâncias desejadas.

O objetivo inicial do presente trabalho foi elaborar vários testes de fermentação com agitação, utilizando a linhagem C-10 visando reproduzir os níveis de produtividade a ela atribuídos, ou seja, obter no caldo uma concentração final de 10 a 16 g/l de cefalosporina C.

Concluída esta etapa, a linhagem C-10 foi submetida a um programa de melhoramento genético composto por duas estratégias. Na primeira, as colônias que produziram halo de inibição em meio sólido foram selecionadas ao acaso e aquelas que apresentaram maior produtividade foram ensaiadas em plataformas agitadas. A segunda estratégia consistiu em uma seleção racional dos isolados. Foram ensaiadas colônias que apresentaram crescimento vegetativo reduzido, tendo em vista que esta característica tem sido correlacionada com o aumento de produção de cefalosporina C (CHANG e ELANDER, 1979).

Na seqüência, mutantes resistentes ao selenato e/ou cromato, que apresentam lesões nos genes da via de redução do sulfato, foram isolados, caracterizados e ensaiados quanto à produção de cefalosporina C. A razão de se estudar aspectos relacionados com a via do enxofre reside no fato da molécula da cefalosporina C conter um átomo deste elemento.

Finalmente, também foi objetivo deste trabalho transformar a linhagem C-10 usando os plasmídios pBT6 e pAN7-1 que contém, respectivamente, o gene da β -tubulina de *Neurospora crassa* e o gene da higromicina B fosfotransferase de *Escherichia coli*. Caso estes sistemas heterólogos sejam eficientes, eles poderão ser utilizados no futuro para a introdução de outros genes que não possuam técnica seletiva adequada.

2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Acremonium*

O gênero *Acremonium* pertence à classe Hyphomycetes de Deuteromycotina ou Fungos Imperfeitos. Apresenta ampla distribuição geográfica, estando particularmente associado com a senescência de vegetais, de tal forma que a maioria dos estudos florísticos realizados em vários tipos de solos e em superfícies de plantas inclui espécies deste gênero na lista de fungos isolados. A competência metabólica deste gênero pode ser constatada pelo fato dele apresentar bom crescimento em meios relativamente simples, tais como Czapek. Produz fiálides individuais diretamente das hifas, na superfície ou dentro do substrato. O gênero *Acremonium* destaca-se pelo seu valor econômico visto que pelo menos uma de suas espécies é utilizada industrialmente na produção de cefalosporina C (MOSS, 1987).

Acremonium apresenta crescimento mais ou menos lento em ágar extrato de malte e em ágar farinha de aveia, onde suas colônias atingem diâmetros menores que 25 mm após 10 dias a 20°C. Possui hifas hialinas e paredes finas. Tipicamente, as células conidiogênicas, ou fiálides, são eretas e formadas singularmente, mas conidióforos com ramificação simples ou verticilada ocorrem em algumas espécies. As fiálides são normalmente delimitadas por um septo basal, ocasionalmente contínuo com a hifa a partir da qual elas são formadas, estreitando-se gradualmente à medida que se caminha para a extremidade. O primeiro conídio é formado holoblasticamente, a sucessão é esquizolítica, algumas vezes deixando um curto colarete; os próximos conídios são produzidos enteroblasticamente sem que ocorra alongamento na extremidade da fiálide. Conídio hialino, constituído de uma única célula, raramente duas, esférico, oval, elipsoidal, cilíndrico ou fusiforme, ficando contido, depois da sucessão, na extremidade das fiálides numa "cabeça" ou numa falsa cadeia. Clamidosporos algumas vezes são formados. Esclorótia são produzidos em certos casos. Algumas espécies apresentam fase teleomórfica; Elas estão em *Cordyceps*, *Nectria*, *Emericellopsis*, *Torrubiella*, *Wallrothiella*, e alguns outros gêneros (ONIONS e BRADY, 1987)

O termo *Cephalosporium* foi introduzido por CORDA em 1939 para designar fungos sem coloração e com conidióforos simples não ramificados e que apresentavam fiálides envolvidas por um grupo ou "cabeça" de conídios unicelulares, de onde o nome foi derivado. Naquela época, pouco se sabia sobre as inter-relações destes fungos, e o nome passou a ser utilizado para uma ampla variedade de Hyphomycetes (ONIONS e BRADY, 1987).

Foi Gams que em 1968 reexaminou espécies do material original (tipo) de *Acremonium*, descrito por Link em 1809 e que tem prioridade de nomenclatura sobre *Cephalosporium*. Este material foi bem preservado e permitiu a Gams que redescrevesse o gênero, a partir de culturas vivas obtidas dos antigos isolados de *A. alternatum* Link, e aplicasse o nome *Acremonium* para fungos hialinos que formam fiálides eretas em conidióforos esparçadamente ramificados, onde é incluída a maioria das espécies inicialmente referidas como

Cephalosporium. Porém, muitos autores já vinham utilizando o nome *Cephalosporium acremonium* para todos estes fungos (ONIONS e BRADY, 1987).

Como a história deste nome é muito confusa, Gams descreveu uma nova espécie (*A. strictum*) para englobar todos estes fungos e conservou *A. kiliense* Grütz (o nome inicial) para formas muito similares que adicionalmente produzem clamidosporos hialinos, que frequentemente são isolados do solo e que têm sido associados com infecção de pele em humanos (ONIONS e BRADY., 1987).

Apesar de *A. strictum* ser o nome taxonomicamente correto, ele é muito pouco utilizado. A grande maioria dos autores utiliza os nomes *C. acremonium* e *A. chrysogenum* para designar as inúmeras linhagens desta espécie produtora de cefalosporina C.

No presente trabalho será utilizado *A. chrysogenum* uma vez que esta tem sido a denominação de preferência dos pesquisadores nos últimos anos.

A espécie *Acremonium strictum* Gams é descrita como produzindo colônias com 16 a 25 mm de diâmetro após 10 dias de crescimento em ágar extrato de malte, que apresentam cor variável de branco a creme, rosa ou laranja, aspecto variável de farinha ou pó até liso ou macio e o reverso da placa mantem-se sem cor ou torna-se levemente róseo ou alaranjado. Os conidióforos são simples ou ocasionalmente ramificados. As células conidiógenas são longas e estreitas, e seu comprimento varia de acordo com a linhagem. Conídios elipsoidais, achatadas, cilíndricos de extremidades arredondadas, ocasionalmente curvos, algumas vezes quase esféricos, de 3 a 7 por 1 a 2 µm, permanecendo numa "cabeça" no topo das células conidiógenas depois da sucessão. Clamidosporos ausentes. Esta espécie, que inclui aquelas linhagens inicialmente chamadas *Cephalosporium acremontum*, é muito comum em quase todas as regiões e, devido à sua morfologia simples, provavelmente engloba muitas linhagens diferentes que não podem ser distinguidas utilizando os presentes métodos (ONIONS e BRADY, 1987).

É importante ressaltar que a descrição acima foi feita a partir de crescimento em meio sólido e que muitas linhagens de *A. strictum*, além dos conídios, produzem astrosporos quando cultivadas em meio líquido (MOSS, 1987).

2.2 Produção de cefalosporina C

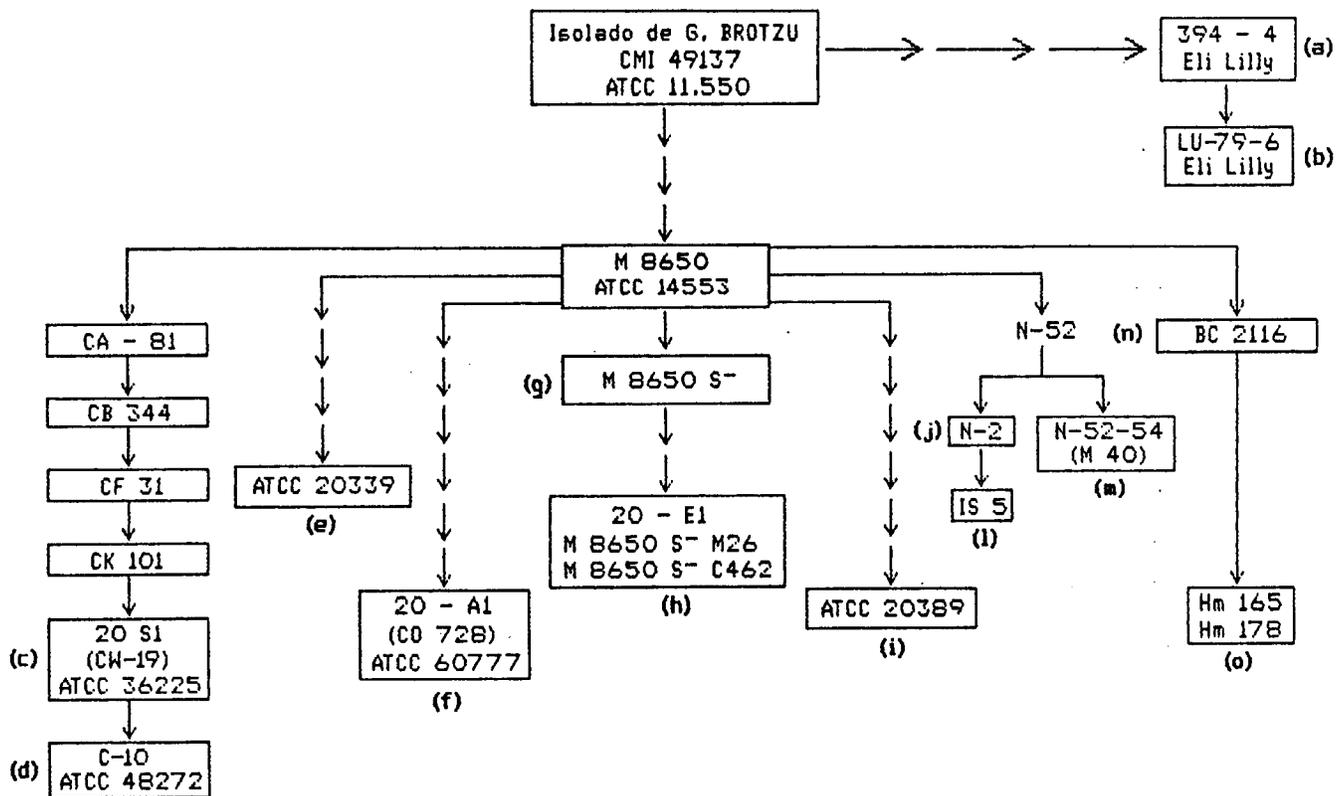
2.2.1 Microrganismos

Embora algumas espécies dos gêneros *Emericellopsis*, *Paecilomyces* e *Streptomyces* sintetizem cefalosporina C, *Acremonium chrysogenum* é o microrganismo utilizado industrialmente para a produção deste antibiótico (CRUEGER e CRUEGER, 1984; PRAVE et al., 1987).

Acremonium chrysogenum foi isolado pela primeira vez a partir de amostras de água do mar da Sardenha por Giuseppe Brotzu, em 1945. Os estudos pioneiros sobre a atividade antibiótica da cefalosporina C foram realizados por E.P. Abraham e G.G.F. Newton em Oxford, a partir de 1948, culminando com a elucidação de sua estrutura em 1961. A importância do novo antibiótico foi logo reconhecida devido à sua baixa toxicidade, amplo espectro e resistência às penicilinas de microrganismos gram-positivos.

A combinação entre seleção de linhagens e desenvolvimento fermentativo, nos últimos 30 anos, permitiu que a cefalosporina C, presente em pequena quantidade nas culturas do isolado original de Brotzu, alcançasse mais de 25 g/l nas linhagens utilizadas atualmente na indústria.

Na figura 1, é apresentada a genealogia de algumas linhagens de *A. chrysogenum* utilizadas na indústria e/ou estudos genéticos.



- (a) - Linhagem melhorada pela Eli Lilly
- (b) - SKATRUD et al (1989)
- (c) - ELANDER (1975)
- (d) - Linhagem desenvolvida pela PANLABS
- (e) - Linhagem desenvolvida pela Alfa Farmaceutici SPA
- (f) - Linhagem desenvolvida pela Glaxo
- (g) - NUESCH et al. (1973)
- (h) - LIERSCH et al. (1976)
- (i) - Linhagem desenvolvida pela Takeda Chemical Industry
- (j) - FUJISAWA e KANZAKI (1975); SHIRAFUJI et al. (1979)
- (l) - KOMATSU et al. (1975)
- (m) - FUJISAWA et al. (1975)
- (n) - PAN et al. (1982)
- (o) - ISOGAI et al. (1991), Estas linhagens super-produtoras de cefalosporina C são capazes de secretar pequenas quantidades de ácido 7-aminocefalosporânico.

Figura 1: Genealogia de linhagens de *A. chrysogenum* com produção aumentada, utilizadas na indústria e/ou estudos genéticos

2.2.2 O processo fermentativo

Apesar da síntese química total da cefalosporina C ser possível, comercialmente só se utiliza a via fermentativa, sendo que atualmente sua produção mundial está em torno de 2.500 toneladas. Em termos de mercado, este número corresponde a 30% das vendas mundiais de antibióticos, cujos valores situam-se na faixa de US\$ 12 bilhões/ano (BOUCOURT, 1981; BROWN e ROBERTS, 1985; EARL, 1991).

A cefalosporina C é um metabólito secundário típico, produzido durante a idiofase, que começa a partir de 60 a 70 horas após o início da fermentação e continua por até 100 horas em processo de batelada (KÜENZI, 1978; CRUEGER e CRUEGER, 1984; SHEN et al., 1986). No caso de batelada alimentada, este período pode ser estendido a 260 horas (KÜENZI, 1978).

KHANG et al. (1988) relatam, ainda, a produção de cefalosporina C por células imobilizadas em alginato de cálcio. Nestas condições, os referidos autores demonstraram que a linhagem CW-19 (Figura 1) apresentou o dobro da produção específica do antibiótico quando comparada com os resultados obtidos numa fermentação tradicional, ou seja, utilizando células livres.

Num típico processo em batelada, a fase de crescimento pode durar de 48 a 70 horas. Neste período, os níveis de açúcares redutores decrescem até atingirem valores próximos de zero e a cefalosporina C começa a ser sintetizada. A concentração de antibiótico alcança seu patamar mais elevado entre o 6º e o 7º dia de fermentação. Para que tudo isso ocorra, é necessário que o pH, a temperatura e a aeração sejam mantidos em patamares adequados durante todo o processo (CRUEGER e CRUEGER, 1984).

Com relação às condições de fermentação, deve ser inicialmente ressaltado que no caso dos microrganismos filamentosos em geral e *A. chrysogenum* em particular, há necessidade de uma agitação eficiente (NASH et al., 1985) e de uma aeração intensa, principalmente na fase de crescimento (KÜENZI et al., 1978). O oxigênio dissolvido no meio deve ser mantido sempre 20% acima da saturação (PAN et al., 1982), pois, entre outras coisas, a falta deste elemento pode levar a uma maior formação de penicilina N (HAROLD et al., 1988), intermediário da via biossintética da cefalosporina C (Figura 2).

A faixa de temperatura utilizada é de 25 a 28°C (CRUEGER e CRUEGER, 1984), embora o uso de 25°C possa levar à formação de hifas mais longas, o que acarreta no aumento da viscosidade e dificulta a difusão de oxigênio (KÜENZI et al., 1978).

A. chrysogenum cresce bem em pH de 4,0 a 9,0. Porém, para produção de cefalosporina C, emprega-se pH 7,0 a 7,7 (CRUEGER e CRUEGER, 1984).

Quando a fermentação é conduzida em plataformas com agitação, é comum utilizar-se frascos erlenmeyers de 500 ml contendo 40 ml de meio e mantê-los por 5 a 7 dias a 25°C e 250 rpm (SHEN et al., 1986). Em outros casos, emprega-se 40 ml de meio em erlenmeyer de 250 ml (HEIM et al., 1984) e 28°C e 180 rpm (PEREZ-MARTINEZ e PEBERDY, 1985). HEROLD et al. (1988), utilizaram erlenmeyers com 4 aletas, 25 a 28°C e 120 a 150 rpm.

Linhagens selvagens de *A. chrysogenum* produzem, além da cefalosporina C, quantidades significativas de outros antibióticos: as cefalosporinas P₁-P₅, que são moléculas de estrutura esteroidal, e precursoras biossintéticas da cefalosporina C (Figura 2): penicilina N, deacetoxicefalosporina C e deacetilcefalosporina C (NASH et al., 1985; SHEN et al., 1986). Os dois últimos diferem apenas no grupo ligado à posição 3 do anel. Através do melhoramento genético das linhagens, conseguiu-se eliminar ou reduzir a níveis muito baixos a produção das cefalosporinas P₁-5 e da penicilina N (CRUEGER e CRUEGER, 1984). No entanto, os processos fermentativos ainda resultam em quantidades consideráveis de deacetilcefalosporina C, não apenas como precursor, mas também como produto da hidrólise da cefalosporina C (BYWOOD et al., 1977). Atualmente, considera-se satisfatório um processo em que a concentração final deste produto não exceda 10% da concentração do produto principal (catálogo PANLABS, 1989). Existe pelo menos um processo patenteado para o aproveitamento de ambos, através de esterificação, extração do caldo fermentado e posterior uso como precursores de derivados semi-sintéticos (BYWOOD, et al., 1977).

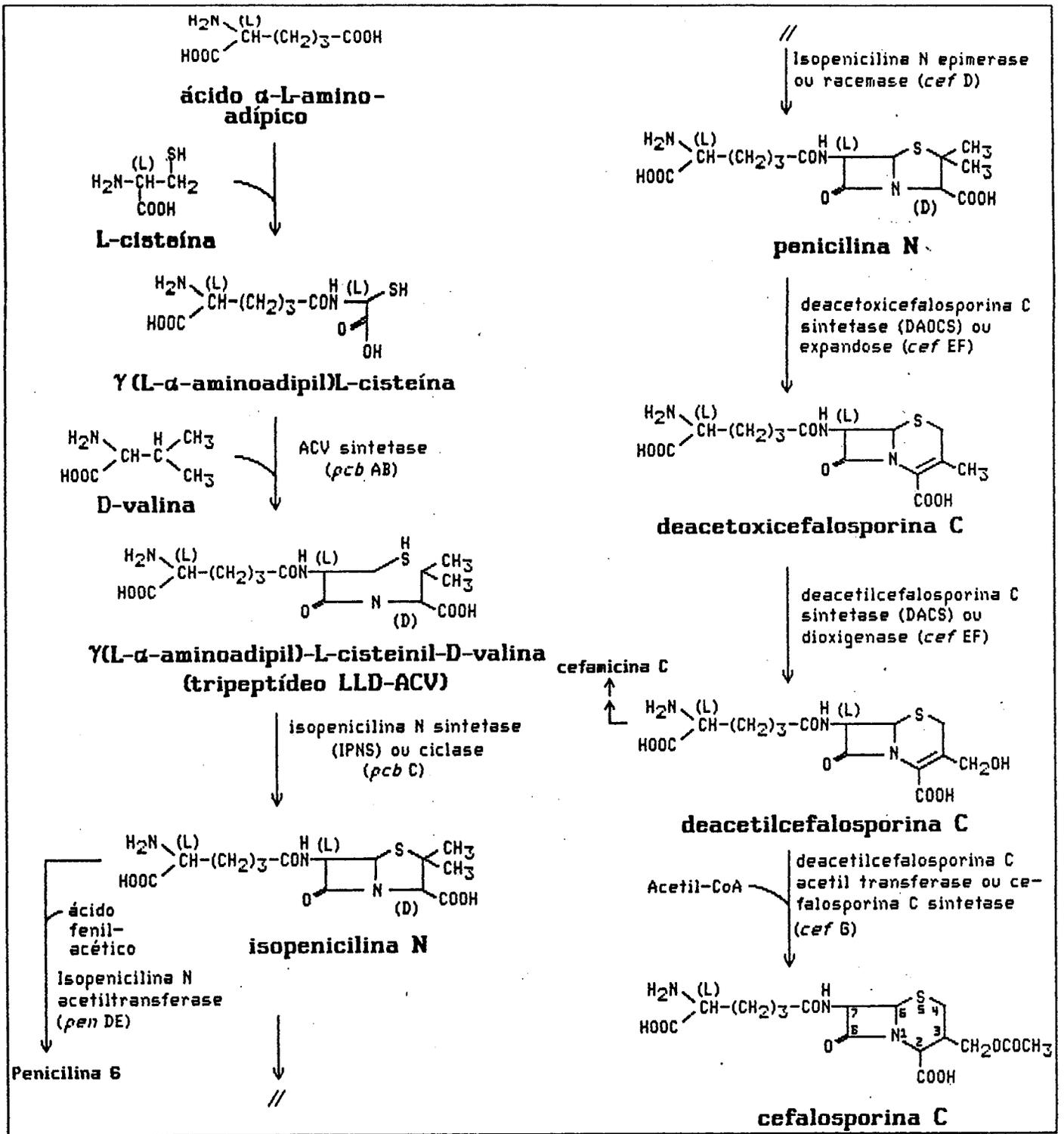


Figura 2: Via biossintética da cefalosporina C

2.2.3 Meios de produção

2.2.3.1 Fontes de carbono

A. chrysogenum é capaz de utilizar, entre outras, as seguintes fontes de carbono: glicose, galactose, frutose, sacarose, lactose, ribose, glicerol, manitol, amido, maltose, arabinose, oleato de metila, óleos vegetais e gordura animal (NASH et al., 1985). Glicose e glicerol são fortes inibidores da produção de cefalosporina C (MARTÍN, 1978; DEMAÏN, 1983; ZHANG et al., 1989).

Na prática industrial, é comum usar meios de cultura contendo duas fontes de carbono: glicose, utilizada na fase de crescimento, e uma segunda fonte não inibidora, utilizada na fase de produção do antibiótico (MARTÍN, 1978). No caso da cefalosporina C, o segundo carboidrato é geralmente a sacarose (KELLY et al., 1963; CRUEGER e CRUEGER, 1984; NASH et al., 1985), que pode estar na forma de melão de beterraba (NASH et al., 1985). Uma combinação que deu bons resultados para as linhagens antigas foi 0,3% de glicose e 1,2% de sacarose (KELLY et al., 1963) enquanto que para algumas linhagens de uso mais recente utiliza-se 2,7% de glicose e 3,6% de sacarose no caso de meios com composição definida e, para meios de produção, emprega-se as mesmas proporções dos dois açúcares acrescido de 3,0% de amido (SHEN et al., 1986).

Aparentemente, algumas linhagens exigem a presença de oleato de metila, ácido oleico, óleos vegetais ou gordura animal nos meios de produção, em concentrações na faixa de 2,0 a 3,0% (KELLY et al., 1963; SHEN et al., 1986). Tais substâncias podem desempenhar a função de anti-espumante e apresenta um menor índice de disponibilidade para o microrganismo, visto que são imiscíveis com a água.

A glicose pode também ser adicionada em pequenas quantidades no decorrer da fase de produção do antibiótico, de forma intermitente ou contínua. Esta estratégia é empregada na produção de penicilina; no caso da cefalosporina C, pode ocorrer crescimento filamentoso, com consequentes dificuldades na difusão de oxigênio (KÜENZLI, 1978; NASH et al., 1985).

Ainda com relação à fonte de carbono, é importante salientar que a maior produtividade da linhagem C-10 em relação à CW-19 (Figura 1), é em parte devida a uma menor sensibilidade ao efeito inibidor da glicose (SHEN et al., 1986), embora ainda esteja sujeita à regulação por este substrato (ZHANG et al., 1989). Além disso, a C-10 é passiva de regulação pela fonte de nitrogênio e à indução pela metionina (ZHANG et al., 1988).

2.2.3.2 Fontes de nitrogênio

A. chrysogenum pode utilizar, entre outros, nitrato, amônio na forma de acetato, cloreto ou sulfato, peptonas, extrato de levedura, farelos, água de milho e outros substratos complexos (NASH et al., 1985). Fontes de nitrogênio rapidamente utilizáveis, são responsáveis pela inibição da síntese de vários antibióticos (MARTÍN, 1978; DEMAIN et al., 1983), inclusive a cefalosporina C (SHEN et al., 1984).

Para a produção de cefalosporina C, as fontes de nitrogênio normalmente utilizadas são: água de milho, acetato de amônio, farelo de amendoim, de soja ou de peixe, e farinha de carne ou soja (CRUEGER e CRUEGER, 1984; NASH et al., 1985; SHEN et al., 1986). Uma combinação utilizada com sucesso para uma linhagem antiga foi a seguinte: água de milho, para fornecer 50 mg N/l (equivalente a cerca de 5% de nitrogênio orgânico total), farinha de carne (equivalente a 300 mg N/l) e farinha de peixe (equivalente a 700 mg N/l). Os dois últimos podem ser substituídos por outras fontes de nitrogênio orgânico, como farinha ou farelo de soja, levedura autolisada, etc (KELLY et al., 1963). Os mesmos autores citam o efeito benéfico da inclusão de acetato de amônio como fonte de nitrogênio inorgânico, em concentração equivalente a 300-350 mg N/l. No caso de linhagens mais recentes, é comum a utilização de meios de produção contendo 6% de farelo de soja e 0,8% de acetato de amônio (SHEN et al., 1986), 10% de farelo de amendoim e 0,6% de acetato de amônio (HAROLD et al., 1988) e 2% de farelo de amendoim mais 2% de farinha de semente de algodão (ZABRISKIE et al., 1980).

SHEN et al. (1984) estudaram várias fontes de nitrogênio e verificaram que sulfato de amônio, cloreto de amônio e uréia foram as que revelaram melhores resultados. A L-asparagina foi ainda melhor que as fontes inorgânicas e sua concentração ótima foi 1,2%.

2.2.3.3 Fontes de fósforo

Fosfato inorgânico é inibidor da produção de muitos antibióticos e outros metabólitos secundários, inclusive cefalosporina C (MARTÍN, 1978; DEMAIN et al., 1983; CRUEGER e CRUEGER, 1984; NASH et al., 1985).

ZHANG et al. (1988), estudando a linhagem C-10, observaram que a melhor faixa de concentração de fosfato inorgânico num meio quimicamente definido ficou entre 10 e 100 mM, tendo sido 25 mM o ponto ótimo. O excesso de fosfato (215 mM) fez com que a produção de cefalosporina C caísse pela metade.

Como os compostos complexos utilizados nos meios de fermentação já contém fosfato suficiente, não realiza-se adição proposital desta substância.

2.2.3.4 Fontes de enxofre

Além do enxofre de origem inorgânica, *A. chrysogenum* é capaz de utilizar cisteína e metionina (NASH et al., 1985). Este último aminoácido, desempenha duas importantes funções na via biossintética da cefalosporina C: é o principal doador de átomos de enxofre e é estimulador (NÜESH et al., 1973; DREW e DEMAIN, 1975; TREICHLER et al., 1978; WANG et al., 1979).

A síntese de cefalosporina C está diretamente associada com os níveis de metionina presentes dentro das células (MATSUMURA et al., 1980). Apesar da D-metionina ser mais efetiva para o acúmulo intracelular, ambos os isômeros (D e L) são precursores e estimuladores quando adicionados ao meio de cultura ainda na fase de crescimento, uma vez que *A. chrysogenum* converte a forma D em L graças à ação de duas enzimas (TREICHLER et al., 1978; WANG et al., 1979).

Atualmente, já existem mutantes de *A. chrysogenum* capazes de produzir eficientemente a cefalosporina C usando apenas sulfato inorgânico (TREICHLER et al., 1978; LEIN, 1983). A metionina causa uma diminuição moderada no crescimento celular do fungo (ZHANG et al., 1987) e inibe a absorção de sulfato do meio extracelular, bem como sua conversão a sulfeto (MATSUMURA et al., 1980).

Outra característica importante atribuída à metionina é a de induzir a diferenciação morfológica das células e aumentar o índice de fragmentação do micélio. No início da fermentação, o tipo morfológico predominante é o de hifas ramificadas, longas e delgadas. Com o decorrer do processo, as células incham e as hifas se partem, dando origem a fragmentos mais curtos que podem ser bastante ou moderadamente inchados. Pouca cefalosporina C é produzida nesta fase. Após 50 horas de cultivo, quando praticamente toda a glicose do meio já foi consumida, ocorre uma intensa fragmentação das hifas longas e inchadas, resultando na formação de hifas pequenas e inchadas. À medida que a quantidade destas formas decresce, aumenta o número de artrosporos unicelulares, que podem ser esféricos ou elipsoidais. Isto significa que os fragmentos de hifas inchadas vão se tornando cada vez menores e, finalmente, convertem-se completamente em artrosporos. A produção de cefalosporina C começa quando toda a glicose é consumida e aumenta durante a formação de artrosporos a partir das hifas inchadas, cessando quando estas desaparecem por completo. Este fenômeno parece sugerir que os fragmentos de hifas inchadas são as estruturas morfológicas primariamente responsáveis pela síntese do antibiótico. É interessante ressaltar

que apesar da formação de artrosporos ocorrer simultaneamente à produção de cefalosporina C, nenhuma relação entre estas duas propriedades foi estabelecida até o momento (QUEENER e ELLIS, 1975; MATSUMURA et al., 1980).

A hipótese de correlação obrigatória entre produção e diferenciação celular é contestada por NASH e HUBER (1971), que isolaram um mutante não produtor de cefalosporina C mas que apresentava todas as formas anteriormente descritas. Os autores constataram o maior potencial de síntese dos artrosporos e atribuem este fato à existência de alguma característica metabólica que permite a estas estruturas serem superiores a outras formas morfológicas.

2.2.3.5 Outros nutrientes

Na maioria dos meios de produção descritos, há a inclusão de carbonato de cálcio em concentrações que usualmente variam de 3 a 16 g/l (ZABRISKIE et al., 1980; SHEN et al., 1986; BAYER et al., 1989). Embora não tenham sido dadas explicações a respeito da necessidade de inclusão desta substância, é possível que se trate simplesmente de um efeito tampão.

2.2.4 O processo de extração e purificação

A molécula de cefalosporina C (Figura 2) possui um aminoácido como cadeia lateral, o que a torna anfotérica e altamente solúvel em água. Conseqüentemente, a extração e purificação deste antibiótico são muito mais difíceis e custosas que no caso da penicilina G, por exemplo, cuja cadeia lateral é apolar e cuja molécula não possui carga em meio ácido, podendo ser facilmente extraída com solventes orgânicos (CRUEGER e CRUEGER, 1984; BYWOOD et al., 1977).

A taxa de degradação não enzimática da cefalosporina C é $5 \times 10^{-3} \times h^{-1}$ (PAN et al., 1982). Este fato deve ser considerado na escolha do método de extração e purificação a ser adotado. Em meio alcalino, a cefalosporina C é convertida em deacetilcefalosporina C; em $pH < 2$, tanto este derivado quanto a própria cefalosporina C, sofrem lactonização (WILDFEWER, 1985).

A deacetilcefalosporina C está sempre presente em quantidades significativas no caldo fermentado, tanto como produto de degradação quanto como precursor biossintético da cefalosporina C (Figura 2).

Assim sendo, a capacidade de reaproveitamento daquele derivado é uma vantagem relativamente importante de alguns métodos de extração. Por sua vez, a forma lactonizada representa uma perda irreversível (BYWOOD et al., 1977; WILDFEWER, 1985).

Existem pelo menos cinquenta patentes relacionadas com a extração de cefalosporina do caldo fermentado. Os principais métodos descritos são: adsorção em resinas não iônicas (HAMILL e CRANDALL, 1978; WILDFEWER, 1985; PRÄVE et al., 1987); esterificação extrativa (BYWOOD et al., 1977; WILDFEWER, 1985); e modificação microbiana ou enzimática (WILDFEWER, 1985). O princípio deste último método é a remoção do grupo amínico da cadeia lateral, utilizando-se um microrganismo ou enzimas, visando obter derivados que possam ser extraídos do caldo fermentado com solventes orgânicos e transformados em ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) (Figura 4). Este método é relativamente recente e está sendo utilizado principalmente por companhias japonesas, tais como: Asahi, Banyu, Nippon e Yamanouchi.

2.3 A cefalosporina C

A cefalosporina C é um antibiótico da classe dos β -lactâmicos caracterizada pela presença de um anel diidrotiazínico, a cuja posição 7 está ligada a amida do ácido D- α -aminoadípico (CRUEGER e CRUEGER, 1984). Ela tem caráter anfotérico, é altamente solúvel em água e bastante estável na faixa de pH 2,5 a 8,0 (BYWOOD et al., 1977).

A cefalosporina C, bem como outras substâncias naturais de estrutura similar, como a cefamicina C, por exemplo, não tem atividade suficiente *in vivo* para ser utilizada clinicamente. Isto se deve ao fato do substituinte natural ligado à posição 7 do núcleo cefaloporânico, a posição mais importante na determinação da atividade antibacteriana (BOUCOURT, 1981; GILMAN, et al., 1985), é a amida do ácido D- α -aminoadípico (Figuras 2 e 3), ou seus derivados muito próximos. Em todas as cefalosporinas úteis na prática médica, este radical foi substituído por outras estruturas (PRÄVE et al., 1987). A cefalotina, primeiro derivado semi-sintético eficaz a chegar no mercado, apresenta uma substituição na posição 7 (Figura 3). Este antibiótico iniciou a chamada 1ª geração.

Na posição 3 da molécula (Figura 3) também podem ser inseridos vários tipos de radicais. A maioria das cefalosporinas de 2ª e 3ª gerações apresentam esta característica.

Finalmente, o derivado semi-sintético pode apresentar substituição nas posições 3 (R2), 7 (R1) e 7 (R3), como é o caso da cefoxitina, ou pode apresentar um átomo de oxigênio no

lugar do de enxofre existente no núcleo da molécula de cefalosporina C. Este é o caso do moxalactam (NEWALL, 1985).

A classificação das cefalosporinas em gerações é baseada nos espectros antimicrobianos apresentados por elas, e é amplamente aceita (GILMAN, et al., 1985).

No caso das classificadas como de 1ª geração, embora tivessem espectro de ação mais amplo que as penicilinas então existentes (final da década de 60), ainda eram ineficazes contra certos gêneros de bactérias, especialmente gram-negativas, como *Pseudomonas*, *Proteus*, etc (NEWALL, 1985). Além da cefalotina, fazem parte deste grupo, entre outras: cefalexina, cefradina, cefazolina, cefradoxil, cefacetila, cefaloglicina e cefapirina.

As cefalosporinas introduzidas no mercado no início da década de 70 são chamadas de 2ª geração e, de maneira geral, superam muitas das limitações dos compostos mais antigos. São exemplos principais a cefoxitina e a cefuroxima. No primeiro caso, a maior resistência às β -lactamases é atribuída ao grupo 7- α -metoxi, característico das cefamicinas (BOUCOURT, 1981; NEWALL, 1985; PRAVE et al., 1987); no segundo, à função sin-oxima presente na cadeia lateral (NEWALL, 1985).

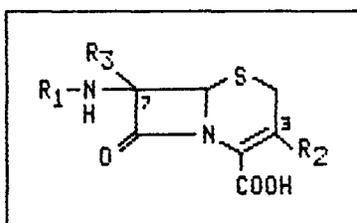


Figura 3: Núcleo cefalosporânico com as posições que podem receber radicais

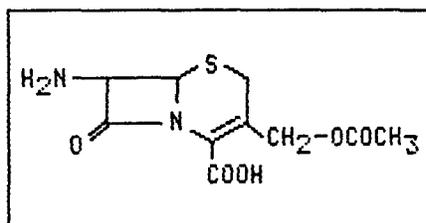


Figura 4: Ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA)

Na segunda metade da década de 70, chegaram à prática médica as cefalosporinas de 3ª geração, que se caracterizavam pela alta eficácia contra uma variedade muito grande de bactéria gram-negativas (e positivas), como *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Citrobacter*, *Proteus* e *Pseudomonas* (BOUCOURT, 1981). Pela primeira vez foi possível utilizar cefalosporinas ao invés de aminoglicosídeos, comparativamente muito mais tóxicos. Os principais exemplos, neste caso, são a cefotaxima e a ceftazidina. Vale ressaltar que, de maneira geral, as cefalosporinas de 3ª geração são menos eficazes contra cocos gram-positivos que as de 1ª geração (GILMAN, et al., 1985).

Antes de sofrer as alterações químicas para dar origem aos vários compostos semi-sintéticos, a cefalosporina C tem que ser hidrolisada à ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) (Figura 4).

Conforme já exposto, a preparação de cefalosporinas clinicamente úteis exige a eliminação da cadeia lateral do ácido D- α -aminoadípico e sua substituição por outro grupo. É provável que a configuração D torne a deacilação por via enzimática mais difícil do que, por exemplo, no caso da produção de ácido 6-aminocefalosporânico (6-APA) a partir de penicilina G. Por este motivo, até hoje, a rota mais praticada é a hidrólise química, que pode resultar em perdas consideráveis (HAMILL e CRANDALL, 1978; HERSBACH et al., 1984; SAVIDGE, 1984).

A hidrólise enzimática da cefalosporina C por amidases de *Achromobacter*, *Brevibacterium* e *Flavobacterium* foi patenteada pela Merck (WALTON, 1966), mas esse processo não logrou sucesso comercial. A possibilidade de hidrólise enzimática continua sendo pesquisada ativamente por algumas indústrias e, no Japão, já é praticada em escala comercial. Aparentemente, uma das vias mais eficientes descobertas até hoje usa enzimas de *Pseudomonas putida*, cepa BN-188 de propriedade da Meiji Seika Co. (SAVIDGE, 1984).

Recentemente, ISOGAI et al (1991b) utilizaram o DNA que codifica D-aminoácido oxidase e DNA genômico que codifica cefalosporina acilase, respectivamente de *Fusarium solani* e *Pseudomonas diminuta*, e construíram um novo operon híbrido de 7-ACA, controlado por elementos regulatórios do gene de protease alcalina de *A. chrysogenum*. A seguir, transformaram uma linhagem super produtora de cefalosporina C (BC 2116), que passou a sintetizar e secretar pequena quantidade de 7-ACA. Apesar dos resultados não terem ainda grande significado do ponto de vista comercial, foi a primeira vez que se conseguiu obter a produção de 7-ACA por um organismo vivo. Além disso, ficou demonstrada a possibilidade de introduzir novas capacidades biossintéticas em microrganismos de uso industrial combinando genes de fungo e bactéria.

É importante ressaltar que diversas cefalosporinas, essencialmente as de uso oral, podem ser sintetizadas a partir do ácido 7-amino-deacetoxicefalosporânico (7-ADCA) obtido pela expansão do 6-APA (BOUCOURT, 1981). A implantação comercial da transformação de penicilina em 7-ADCA se deu a partir de 1975 (KONING et al., 1975; CRUEGER e CRUEGER, 1984) e, desde então, vem resultando no desvio de quantidades crescentes de penicilina para esta finalidade (PRÄVE et al., 1987).

Neste sentido, a empresa holandesa Gist-Brocades, maior produtora mundial de penicilina, está trabalhando intensamente com o objetivo de viabilizar a síntese de cefalosporinas injetáveis a partir do 6-APA (HERSBACH et al., 1984).

O 7-ADCA pode ainda ser sintetizado por duas outras vias, não utilizadas industrialmente por não serem competitivas com as demais: hidrogenação do 7-ACA, ou da cefalosporina C, com subsequente hidrólise; e utilização de linhagens mutantes de *A. chrysogenum* que só levam a biossíntese até o estágio de deacetylcefalosporina C (HERSBACH et al., 1984).

2.4 Análise das cefalosporinas

2.4.1 Colorimétrica

LÜBBE et al. (1986), utilizaram um método cujo princípio consiste na hidrólise enzimática das cefalosporinas (cefalosporina C, deacetyl e deacetoxicefalosporina C) nos seus respectivos ácidos que, na presença de cloreto de mercúrio, reduzem o ácido molibidênio-arsênico em azul de molibidênio. A enzima utilizada é uma "cefalosporinase" de *Enterobacter cloacae* (tipo IV, Sigma). A leitura é feita a 800 nm.

2.4.2 Microbiológica

O microrganismo mais comumente empregado para a análise das cefalosporinas é *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 (SMITH et al., 1967; ZANCA e MARTÍN, 1983; PEREZ-MARTINEZ e FEBERDY, 1985). Esta bactéria apresenta sensibilidade dez vezes maior às cefalosporinas do que à penicilina N (SMITH et al., 1967), o que provavelmente explica a preferência por esta linhagem

Outro microrganismo utilizado para este fim é *E. coli* Ess. Esta linhagem é super-sensível aos antibióticos β -lactâmicos de uma maneira geral e, portanto, torna-se necessário o tratamento prévio das amostras com penicilinase para destruir a penicilina N e possibilitar que a inibição da bactéria seja causada apenas pelas cefalosporinas (SHEN et al., 1986).

SHEN et al. (1986), utilizaram *Pseudomonas aeruginosa* Pss e *Micrococcus luteus* ATCC 381 para dosar as enzimas expandase e ciclase, respectivamente (Figura 2).

2.4.3 HPLC

Este tem sido o método mais empregado nos últimos anos. A razão para isto reside no fato das análises poderem ser processadas mais rapidamente e de se poder analisar a cefalosporina C e cada um de seus intermediários isoladamente.

A coluna mais utilizada para estas análises é a C 18 de fase reversa, de 30 cm (KENNEDY, 1978; DWYER, 1984) ou de 100 cm (WHITE et al., 1977). Pode ainda ser utilizada a coluna CH 10 de 30 cm (ZANCA e MARTÍN, 1983). O eluente pode ser a base de metanol e hidróxido de tetrabutilamônio (KENNEDY, 1978), carbonato de amônio (WHITE et al., 1977), tampão acetato de acetonitrila (ZANCA e MARTÍN, 1983) e acetato de amônio (DWYER, 1984). O fluxo utilizado varia de 0,3 a 2,0 ml/minuto, a sensibilidade fica em torno de 0,08 AUFS e a detecção é feita em 254 nm (WHITE et al., 1977; KENNEDY, 1978; ZANCA e MARTÍN, 1983; DWYER, 1984).

2.4.4 Análise do crescimento

O método mais simples utilizado consiste em tomar um volume conhecido, centrifugá-lo por 10 a 15 minutos em cerca de 1000 g e calcular a taxa de crescimento dividindo-se o volume do precipitado pelo volume de meio total (PAN et al., 1982; SHEN et al., 1986).

Outros métodos utilizados são o da absorvância (SHEN et al., 1986; ZHANG et al., 1988), o da determinação da quantidade de DNA (PEREZ-MARTINEZ e PEBERDY, 1985) e o da estimativa do RNA (HEROLD et al., 1988). Estes últimos autores argumentam que a dosagem do RNA total é um método mais apurado porque os meios de produção de cefalosporina C normalmente contém muitos sólidos em suspensão, que vão sendo consumidos à medida que caminha a fermentação, podendo causar problemas tanto no método de centrifugação quanto de densidade óptica.

2.4.5 Análise de açúcares

A quantidade de açúcares redutores presentes nos caldos fermentados é medida por vários métodos. Entre eles, os mais utilizados são o do ferrocianeto alcalino (PAN et al., 1982; SHEN et al., 1986) e o do ácido dinitrossalicílico (PLATT e FRAZIER, 1964).

2.5 Metabolismo do enxofre

As vias metabólicas do enxofre em leveduras e fungos, incluindo *A. chrysogenum*, estão esquematizadas na figura 5 e têm sido alvo de numerosos estudos nos últimos 30 anos, principalmente no que se refere aos mecanismos de síntese da cisteína e metionina e à interconversão existente entre estas duas substâncias. O grande interesse por este tipo de estudo pode ser justificado em parte pelo aspecto econômico, uma vez que a cisteína é precursor da cefalosporina C (NÜESCH et al., 1973; DREW e DEMAIN, 1975; QUEENER et al., 1984).

Pode ser observado na figura 5 que as enzimas (1) sulfato permease, (2) sulfato adeniltransferase ou ATP sulfurilase, (3) adenil-sulfato 5'-fosfotransferase, (4) adenosina 3'-fosfato 5'-sulfatofosfato redutase e (5) sulfito redutase, são as responsáveis pela conversão do sulfato exógeno em sulfeto endógeno (QUEENER et al., 1984).

No primeiro passo de sulfeto a homocisteína, *O*-acetil-serina (OAS) é produzida a partir de acetil coenzima A e serina pela ação da serina transacetilase (enzima 6). A OAS condensa-se com sulfeto para produzir cisteína, numa reação catalisada pela OAS-sulfridrilase (enzima 7). A cisteína, por sua vez, condensa-se com *O*-acetil-homosserina para produzir cistationina. Esta reação é catalisada pela cistationina γ -sintase (enzima 10). A cistationina é convertida a homocisteína pela ação da β -cistationase (enzima 11). A enzima homosserina transacetilase (8) desempenha um papel chave na síntese da homocisteína uma vez que ela é requerida para produzir *O*-acetil-homosserina a partir de acetil coenzima A e homosserina. A *O*-acetil-homosserina é utilizada nas duas vias de biossíntese da homocisteína, é o substrato para a enzima 10 na primeira via e é também o substrato para *O*-acetil-homosserina sulfridrilase (também chamada homocisteína sintase, enzima 9) na segunda via. Nesta segunda via, onde o sulfeto passa a homocisteína, a enzima 9 catalisa a condensação do sulfeto de hidrogênio com a *O*-acetil-homosserina. A homocisteína é metilada para formar metionina através da ação de uma enzima muito complexa, homocisteína metilase (enzima 12). Esta metilase utiliza N⁵-metiltetraidrofolato como doador de metil e é ativada por quantidades catalíticas de S-adenosilmetionina (QUEENER et al., 1984).

A cistationina β -sintase e a γ -cistationase (enzimas 16 e 17) convertem homocisteína a cisteína e podem funcionar usando homocisteína produzida a partir do sulfeto via enzimas 8 e 9 ou homocisteína produzida da metionina via ação seqüencial de três enzimas: S-adenosilmetionina sintetase, o grupo de enzimas conhecido como S-adenosilmetionina metiltransferases, e S-adenosil-homocisteína hidrolase (enzimas 13, 14 e 15). Devido a mecanismos de regulação, as enzimas 16 e 17 não degradam a homocisteína produzida pelas enzimas 10 e 11. As enzimas 16 e 17, encontradas em todas as leveduras e fungos estudados até o presente e ausentes na maioria das bactérias, não são produzidas sob condições que permitam o funcionamento das enzimas 10 e 11 e vice-versa (QUEENER et al., 1984).

Análises microbiológicas e bioquímicas de mutantes de *A. chrysogenum* com metabolismo do enxofre alterado indicam que as linhagens selvagens desta espécie provavelmente apresentam três mecanismos de regulação. Dois deles estão relacionados com a conversão de sulfato a cisteína, onde o controle é exercido pela metionina. No terceiro, o *O*-acetilserina induz as enzimas que convertem sulfato a cisteína (QUEENER et al., 1984).

A D,L-metionina desempenha dois papéis fundamentais na via biossintética da cefalosporina C: é a principal doadora de átomos de enxofre e é estimuladora (NÜESCH et al, 1973; DREW e DEMAIN, 1975). Estudando mutantes bloqueados e utilizando norleucina, análogo da metionina que não possui enxofre na molécula, esses últimos autores verificaram que a metionina exerce função regulatória sobre a síntese do antibiótico e que os intermediários precisam ser convertidos a metionina para que possam exercer seu papel estimulatório.

Em *Aspergillus nidulans*, é possível isolar mutantes para a via metabólica do enxofre utilizando-se análogos tóxicos do sulfato, tais como cromato e selenato (ARST, 1968). Este método aplica-se melhor a esporos uninucleados porém, no caso de muitas linhagens de *A. chrysogenum* onde as unidades formadoras de colônias são também compostas por fragmentos de hifas contendo número variado de células, a porcentagem de sobrevivência ao tratamento mutagênico precisa ser de 2% ou menos, para que se tenha a chance de isolar mutantes adequados.

No caso de *A. nidulans*, cujos esporos são uninucleados, o tratamento com luz ultravioleta é feito de tal modo a se obter entre 10 e 20% de sobrevivência. A seguir, a suspensão tratada é transferida para os meios seletivos contendo metionina como fonte de enxofre e mais selenato ou cromato de sódio (ARST, 1968).

As linhagens resistentes ao cromato apresentam mutações no gene *sB*, que codifica a sulfato permease (enzima 1 da Figura 5). Esses mutantes não conseguem absorver cromato e selenato, o que determina a resistência. No caso do selenato, a resistência ocorre devido a

lesões no gene *sB* ou no gene *sC* que codifica a ATP sulfurilase (enzima 2 da Figura 5) (BUXTON et al., 1989). Estes autores clonaram o gene *sC* de *A. nidulans* através da complementação de uma linhagem mutante da mesma espécie, utilizando uma biblioteca genômica. Mostraram que plasmídios contendo este gene transformam mutantes *sC*⁻, tanto de *A. nidulans* quanto de *A. niger*, e devolvem-lhes a capacidade de crescer em sulfato como única fonte de enxofre. Dessa forma, o fato de se poder aplicar uma forte seleção para *sC* e *sC*⁻ faz desse método um mecanismo simples e eficiente de introduzir fragmentos genômicos em qualquer linhagem de *A. niger*, incluindo as de importância industrial. Além disso, esse sistema pode ser útil para manipulações em outras espécies do gênero *Aspergillus*.

QUEENER et al., (1984) constataram que o mutante ACI-47 de *A. chrysogenum*, deficiente para a enzima γ -cistationase (passo 17 da Figura 5), cresce muito pouco em meio mínimo líquido contendo metionina, S-adenosilmetionina, homocisteína ou cistationina como única fonte de enxofre. Os autores utilizaram meio líquido porque o ágar contém quantidades significativas de enxofre orgânico ligado covalentemente de tal forma a suportar o crescimento destas linhagens.

QUEENER et al., (1984) verificaram também que o mutante ACI-47 é inibido por 2,6 mM de selenato e, ao contrário do que ocorre com a linhagem selvagem, esta toxicidade não é revertida com 0,1 mg/ml de metionina exógena. Também não houve redução do efeito tóxico com a adição de cisteína e o aumento da concentração desta substância não acarretou na elevação nos níveis de proteção ao selenato. Estes resultados são consistentes e apontam para a existência de um mecanismo repressor mediado por metabólito de transulfuração reversa em *A. chrysogenum*, processo onde a metionina é convertida em cisteína (enzimas 10, 11 e 12 da Figura 5). A pequena reversão da toxicidade ao selenato causada pela cisteína em *A. chrysogenum* pode ser reflexo da pobre absorção deste aminoácido mas, com maior probabilidade, deve significar que a S-adenosilmetionina ou a homocisteína, preferencialmente à cisteína, são os co-repressores da transulfuração reversa nesta espécie.

TREICHLER et al. (1978) trabalharam com a linhagem 8650-S⁻, incapaz de assimilar sulfato inorgânico. Já em outras fontes inorgânicas tais como sulfito, tiosulfato e sulfeto, ela consegue crescer normalmente. Além disso, a 8650-S⁻ apresenta pequeno crescimento residual e resposta claramente distingüível às fontes de enxofre mais comuns, exceto sulfato orgânico. Em contraste, a linhagem selvagem apresenta crescimento residual vigoroso em meio mínimo desprovido de qualquer fonte intencional de enxofre, fenômeno que os autores atribuíram à possível existência de traços do referido elemento presentes no meio líquido e que não puderam ser eliminados.

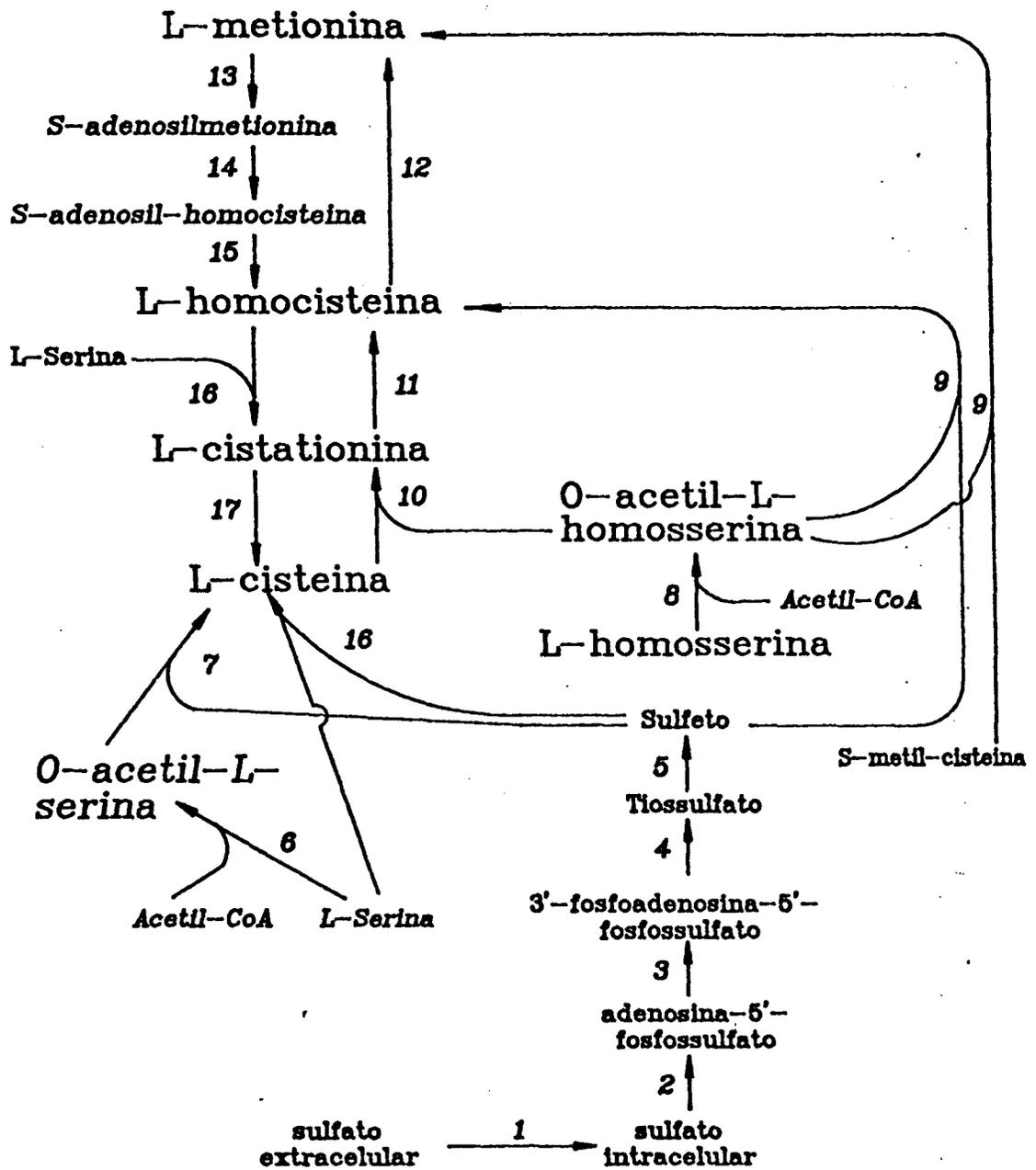


Figura 5: Vias do metabolismo do enxofre em leveduras e fungos

2.6 Melhoramento genético de *A. chrysogenum*

A combinação entre seleção de linhagens e desenvolvimento fermentativo permitiu que, nos últimos 30 anos, a cefalosporina C, presente em pequena quantidade nas culturas do isolado original de Brotzu, alcançasse mais de 25 g/l nas linhagens utilizadas atualmente na indústria (CATÁLOGO PANLABS, 1989). Estes mutantes com alta produção passam por extensos programas empíricos de mutação e seleção que, apesar do sucesso, acabam causando problemas pois, à medida que a produtividade aumenta, diminui a probabilidade de se isolar mutantes ainda melhores e aumenta a dificuldade de identificar os isolados obtidos contra o "background" da população parental. Além disso, a fim de detectar um evento relativamente raro, é necessário que se teste grande número de isolados (SMITH, 1985).

Somente a partir de 1985, com os trabalhos de SAMSON e seus colegas da empresa Eli Lilly, foram utilizadas técnicas moleculares nos programas de melhoramento de *A. chrysogenum*. Sem dúvida, esta estratégia apresenta algumas vantagens sobre os métodos clássicos, sendo as mais importantes o direcionamento dos objetivos a serem alcançados e a necessidade de se testar normalmente apenas algumas dezenas de isolados para se obter alguns com ganho de produtividade, contra os milhares exigidos nos programas de melhoramento envolvendo as técnicas tradicionais (SKATRUD et al., 1989).

Apesar disso, as técnicas clássicas foram utilizadas intensamente nos programas de melhoramento durante os 20 anos que se seguiram ao início dos estudos genéticos de *A. chrysogenum* e são empregadas até hoje, embora em menor proporção. LEIN (1983) enumera vários exemplos de como os métodos clássicos podem ser utilizados nos programas de melhoramento, como eles podem contribuir para solucionar problemas que ocorrem nas fermentações e como eles podem proporcionar um uso mais elegante das técnicas modernas.

Como se vê, tanto as técnicas clássicas quanto modernas são ferramentas de grande importância nos programas de melhoramento, desde que aplicadas de maneira apropriada e com objetivos claros.

É muito importante enfatizar que as técnicas de obtenção e fusão de protoplastos foram de extrema importância na realização de cruzamentos intra-específicos de *A. chrysogenum* (BALL e HAMLIN, 1978) bem como interespecíficos e inter-genéricos (MINUTH e ESSER, 1983). Foram e são importantes nos trabalhos envolvendo transformação, uma vez que este processo é quase sempre conduzido com protoplastos. Assim, estas técnicas têm grande valor tanto na aplicação dos métodos considerados clássicos quanto modernos, e por isso serão incluídas dentro deste tópico.

2.6.1 Técnicas clássicas

Um dos métodos que possibilita o ensaio de um grande número de isolados consiste em cultivar o fungo em meio sólido e identificar as colônias mais produtoras por meio de ensaio biológico, no qual o microrganismo teste é misturado ao meio e colocado sobre a superfície da placa. Embora problemas associados com o efeito do tamanho da colônia e a variação do tempo de germinação façam com que esse método tenha uma quantificação não muito confiável ele tem sido utilizado em vários programas de melhoramento (SMITH, 1985).

TRILLI et al. (1978) desenvolveram um procedimento no qual colônias de *A. chrysogenum* são crescidas na superfície de pequenos discos de ágar que, depois de incubados, são transferidos para placas contendo o microrganismo teste, sendo a concentração de antibiótico determinada em função do diâmetro do halo de inibição. Os críticos desse tipo de método argumentam que as condições de seleção são muito diferentes das encontradas nos fermentadores. Apesar do tamanho da área de inibição obtida nos discos de ágar nem sempre refletir a habilidade de produção do isolado em agitador, este método é muito útil na medida em que elimina de 70 a 80% das colônias com produção baixa ou ausente. Além do mais, trata-se de um método pré-seletivo que tem sido empregado em vários programas de melhoramento.

Uma estratégia alternativa para a seleção randomizada consiste em buscar mutantes com produção superior em várias linhas seletivas. Os métodos utilizados são a seleção de linhagens resistentes a precursores ou produtos tóxicos, a análogos que levam ao aumento da produção de algum intermediário da via biossintética, resistência a ions metálicos, reversão de auxotróficos, linhagens menos sensíveis à repressão catabólica e alterações morfológicas, entre outras (CHANG e ELANDER, 1979).

Dos vários mutantes morfológicos testados por CHANG e ELANDER, aqueles que formam colônias menores e mais compactas em meio quimicamente definido foram os mais promissores. Entre os 52 testados, 2 (4%) apresentaram níveis de produção superiores, contra os 0,2% conseguidos com método de seleção ao acaso. Os autores justificaram a inclusão deste tipo de mutante no programa de melhoramento pelo fato de se ter observado uma correlação entre aumento de produção e redução do diâmetro das colônias e do crescimento vegetativo na espécie *A. chrysogenum*. A linhagem 394-4 (Figura 1), por exemplo, é um derivativo de crescimento menos vigoroso da ATCC 11550 (SKATRUD et al., 1989).

Uma terceira estratégia de melhoramento é a recombinação. Como *A. chrysogenum* é um fungo imperfeito e a sua relação com o estágio perfeito, *Emericellopsis*, é desconhecida, a manipulação genética dessa espécie fica restrita ao ciclo parassexual. O significativo

desenvolvimento dessas técnicas nos últimos anos foi em grande parte possível graças à utilização dos métodos de fusão de protoplastos (PEBERDY, 1987).

A dificuldade em se recuperar heterocários e diplóides, frequentemente enfrentadas pelos pesquisadores que utilizavam métodos convencionais, devia estar relacionada com a organização da hifa, uma vez que a anastomose pode ser encontrada logo depois que as linhagens são cruzadas. Porém, segmentos binucleados são raramente vistos. É possível que a presença de um segundo núcleo desestabilize o mecanismo que controla a relação proporcional entre genoma e massa citoplasmática (PEBERDY, 1987).

O gênero *Acremonium* não possui a maioria das estruturas e características biológicas dos *Aspergilli* e *Penicillia*, que têm sido eficientemente explorados pelos geneticistas. Apesar do *Acremonium* produzir conídios uninucleados, eles são formados em cabeças cobertas por substância limbosa e não se apresentam em conidióforos regulares, sendo, conseqüentemente, muito difícil isolar conídios de conidióforos isolados. Além disso, a falta de pigmentação dos esporos impede que mutantes para coloração de conídios sejam utilizados nos cruzamentos. Finalmente, outra característica negativa do *Acremonium* é sua baixa taxa de crescimento (PEBERDY, 1987).

Com as tentativas iniciais de se estabelecer o ciclo parassexual em *A. chrysogenum*, utilizando-se técnicas naturais ou convencionais, prováveis heterocários e um diplóide estável que segregou as marcas genéticas utilizadas foram obtidos por NÜESCH et al. (1973). Porém, BALL e HAMLYN (1978) não conseguiram isolar diplóide em 40 cruzamentos realizados. Obtiveram segregantes prototróficos instáveis e estáveis. Os últimos, quando expostos a agentes haploidizantes, não apresentaram resposta. Esses resultados e mais os obtidos utilizando fusão de protoplastos permitiram aos autores concluir que o estado diplóide é transitório e frequentemente seguido de uma rápida segregação cromossômica e possivelmente uma eficiente recombinação intracromossômica, indicando que parte dos segregantes isolados eram haplóides. Observações mais recentes permitiram concluir que os segregantes estáveis e instáveis provavelmente são recombinantes haplóides e aneuplóides, respectivamente. Por essas razões, é interessante que algumas colônias derivadas da purificação do heterozigoto sejam ensaiadas (PEBERDY, 1987).

Dos 40 cruzamentos que realizaram, BALL e HAMLYN (1978) selecionaram e ensaiaram 600 segregantes quanto à produção de cefalosporina C. Destes, um revelou produtividade 40% superior aos parentais e apresentou crescimento mais vigoroso em MC e aumento na esporulação.

HAMLYN et al. (1985), utilizando fusão de protoplastos, demonstraram que os recombinantes instáveis heterozigotos podiam ser aneuplóides e/ou diplóides e evidenciaram

a existência de 8 grupos de ligação em *A. chrysogenum*. Uma frequência alta de permuta mitótica também foi observada.

MINUTH e ESSER (1983) estudaram cinco espécies de fungos produtoras de β -lactâmicos a fim de elaborarem técnicas de recombinação parassexual para avaliarem os limites apresentados pelas espécies e gêneros com relação à transgressão. Utilizando técnicas de fusão de protoplastos, eles isolaram variantes e heterocários, dos quais foram obtidos recombinantes não apenas de cruzamentos intraespecíficos mas também dos cruzamentos inter-específicos e inter-gêneros. Porém, o número de recombinantes decresceu de 10^{-4} a 10^{-5} com o aumento da diversidade taxonômica. Características morfológicas, como por exemplo conidiação e, até certo ponto, a habilidade de produzir antibióticos, podem ser transferidas via fusão de protoplastos e subsequente recombinação parassexual.

Conforme enfocado anteriormente, as técnicas clássicas foram intensamente utilizadas nos programas de melhoramento de *A. chrysogenum* e são excelentes ferramentas para solucionar problemas que ocorrem nas fermentações e podem levar a um uso mais elegante das técnicas modernas (LEIN, 1983).

2.6.2 Técnicas modernas

Recentemente, os estudos visando o entendimento dos mecanismos envolvidos na produção de cefalosporina C têm sido conduzidos utilizando-se técnicas moleculares. Mais especificamente, eles têm se centrado no isolamento e clonagem dos genes que codificam as enzimas da via biossintética do antibiótico. Estas atividades deram novo impulso nos programas de melhoramento genético de *A. chrysogenum*.

SAMSON et al. (1985) cloraram, caracterizaram e obtiveram expressão em *E. coli* do gene *pcb C* de *A. chrysogenum* (Figura 2) que codifica a enzima isopenicilina N sintetase (IPNS). Utilizaram os plamídios pIT 336 e pIT 337 que continham marcas de resistência à ampicilina e à neomicina. Empregando estratégia semelhante, CARR et al. (1986) e RAMÓN et al. (1987) transformaram células de *E. coli* com o gene *pcb C* de *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus nidulans*, respectivamente.

SAMSON et al. (1987) isolaram e purificaram a enzima deacetoxicefalosporina C sintetase (DAOCS), também denominada expandase (Figura 2). Verificaram que ela apresentava, com mesma taxa, uma segunda atividade: a de deacetylcefalosporina C sintetase (DACCS, ou hidrolase) (Figura 2). Obtiveram uma sequência parcial de aminoácidos desta proteína e, com esta informação, conseguiram clonar e expressar o gene correspondente (*cefEF*) em *E.*

coll. Tanto a atividade DAOCS quanto a DACS foram encontradas no extrato celular da bactéria, demonstrando a natureza bifuncional desta enzima de *A. chrysogenum*.

A incorporação do gene *pcb C*, com seus fragmentos promotores, a um vetor em que ele controlava a expressão de um marcador dominante, no caso o gene *hph* de *E. coli* que codifica a enzima higromicina B fosfotransferase, facilitou a transformação integrativa tanto em *A. chrysogenum* (SKATRUD et al, 1987) quanto em *Aspergillus niger* (KÜCK et al, 1989). Os últimos autores demonstraram a eficiência do vetor construído (pMW 1) obtendo cerca de 10.000 transformantes/µg de DNA.

Já no caso de *A. chrysogenum*, a frequência encontrada por SKATRUD et al. (1987) oscilou entre 0,05 e 25 transformantes/µg de DNA e situou-se em torno de 7 nos trabalhos de SMITH et al. (1992). Segundo os últimos autores, a baixa frequência de transformação nesta espécie poderia estar relacionada ao padrão natural de expressão do gene *pcb C*, que é altamente regulado (SMITH et al., 1990). Isto faz com que a expressão dos genes estruturais seja eficiente apenas na última fase de crescimento e não no estágio de regeneração dos protoplastos (SMITH et al., 1992). Para reforçar esta idéia, os autores transformaram a linhagem M8650 (Figura 1) com os plasmídios pIH2 e pIH3, que contém o gene *hph* unido aos elementos promotores do gene *pcb C*, e com o plasmídio p AN7-1, que possui a mesma marca de resistência e promotores do *gpd A*, gene que codifica a glicose-6- fosfato desidrogenase de *Aspergillus nidulans*. Além dos padrões diferentes de integração, verificaram que a frequência de transformação foi cerca do dobro quando utilizaram o plasmídio pAN7-1. Outra característica deste vetor foi a presença de um grande número de transformantes abortivos (colônias pequenas), fato que os autores atribuem ao alto nível de expressão do promotor *gpd A* antes de haver interferência com o processo de integração.

SHIRAFUJI et al. (1979) isolaram vários mutantes bloqueados na via biossintética da cefalosporina C. Verificaram que um deles, o N-2 (Figura 1), acumulava o tripeptídeo LLD-ACV (Figura 2) e concluíram que a lesão tinha ocorrido no passo seguinte da via.

CHAPMAN et al. (1987) obtiveram complementação da mutação existente na linhagem N-2 através da transformação com o plasmídio contendo o gene *pcb C* num fragmento de 4,3 kb. Estes resultados sugerem claramente que o acúmulo do tripeptídeo LLD-ACV é causado por uma mutação de ponto.

RAMOS et al. (1986) sugeriram que essa mutação estaria localizada num gene regulador uma vez que a linhagem N-2 havia perdido simultaneamente as atividades isopenicilina N sintetase, isopenicilina N epimerase e deacetoxicefalosporina C sintetase (Figura 2). Já RAMSDEN et al. (1989) verificaram tratar-se de mutação simples no nucleotídeo 854 do gene estrutural *pcb C* que, por sua vez, altera o aminoácido 285 de prolina para leucina e leva à produção de uma isopenicilina N sintetase inativa. Sugerem que esta enzima ou seu

produto, a isopenicilina N, está envolvida na regulação dos demais passos da via biossintética da cefalosporina C.

SKATRUD et al. (1989) transformaram a linhagem 394-4, derivada da ATCC 11550 através de várias etapas de mutação e apresentando crescimento menos vigoroso (Figura 1) utilizando o plasmídeo pPS 56, que possui o gene *hph* e um fragmento de DNA de *A. chrysogenum* contendo o gene *cefEF*. Testes em escala piloto comprovaram a superioridade de um dos transformantes, a linhagem LU4-79-6, que produziu 15% mais cefalosporina C mesmo sendo cultivado em meio de fermentação desprovido de higromicina B. Os autores enfatizam as vantagens de se utilizar técnicas moleculares, empregando como principal argumento o fato deles terem testado apenas 8 isolados para conseguir a linhagem LU4-79-6 contra milhares que normalmente são exigidos nos programas de melhoramento envolvendo as técnicas tradicionais.

BALDWIN et al. (1990) isolaram e caracterizaram a enzima ACV sintetase de *A. chrysogenum* (Figura 2). Como o processo de purificação desta enzima é difícil e consome muito tempo, HOSKINS et al. (1990) utilizaram método alternativo para localizar o gene *pcb AB*: a introdução de seqüências que se inserem especificamente no gene alvo e, conseqüentemente impedem sua expressão. Usando o plasmídeo pPS 96, que contém o fragmento de *pcb C* oriundo do pIT 328 unido ao pUC 19 e ao *hph*, eles transformaram a linhagem ATCC 11550 e verificaram que 4% das colônias obtidas não possuíam atividade ACV sintetase e eram incapazes de produzir cefalosporina C, evidenciando a inserção no gene *pcb AB*. Para confirmar, os autores obtiveram reversão da característica quando a seqüência se salvagem foi introduzida nos transformantes. Constataram que o gene *pcb AB* está ligado ao gene *pcb C* e que eles possuem sentidos inversos de transcrição. A análise da seqüência de aminoácidos da enzima revelou haver regiões de grande similaridade com as peptídeo sintetases responsáveis pela produção de tirocidina e gramicidina S em *Bacillus brevis*.

Utilizando como sonda heteróloga os genes *pcb AB* e *pcb C* de *Penicillium chrysogenum*, GUTIÉRREZ et al. (1991b) clonaram o fragmento equivalente de *A. chrysogenum* e transformaram a linhagem N-2, obtendo complementação. O gene *pcb AB* de *A. chrysogenum* foi caracterizado e comparado com seu correspondente de *P. chrysogenum*, tendo revelado alta similaridade: 62,9%. Este trabalho confirmou a ligação entre os genes *pcb AB* e *pcb C*.

Os genes *pcb C* e *pen DE*, que codificam respectivamente as enzimas isopenicilina N sintetase e acil-CoA : ácido 6- aminopenicilânico aciltransferase (converte isopenicilina N em penicilina G). em *P. chrysogenum*, estão ligados (DÍEZ et al., 1989) e foram utilizados para transformar a linhagem N-2 de *A. chrysogenum* que, além de ter sua mutação complementada, passou a produzir penicilina G em meio suplementado com ácido fenilacético (GUTIÉRREZ et al., 1991 a).

MATSUDA et al. (1992a) relataram a seqüência de aminoácidos da deacetilcefalosporina C acetil transferase (Figura 2) de *A. chrysogenum*, enzima codificada pelo gene *cef G*, determinada pela clonagem de cDNA e expressão da proteína ativa em células de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas com um vetor de expressão contendo o referido cDNA. Observaram que apesar da grande homologia que esta enzima apresenta com as homosserrina acetil transferase (Enzima 8, Figura 5) de *Ascobolus immersus* e *S. cerevisiae*, essas atividades são exercidas por enzimas distintas.

Esta homologia também foi constatada por GUTIÉRREZ et al. (1992) que, ao caracterizarem o gene *cef G*, verificaram que ele contém dois introns e codifica uma proteína de 444 aminoácidos. Quando este gene foi introduzido no mutante ATCC 20371 de *A. chrysogenum*, deficiente para a enzima deacetilcefalosporina C acetil transferase, houve complementação e a linhagem voltou a sintetizar cefalosporina C. Constataram que o gene *cef G* está ligado ao gene *cef EF* e obtiveram sua expressão heteróloga em *P. chrysogenum*.

GUTIÉRREZ et al. (1992) enfatizaram que a otimização da expressão do gene *cef G* era de extrema importância para a produção industrial de cefalosporina, uma vez que quantidades significativas de deacetilcefalosporina C permanecem no meio de fermentação sem serem convertidas no produto final. De fato, MATHISON et al. (1993) verificaram que as linhagens ATCC 11550 e ATCC 20371 apresentaram uma relação direta entre o número de cópias do gene *cef G*, os níveis do mensageiro *cef G* e a quantidade de cefalosporina C sintetizada, o que reforça a hipótese de que a atividade acetil transferase é fator limitante nesta via biossintética. Apontam para a importância de se investigar se este fenômeno também ocorre nas linhagens utilizadas pela indústria.

MATSUDA et al. (1992b) transformaram a linhagem 1S-5 de *A. chrysogenum* (Figura 1) com o plasmídio pDATF 1 que contém o gene *cef G* com uma seqüência de expressão para resistência à higromicina dentro de sua região codificadora. Ao entrar na célula, o plasmídio inseriu-se num local específico do gene *cef G* causando nos transformantes a incapacidade de produzirem deacetilcefalosporina C acetil transferase. Estes resultados confirmaram a identidade do gene clonado e demonstraram que o gene *cef G* é a única fonte desta atividade enzimática. Os autores também constataram ligação entre os genes *cef EF* e *cef G*.

Com exceção do gene *cef D* (Figura 2), todos os demais genes das vias biossintéticas da penicilina e cefalosporina já foram clonados. Análises moleculares a nível genômico revelam que todos os genes clonados até o momento ocorrem de forma agrupada. Em *A. chrysogenum*, foi constatada ligação entre os genes *pcb C* e *pcb AB* (GUTIÉRREZ et al., 1991b) e entre os genes *cef EF* e *cef G* (GUTIÉRREZ et al., 1992; MATSUDA et al., 1992b e MATHISON et al., 1993), sendo que estes grupos estão localizados nos cromossomos VI e II, respectivamente (SKATRUD e QUEENER, 1989). Foi observado também que os três genes envolvidos na biossíntese da penicilina (Figura 2) estão agrupados em *P. chrysogenum* (SMITH et al., 1990) e em *Aspergillus nidulans* (MacCABE et al., 1990).

Devido à grande similaridade existente entre os genes *pcb C* de *A. chrysogenum* e *P. chrysogenum*, CARR et al. (1986) propuseram que eles teriam originado a partir de um gene ancestral comum. Também propuseram que a via biossintética teria surgido primeiro em bactérias do gênero *Streptomyces* e depois teria sido transferida horizontalmente para os fungos há cerca de 370 milhões de anos, divergindo separadamente nos dois grupos de microorganismos. A comparação do gene *cef EF* com seus correspondentes em *Streptomyces* (*cef E* e *cef F*) reforçaram esta hipótese. Além do mais, há um alto grau de similaridade entre as seqüências de aminoácidos das respectivas enzimas e estes genes nos fungos que não possuem introns. A recente clonagem e sequenciamento do gene *pcb AB* de *A. chrysogenum* (GUTIÉRREZ ET AL. 1991b) e *P. chrysogenum* (DÍEZ et al., 1990) indicam que eles provavelmente são originários de bactérias, tendo em vista que as enzimas por eles sintetizadas não apresentam introns e possuem seqüências de alta similaridade com as tirocidina e gramicidina sintetases de *Bacillus brevis*.

Contrastando com os genes da via biossintética de outros fungos, os genes *pen DE* de *P. chrysogenum* e *cef G* de *A. chrysogenum* possuem introns. Assim sendo, é provável que eles tenham sido recrutados do genoma do próprio fungo. O curioso é que, apesar de não ser necessário que eles estejam agrupados para terem uma regulação coordenada, tanto o gene *pen DE* quanto o *cef G* fazem parte de uma estrutura deste tipo. Isso pode indicar uma importância funcional. Talvez eles sejam regulados coordenadamente durante a idiofase como consequência de seu contexto cromossômico (MATHISON et al., 1993).

Muitos pesquisadores têm lançado mão das técnicas moleculares para estudar outros pontos importantes da produção das cefalosporinas. É o caso, por exemplo, dos trabalhos que levaram à produção direta de 7-ACA (Figura 4) por linhagens de *A. chrysogenum*.

O passo inicial para alcançar estes resultados foi o isolamento de várias linhagens do solo produtoras de cefalosporina acilase, entre elas *Pseudomonas* sp A 14, N 176 e V 22 e *Bacillus laterosporus* J1 (ARAMORI et al., 1991). Na seqüência, ISOGAI et al. (1991a) isolaram o cDNA da protease alcalina (Alp) de *A. chrysogenum* a partir de uma biblioteca genômica de cDNA da linhagem ATCC 11550. Utilizando este cDNA como sonda, eles isolaram o gene de Alp de uma biblioteca genômica de *A. chrysogenum*. Sequenciaram o gene e verificaram a introdução do cDNA da Alp em *Saccharomyces cerevisiae* levou à secreção de Alp ativa no meio de cultura.

Finalmente, ISOGAI et al. (1991b) utilizaram o gene que codifica a D-aminoácido oxidase em *Fusarium solani* e o gene que codifica a cefalosporina acilase em *Pseudomonas diminuta* V22, e construíram um novo operon híbrido de 7-ACA, controlado por elementos reguladores do gene da Alp de *A. chrysogenum*. A seguir, transformaram a linhagem BC 2116 (Figura 1), super produtora de cefalosporina C, que passou a sintetizar e a secretar pequenas quantidades de 7-ACA. Concluíram que apesar destes resultados não terem ainda grande significado comercial, foi a primeira vez que se conseguiu obter a produção de 7-

ACA por um organismo vivo. Além disso, ficou demonstrada a possibilidade de introduzir novas capacidades biossintéticas em microrganismos de uso industrial combinando genes de fungo e bactéria.

WHITEHEAD et al. (1990) desenvolveram um sistema homólogo de transformação para *A. chrysogenum* usando o gene *nia D* da via de assimilação do nitrato. Utilizaram o plasmídeo pSTA 700, com o qual obtiveram até 40 transformantes/ μg de DNA. As colônias foram facilmente isoladas uma vez que o número de abortivos era nulo ou bem baixo. Este sistema foi usado para introduzir marcas não seletivas para resistência ao benomil (pBT6) e à higromicina B (pIH1) através de cotransformação. Com este método, em concentração equimolar dos plasmídios, 27% dos transformantes *nia D* isolados eram também *ben^R* e, no outro caso, 23% eram também *hig^R*.

KIMURA et al. (1991) sequenciaram, e clonaram o gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *A. chrysogenum* usando como sonda o gene correspondente de *S. cerevisiae*. Este fragmento foi unido ao gene *hph* de *E. coli*, dando origem ao plasmídeo pGH 2. A transformação da linhagem ATCC 11550 com este vetor resultou em frequência da ordem de 5 transformantes/ μg de DNA.

Através da cariotipagem eletroforética, WALZ e KÜCK (1991) constataram que a linhagem industrial de *A. chrysogenum* utilizada em seus estudos possuía um padrão cromossômico claramente distinguível das parentais ATCC 11550 e 14553. Estes resultados indicam que translocações ocorridas durante o processo de melhoramento genético devem ter levado a rearranjos que, por sua vez, resultaram em cromossomos de tamanhos diferentes. Esta interpretação é confirmada comparando-se a localização dos genes rDNA e β -tubulina nas várias linhagens. Em função disso, especulam que estes rearranjos são responsáveis pelo aumento da produção de cefalosporina C nas linhagens utilizadas pela indústria. SKATRUD e QUEENER (1989) e SMITH et al. (1991), utilizando outra técnica e linhagens diferentes, chegaram a conclusões similares.

Se, por um lado, essas alterações cromossômicas trouxeram benefícios do ponto de vista comercial, com relação aos estudos genéticos elas se mostraram obstáculos, tendo em vista que as linhagens melhoradas podem ter problemas de regeneração da parede celular e, frequentemente, apresentam menor eficiência de transformação (SKATRUD et al., 1997 e ISOGAI et al., 1991b). CULLEN e BERKA (1987) enfatizam que a frequência de transformação para os fungos utilizados na indústria é normalmente menor que 100/ μg de DNA, enquanto que para espécies não comerciais tais como *N. crassa* e *A. nidulans* este número pode exceder a 5000/ μg de DNA.

2.7 Protoplastos

EDDY e WILLIAMSON (1957, 1959) foram os primeiros a utilizar o suco digestivo de *Helix pomatia* como complexo lítico para a obtenção de protoplastos. Eles trabalharam com *Saccharomyces cerevisiae*. Depois disso, outros pesquisadores utilizaram o mesmo complexo enzimático em outras espécies de levedura (DEUTCH e PARRY, 1974; SHAHIM, 1971; PARTRIDGE e DREWE, 1974) e também em fungos filamentosos, tais como *Neurospora crassa* (EMERSON e EMERSON, 1958; BACHMANN e BONNER, 1959), *Penicillium chrysogenum* e *Acremonium chrysogenum* (FAWCETT et al., 1973), *Geotricum candidum* (FERENCZY et al., 1974), *Aspergillus niger* (MUSÍLKOVÁ e FENCL, 1968) e *Penicillium purpurogenum* (MUSÍLKOVÁ et al., 1969).

Boa parte dos pesquisadores que trabalham com fungos preferem utilizar complexos enzimáticos obtidos a partir de microrganismos. Entre os vários exemplos encontra-se a Zimoliase, derivada de *Arthrobacter luteus* (YAMAMURA et al., 1975), e enzimas líticas isoladas de *Trichoderma viride* (De VRIES e WESSELS, 1973). Neste último caso, os autores verificaram que as enzimas possuem três componentes principais: S-glucanase (α -1,3-glucanase), R-glucanase (α -1,3- β -1,6-glucanase) e quitinase. Verificaram, ainda, que os três componentes foram necessários para a liberação de protoplastos em *Schizophillum commune*.

HOUSETT et al. (1975), aumentaram a eficiência de produção de protoplastos em *Schizosaccharomyces pombe*, adicionando α -1,3-glucanase e β -1,3-glucanase às enzimas do suco digestivo de caramujo. MORRIS (1978) verificou que a adição de glusulase ao complexo lítico proveniente de *Trichoderma harzianum* aumentou a velocidade de liberação de protoplastos em *Aspergillus nidulans*. ANNÉ et al. (1976), obtiveram produção máxima de protoplastos em *P. chrysogenum* quando enzimas produzidas por *Trichoderma* foram misturadas a uma preparação proveniente de *Streptomyces gramineofasciens* e uma celulase comercial.

Complexos enzimáticos purificados e constituídos por diferentes polissacarases (celulase, gumase, maltase, hemicelulase e quitinase) têm sido utilizados para a obtenção de protoplastos em diferentes espécies de fungos (EMERSON e EMERSON, 1958; DIATEWA et al., 1981; HAMLIN et al., 1981).

PEBERDY et al. (1976), estudando os fatores que afetavam a liberação de protoplastos em várias espécies de fungos filamentosos, concluíram que maior eficiência era obtida quando utilizadas culturas em fase exponencial de crescimento. Existem muitos trabalhos relatando a influência desta variável, principalmente em leveduras (EDDY e WILLIAMSON, 1957; BROWN, 1971; SHAHIM, 1971; DEUTCH e PARRY, 1974; STEPHEN e NASIN, 1981).

MUSÍLKOVÁ e FENCL (1968), estudando *A. niger*, constataram que a aeração é uma variável muito importante na liberação de protoplastos. Concluíram, ainda, que o meio residual de cultivo deve ser retirado da suspensão de micélio, através da lavagem com solução de alta pressão osmótica.

Para algumas espécies, a eficiência da produção de protoplastos pode ser aumentada promovendo-se um pré-tratamento das células com certos tipos de substâncias. Entre elas a 2-deoxi-D-glicose (FOURY e GOUFFEAU, 1973), o ditioneitol, 2-mercaptoetanol ou cisteamina (DOOLJEWAAARD et al., 1973; FAWCETT et al., 1973; FINKELMAN et al., 1980), e certos tipos de detergentes, tais como o desoxicolato, o laurilsulfato e o triton X-100. Este último foi apontado como o mais eficaz para *Pythium sp* (SIETSMA e BOER, 1973).

EMERSON e EMERSON (1958) trabalharam com *N. crassa* e observaram que protoplastos obtidos a partir de conídios parecem ser menos uniformes que os obtidos a partir de hifas, especialmente em baixas concentrações de açúcares e enzimas. GENTHNER e BORGIA (1978) em *Mucor racemosus* e BOS e SLAKHORST (1981) em *A. nidulans* e *A. niger*, verificaram que a produção de protoplastos a partir de conídios resulta mais homogênea no que se refere à composição de organelas e, portanto, no seu desenvolvimento.

FAWCETT et al. (1973), verificaram que, assim como ocorre com as leveduras, *A. chrysogenum* necessitava de pré-tratamento com compostos tiólicos, cuja função aparente é reduzir as pontes dissulfídicas presentes na parede celular. Verificaram que o ditioneitol foi mais efetivo que o 2-mercaptoetanol. Os autores utilizaram o complexo enzimático de *Helix pomatia* como agente lítico e cloreto de sódio 0,7 M como estabilizador osmótico. Para a regeneração dos protoplastos, foi utilizado meio infusão de cérebro e coração contendo 2% de sacarose e 0,8 M de cloreto de sódio.

HAMLIN et al. (1981), utilizaram pré-tratamento com ditioneitol (0,01 M) e 0,7 M de cloreto de sódio como estabilizador osmótico. Verificaram que a combinação dos complexos enzimáticos SP 234 e celulase CP foi a que proporcionou melhor liberação de protoplastos de *A. chrysogenum*.

A maioria dos protocolos para obtenção de protoplastos em *A. chrysogenum* que têm sido descritos nos últimos anos emprega um pré-tratamento com 0,01 M de ditioneitol, cloreto de sódio ou de potássio 0,7 M como estabilizador osmótico, o complexo enzimático Novozym 234 para a digestão da parede celular e cloreto de sódio ou sacarose 10,3% como estabilizadores osmóticos (DÍEZ et al., 1987; GUTIÉRREZ et al., 1991a; WHITEHEAD et al. (1990) utilizaram para este fim um meio contendo 20% de sacarose.

Com relação à eficiência de produção, MINUTH e ESSER (1983) obtiveram entre 10^7 e 10^8 protoplastos/g de micélio, enquanto que GUTIÉRREZ et al (1991a) conseguiram 4×10^9 protoplastos/g de micélio.

A frequência de regeneração dos protoplastos de *A. chrysogenum* é relativamente baixa quando comparada com outras espécies de fungos filamentosos. MINUTH e ESSER (1983) verificaram que ela se situava na faixa de 2 a 7% em meio tendo NaCl 0,6 M como estabilizador osmótico. Utilizando sacarose no meio de regeneração, WHITEHEAD et al. (1990) encontraram de 1 a 10% e SKATRUD et al. (1987) constataram frequência média de 1,7%.

O surgimento e aprimoramento das técnicas de obtenção de protoplastos possibilitaram o desenvolvimento das técnicas de fusão de protoplastos. LOPEZ-BELMONTE et al. (1966), descreveram, pela primeira vez, como um evento raro, a fusão espontânea de protoplastos em *Fusarium culmorum*. Já a primeira tentativa de fusão controlada foi feita por FERENCZY et al. (1974) em *Geotricum candidum*, onde foi obtida baixa frequência de colônias heterocarióticas. BINDING (1974), conseguiu um aumento na frequência da fusão de protoplastos em *Phicomycetes blakesleeanus*, utilizando água do mar e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ tamponado como agentes de fusão. Neste caso, o autor observou que a frequência de fusão foi duas vezes maior do que a obtida com a água do mar e 37 vezes maior do que a obtida por FERENCZY et al. (1974). Utilizando os mesmos agentes de fusão, FERENCY et al. (1975) obtiveram aumento de frequência de fusão em *Aspergillus nidulans*.

CONSTABEL e KAO (1974), trabalhando com protoplastos de plantas, conseguiram aumentar a frequência de fusão através do uso do polietileno glicol (PEG).

Em *P. chrysogenum*, ANNÉ e PEBERDY (1975) estudaram algumas variáveis relacionadas com o PEG e verificaram que a melhor concentração foi de 30% (p/v) com um tempo de exposição de 10 minutos a 30°C. PEBERDY et al. (1976) encontraram frequências de fusão 1000 vezes maiores do que as relatadas anteriormente. A partir desses estudos, ANNÉ e PEBERDY (1976), estabeleceram uma metodologia de fusão de protoplastos que pode ser aplicada com sucesso a várias espécies de fungos. Utilizando mutantes auxotróficos complementares, eles realizaram fusões intra-específicas e inter-específicas. Colônias heterocarióticas foram selecionadas em meio mínimo e alguns diplóides foram caracterizados através da confirmação de prototrofia, volume e coloração de esporos e conteúdo de DNA.

Em *A. chrysogenum*, as técnicas de fusão de protoplastos foram ferramentas de grande auxílio para a realização de cruzamentos intra-específicos que possibilitaram o completo entendimento do ciclo parassexual nesta espécie (BALL e HAMLIN, 1978; HAMLIN et al., 1985). Fusões inter-específicas e intergenéricas também foram realizadas por MINUTH e ESSER (1983).

2.8 Benomil

O benomil (metil-1-(butil-carbamoil)-2-benzimidazol carbamato) pertence ao grupo dos benzimidazólicos, onde se incluem os tiofanatos, tiabendazóis, mebendazóis, carbendazima ou metil-2-benzimidazol carbamato (MBC) e vários outros compostos. Estas substâncias são metabolicamente transformadas pelos animais, plantas e fungos em MBC (TUYL, 1977), que tem sido apontado como o composto de papel principal no mecanismo de ação tóxica destes fungicidas estruturalmente relacionados (SEILER, 1975). Esta idéia é reforçada pela constatação de que alguns mutantes para benomil de *A. nidulans* e *N. crassa* apresentam resistência cruzada ao tiofanato e ao tiabendazol (HASTIE e GEORGOPOULOS, 1971; TUYL et al., 1974; BORK e BRAYMER, 1974). MARTINEZ-ROSSI e AZEVEDO (1989) também constataram este fenômeno e descreveram três mutações que conferem níveis mais elevados de resistência ao metil tiofanato e ao benomil do que aqueles descritos anteriormente. Estas linhagens de *A. nidulans* também apresentam boa conidiação na presença dos fungicidas.

Por apresentar efeito haploidizante (HASTIE, 1970), o benomil tem sido eficazmente utilizado na discriminação de linhagens haplóides e diplóides de várias espécies de fungos filamentosos (KAPPAS et al., 1974; UPSHALL et al., 1977; UPSHALL, 1981; BONATELLI Jr. et al.; 1983; BRADSHAW et al., 1983; MINUTH e ESSER, 1983; VIALTA, 1987).

TUYL (1977) e MORRIS (1986) demonstraram que a resistência ao benomil em *A. nidulans* é determinada por pelo menos três genes. Um deles (*ben A*) confere alto nível de resistência e codifica os polipeptídeos β tubulina 1 e β tubulina 2 (HASTIE e GEORGOPOULOS, 1971; TUYL, 1977; SHEIR-NEISS et al., 1978). Os outros dois (*ben B* e *ben C*) conferem resistência menos pronunciada a este fungicida (TUYL, 1977).

Em *N. crassa*, BORCK e BRAYMER (1974) mostraram que a resistência ao benomil é dominante em heterocários formados entre linhagens resistentes e do tipo selvagem. Nesta espécie, assim como em *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *A. nidulans*, muitas mutações conferindo resistência ao benomil foram mapeadas em genes estruturais (ORBACH et al., 1986).

Estudando várias espécies de fungos, TUYL (1975) verificou que a frequência de mutação para resistência ao benomil variou de 10^{-5} em *Cercospora herpotrichoides* a 10^{-7} em *Cladosporium cucumerinum*. *A. nidulans* apresentou frequência de 5×10^{-7} , enquanto que para *Penicillium expandum* e *A. niger* elas foram 10×10^{-7} e 25×10^{-7} , respectivamente.

TUYL (1975) constatou que a ED_{50} (concentração necessária para reduzir o crescimento radial da colônia em 50%) das linhagens selvagens que utilizou em seu trabalho variou de 0,04 a 2,0 μ g de benomil/ml, tendo sido 0,7 e 0,6 respectivamente para *A. nidulans* e *A. niger*. Dentro de cada uma das espécies estudadas, o grau de resistência dos diferentes

mutantes variou de baixos até altos níveis, tendo as médias das ED₅₀ situado-se na faixa de 30 (*A. nidulans*) a mais de 500 µg/ml (*A. niger*).

MARTINEZ-ROSSI e AZEVEDO (1989) verificaram que os mutantes BEN-36, BEN-37 e BEN-38 de *A. nidulans* apresentam ED₅₀ de 32,0, 36,7 e mais de 160 µg/ml, respectivamente.

Nos vários cruzamentos que realizaram utilizando técnicas de fusão de protoplastos, MINUTH e ESSER (1983) isolaram um recombinante de *A. chrysogenum* resistente ao benomil cuja produção de cefalosporina C foi cerca de 40% superior ao das linhagens parentais. Os autores não conseguiram, porém, explicar tal fenômeno mas argumentaram que devia se tratar de algo comparado à observação de que todos os variantes auxotróficos apresentaram baixos níveis de antibiótico.

Apesar de várias espécies de fungos filamentosos já terem sido transformadas com o gene de resistência ao benomil isolados de *N. crassa* (plasmídeo pBT 6), *A. niger* e *A. nidulans* (ORBACH et al., 1986; RAMBOSEK e LEACH, 1987), não foi possível encontrar na literatura trabalhos desta natureza com *A. chrysogenum*. Apenas WHITEHEAD et al. (1990) utilizaram o plasmídeo pBT 6 para cotransformação. Neste caso específico, o marcador seletivo (gene *nia D*) estava contido num outro plasmídeo, o pSTA 700.

2.9 Higromicina B

A higromicina B é um antibiótico aminoglicosídico que inibe a síntese protéica em procariotos e eucariotos (GONZALES et al., 1978). Os genes que conferem resistência a este antibiótico foram isolados e caracterizados em *Streptomyces hygroscopicus* (ZALACAIN et al., 1986) e *E. coli* (GRITZ e DAVIES, 1983; KASTER et al., 1983). Ambos os genes inativam a higromicina B através de fosforilação (MALPARTIDA et al., 1983; GRITZ e DAVIES, 1983). O gene conferindo resistência à higromicina B (*hph*) de *E. coli* foi utilizado para construir vetores, entre outros, para *E. coli* (GRITZ e DAVIES, 1983; KASTER et al., 1983), *S. cerevisiae* (GRITZ e DAVIES, 1983; KASTER et al., 1984), *Aspergillus* (PUNT et al., 1987) e *A. chrysogenum* (QUEENER et al., 1985). Por se tratar de uma marca dominante de fácil seleção, o gene *hph* tem sido muito utilizado nos trabalhos de transformação de *A. chrysogenum*, associado com outros fragmentos tais como o gene *pcb C* (SKATRUD et al., 1987; KÜCK et al., 1989), o *gpd A* (SMITH et al., 1992) e o gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (KIMURA et al., 1991).

No extenso trabalho desenvolvido por SMITH et al. (1992), 135 transformantes foram isolados e testados com relação aos níveis de resistência à higromicina B. Cerca de 70%

deles cresceu em mais de 1600 µg/ml da droga, 15% cresceu em até 1500 µg/ml, 14% cresceu em até 700 µg/ml e apenas 1% cresceu em até 350 µg/ml. Por outro lado, a linhagem parental (M 8650) foi incapaz de crescer na menor concentração ensaiada (200 µg/ml). As concentrações de higromicina utilizada no processo de seleção dos transformantes variaram na faixa de 50 a 100 µg/ml. Já SKATRUD et al. (1989) não conseguiram isolar transformantes em 100 µg/ml de higromicina B. A linhagem que utilizaram (394-4) mostrou-se extremamente sensível à droga, o que obrigou os autores a reduzir a concentração para 15 µg/ml.

2.10 Alguns destaques da revisão

Assim como ocorreu com a grande maioria dos processos fermentativos tradicionais, o uso de técnicas genéticas clássicas, basicamente mutação e seleção, possibilitou que a cefalosporina C, presente em pequenas quantidades no isolado original de Brotzu, alcançasse mais de 25 g/l nas linhagens utilizadas atualmente na indústria (CATÁLOGO PANLABS, 1989). Como destaca LEIN (1983), as técnicas clássicas são ainda empregadas e podem contribuir para solucionar problemas que ocorrem nas fermentações bem como para proporcionar uma utilização mais elegante das técnicas modernas. Estas, começaram a ser aplicadas em *Acremonium* a partir de 1985 com os trabalhos de SAMSON e seus colegas da Eli Lilly e, sem dúvida, apresentam algumas vantagens sobre os métodos clássicos, sendo os mais importantes o direcionamento dos objetivos a serem alcançados nos programas de melhoramento e a necessidade de normalmente se testar apenas algumas dezenas de isolados para se obter algum com ganho de produtividade, contra os milhares exigidos quando se utiliza técnicas tradicionais. ISOGAI et al. (1991b) demonstraram a importância que as técnicas modernas podem ter, obtendo, através da combinação de genes de fungo e bactéria, uma linhagem de *Acremonium* que produz 7-ACA. Apesar de bastante estudado devido à sua importância comercial, *Acremonium* tem sua genética pouco conhecida quando comparado com outros fungos tais como *Neurospora* e *Aspergillus*.

A cefalosporina C possui o radical aminoacil, que torna sua molécula anfotérica e solúvel em água. Isto eleva os custos dos processos de separação e purificação, explicando, em parte, o fato de seu preço final ser mais alto do que a penicilina G, uma vez que esta é facilmente isolada do caldo fermentado por possuir cadeia lateral apolar (CRUEGER e CRUEGER, 1984; BYWOOD et al., 1977). A produção industrial das cefalosporinas de uso oral a partir do 7-ADCA obtido com a expansão do anel de 6-APA teve seu início em 1975 e, desde então, quantidades crescentes de penicilina vêm sendo desviadas para este fim (PRÄVE et al., 1987). Neste sentido, a empresa Gist-Brocades, maior produtora mundial de penicilina, está trabalhando intensamente com o objetivo de viabilizar a síntese das cefalosporinas injetáveis a partir de 6-APA (HERSBACH, et al., 1984). Se isto for conseguido e, como a princípio parece, os preços finais dos produtos forem reduzidos, a viabilidade de se produzir cefalosporina C só será mantida com a implantação de medidas que levam a uma redução proporcional dos custos de produção.

3: MATERIAL E MÉTODOS

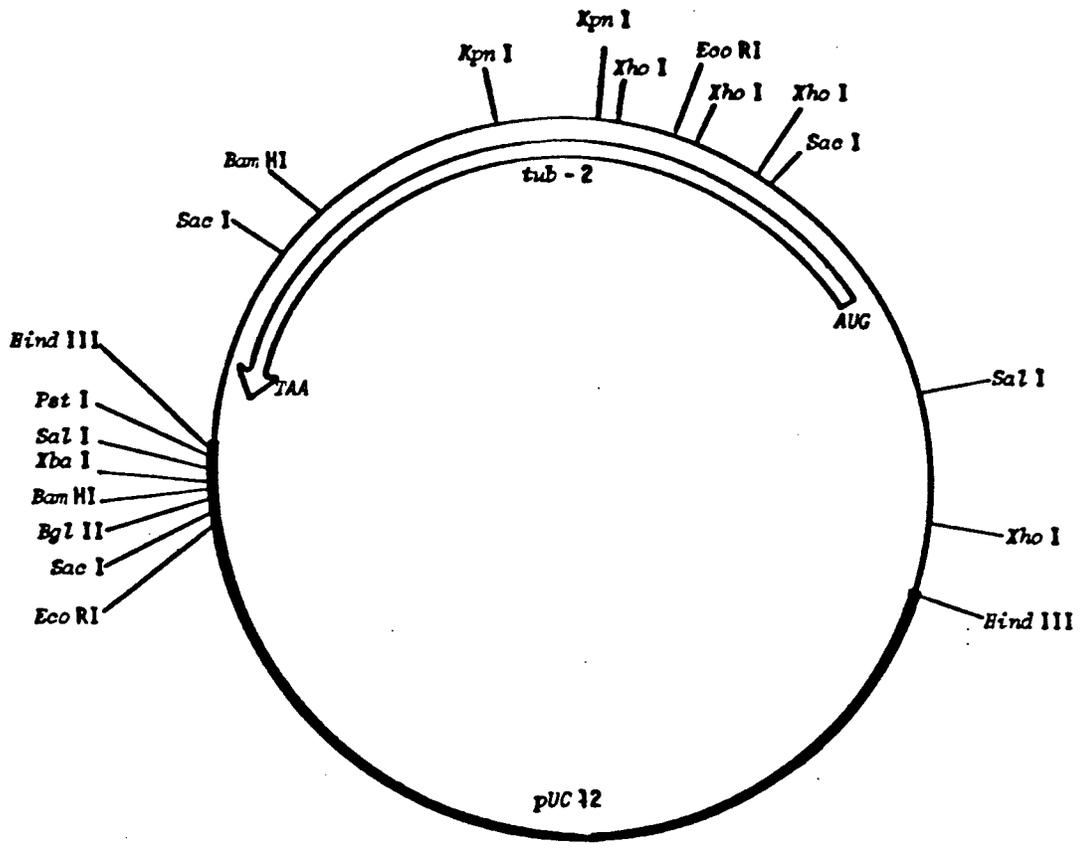
3.1 Linhagens

Acremonium chrysogenum C-10. Esta cultura foi gentilmente cedida pelo Dr. Robert T. Rowlands da PANLABS, empresa que desenvolveu a linhagem num extenso programa de melhoramento genético e que a depositou na American Type Culture Collection sob o número 48272. Ela produz artrosporos unicelulares que podem ser classificados em dois tipos: um grande e esférico que surge pela fragmentação de hifas contendo células bastante inchadas, e outro menor e elipsoidal formado a partir de células moderadamente inchadas (MATSUMURA et al., 1980; PEBERDY, 1987). No entanto, a grande maioria, senão todos os artrosporos produzidos pela linhagem C-10 nos meios de cultura usados no presente trabalho, são do primeiro tipo. Como foram encontradas dificuldades para se trabalhar apenas com esporos, os inóculos utilizados nos experimentos continham também fragmentos de hifa compostos por número variado de células. Assim sendo, será empregado o termo unidade formadora de colônia (UFC) para designar o número de propágulos presentes nas diversas suspensões.

Alcaligenes faecalis ATCC 8750. Esta linhagem é sensível à deacetilcefalosporina C, deacetoxicefalosporina C, cefalosporina C e penicilina N. Porém, no caso desta última substância, a sensibilidade apresentada é cerca de dez vezes menor, o que torna o microrganismo apropriado para ser utilizado nos testes de dosagem das cefalosporinas (SMITH et al., 1967).

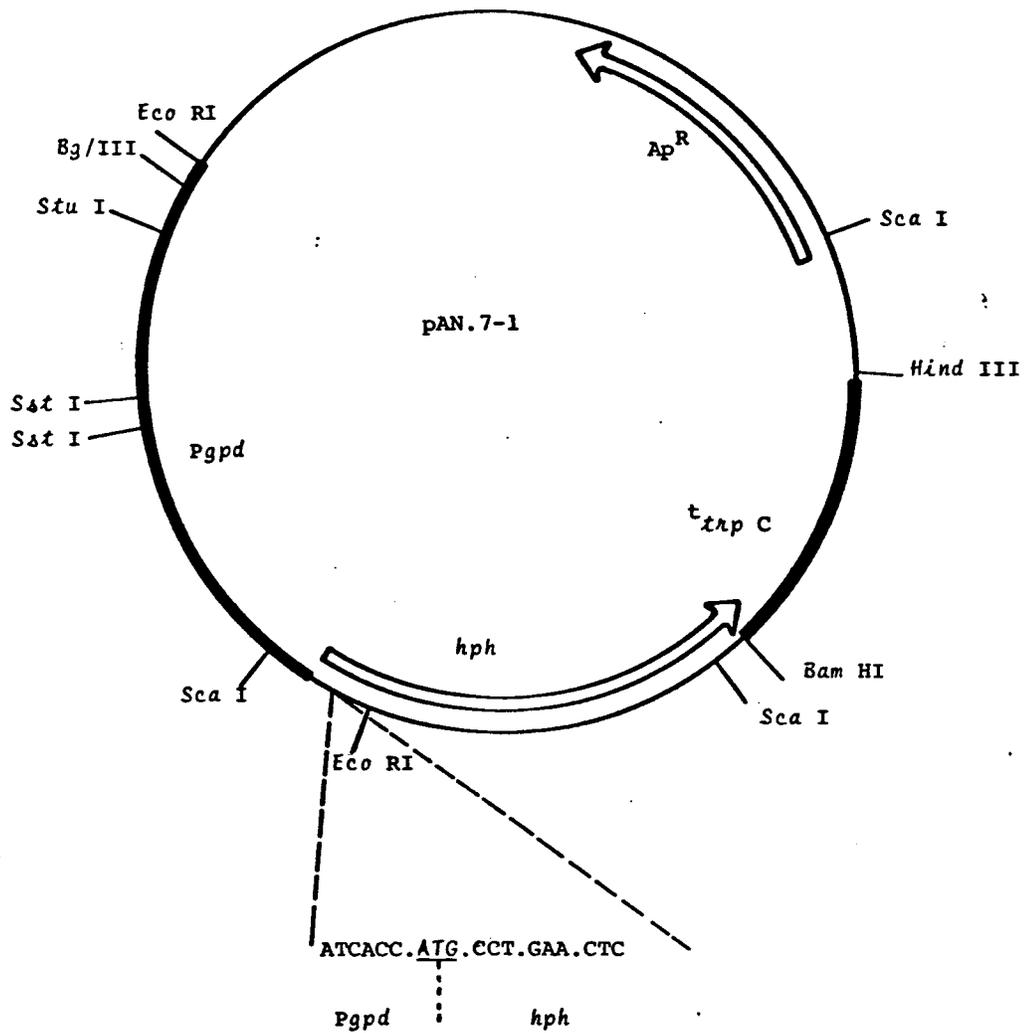
Escherichia coli TG2. Esta linhagem é rec⁻, resistente à tetraciclina e sensível à ampicilina, substância à qual ela passa a ser resistente depois de transformada com o plasmídeo pBT6 (Figura 6).

Escherichia coli DH5 α . Esta linhagem é rec⁻ e hsd^R. Ela passa a ser resistente à higromicina B depois de transformada com o plasmídeo pAN7-1 (Figura 7).



- - pUC 12
- - DNA de *N. crassa* contendo o gene *tub-2*. AUG e TAA são, respectivamente, os códons de iniciação e terminação

Figura 6: Mapa de restrição do plasmídeo pBT6 (5,8 kb)



hph = gene da higromicina B de *E. coli*

P *gpd* = promotor da glicose-6-fosfato desidrogenase de *A. nidulans*

Figura 7: Mapa de restrição plasmídeo pAN7-1

3.2 Meios de cultura

Com exceção da água de milho, farelo e óleo de soja, todos os componentes utilizados para a formulação dos meios são grau P.A.

3.2.1 Meio mínimo - MM (SHEN et al., 1986)

Sacarose	20,0 g
Nitrato de sódio	3,0 g
Fosfato dibásico de potássio	0,5 g
Fosfato monobásico de potássio	0,5 g
Cloreto de potássio	0,5 g
Sulfato de magnésio heptaidratado	0,5 g
Sulfato ferroso heptaidratado	0,01 g
Água destilada (q.s.p.)	1,01

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH 1,0 N ou HCl 1,0 N. Quando utilizado sólido, adicionou-se 15,0 g/l de ágar.

3.2.2 Meio mínimo sem Enxofre - MMS-

Sacarose	20,0 g
Nitrato de sódio	3,0 g
Fosfato dibásico de potássio	0,5 g
Fosfato monobásico de potássio	0,5 g
Cloreto de potássio	0,5 g
Cloreto de magnésio hexaidratado	0,5 g
Cloreto férrico hexaidratado	0,01 g
Água destilada (q.s.p)	1,01

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH 1,0 N ou HCl 1,0 N. Quando utilizado sólido, adicionou-se 15,0 g/l de ágar.

3.2.3 Meio completo - MC (SHEN et al., 1986)

Foi adicionado a 1 litro de Meio Mínimo:

Extrato de levedura	4,0 g
Peptona	4,0 g

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH 1,0 N ou HCl 1,0 N. Quando utilizado sólido, adicionou-se 15,0 g/l de ágar.

3.2.4 Meio de pré-fermentação (SHEN et al., 1986)

Amido solúvel	40,0 g
Água de milho	30,0 g
Farelo de soja	10,0 g
Carbonato de cálcio	3,0 g
Sulfato de amônio	1,0 g
Óleo de soja	24,0 ml
Água destilada (q.s.p)	1,0 l

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1,0 N ou HCl 1,0 N.

3.2.5 Meio de fermentação (modificado de SHEN et al., 1986)

Sacarose	36,0 g
Glicose	27,0 g
Extrato de levedura	20,0 g
Sulfato de cálcio	7,5 g
Carbonato de cálcio	10,0 g
Sulfato de amônio	8,0 g
D,L-metionina	3,0 g
Óleo de soja	30,0 ml
Água destilada (q.s.p.)	1,0 l

O pH foi ajustado para 6,4 com NaOH 1,0 N ou HCl 1,0 N.

3.2.6 Meio sólido de produção

Sacarose	36,0 g
Glicose	27,0 g
Extrato de levedura	20,0 g

Sulfato de cálcio	1,0 g
Carbonato de cálcio	1,0 g
Sulfato de amônio	8,0 g
D,L-metionina	3,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada (q.s.p.)	1,0 l

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1,0 N ou HCl 1,0 N.

3.2.7 Meio de produção de micélio - MPM (QUEENER et al., 1985)

Sacarose	31,6 g
Glicose	2,2 g
Água de milho	0,5 g
L-asparagina (autoclavada separadamente)	7,5 g
Acetato de amônio	0,22 g
Fosfato monobásico de potássio	15,0 g
Fosfato dibásico de potássio	21,0 g
Sulfato de sódio	0,75 g
Sulfato de magnésio heptaidratado	0,18 g
Cloreto de cálcio	0,06 g
Solução de sais	1,0 ml
Água destilada (q.s.p.)	1,0 ml

Solução de sais:

Sulfato ferroso amoniacal hexaidratado	15,0 g
Sulfato de manganês tetraidratado	3,0 g
Sulfato de zinco heptaidratado	3,0 g
Sulfato de cobre pentaidratado	0,8 g
Água destilada (q.s.p.)	1,0 l

3.2.8 Caldo soja tripticaseína ou "tryptic soy broth" - TSB

Peptona de caseína	17,0 g
Peptona de soja	3,0 g
Dextrose	2,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato dibásico de potássio	2,5 g
Água destilada (q.s.p.)	1,0 l

O pH foi ajustado para 7,3 com NaOH 1,0 N ou HCl 1,0 N.

3.2.9 Agar soja tripticaseína ou "tryptic soy agar" - TSA

Ao meio TSB foram adicionadas 15 g/l de ágar. O pH foi ajustado para 7,3 com NaOH 1,0 N ou HCl 1,0 N.

3.2.10 Meio TSA 50%

Foi preparado de acordo com o item anterior, tendo sido acrescentado 50% da quantidade de TSB. O pH também foi ajustado para 7,3.

3.2.11 Meio TSA com 10,3% de sacarose

Foi preparado de maneira idêntica à descrita no item 3.2.9, tendo sido acrescentado 103 g/l de sacarose. O pH foi ajustado para 7,3 e a esterilização foi feita em autoclave à 0,5 atmosfera por 30 minutos.

3.2.12 Meio completo com 10,3% de sacarose

Foi preparado conforme descrito no item 3.2.3, tendo sido utilizado 103 g/l de sacarose ao invés de 20 g/l. O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH 1,0 N ou HCl 1,0 N. A esterilização foi feita em autoclave à 0,5 atmosfera por 30 minutos.

3.2.13 Meio completo com 20% de sacarose

Foi preparado de maneira idêntica à descrita no item anterior, exceto a quantidade de sacarose que foi 200 g/l ao invés dos 103.

3.2.14 Meio LB (Luria Bertani Medium: MILLER, 1972)

Triptona	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Cloreto de sódio	10,0 g
Água destilada (q.s.p.)	1,0 l

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH 1,0 N ou HCl 1,0 N. Quando necessário, acrescentou-se 1,5% de ágar. Após esterilização, foram adicionados 100 µg/ml de ampicilina.

3.3 Soluções

3.3.1 Solução salina

Cloreto de sódio	8,8 g
Água destilada (q.s.p.)	1,0 l

3.3.2 Soluções de selenato de sódio

Foram preparadas em água destilada e esterilizadas em filtro Millipore 0,2 µm nas seguintes concentrações: 5 mM, 40 mM, 1,25 M e 2,5 M.

3.3.3 Solução de cromato de sódio

Foi preparada em água destilada, na concentração de 200 mM, e esterilizada em filtro Millipore 0,2 µm.

3.3.4 Solução de benomil

O produto utilizado foi o Benlate, preparado comercial contendo benomil [metil-1-(butil-carbamoil)-2-benzimidazol-carbamato] e veículo, na proporção 1:1.

A solução foi preparada adicionando-se 60 mg de Benlate diretamente em 100 ml de etanol absoluto, resultando numa concentração final de benomil de 300 µg/ml. A solução foi estocada a 4°C.

3.3.5 Solução reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS)

Ácido 3,5-dinitrossalicílico	10,6 g
Hidróxido de sódio	29,8 g
Água destilada	1416,0 ml

Dissolver a quente e adicionar:

Fenol fundido a 50°C	7,6 ml
Metabissulfito de sódio	8,3 g

3.3.6 Solução estabilizante de cor

Tartarato de sódio e potássio (KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O)	15,1 g
Tartarato de sódio e potássio anidro	12,3 g
Água destilada (q.s.p.)	1,0 l

3.3.7 Tampão para protoplastos - TPC

Solução A: tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0.

Solução B: cloreto de sódio 3,2 M.

Solução C: sulfato de magnésio heptaidratado 0,08 M.

Depois de autoclavadas, as soluções A, B e C foram misturadas na proporção de 2:1:1, respectivamente. Com isso, obtém-se o tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, cloreto de sódio 0,8 M e sulfato de magnésio 0,02 M.

3.3.8 Solução de ditioneitol 0,01 M

As soluções 0,01 M de ditioneitol foram preparadas em tampão TPC (item 3.3.7) e esterilizadas por filtração.

3.3.9 Solução de Novozym 234

As soluções 2 mg/ml de Novozym 234 foram preparadas em tampão TPC (item 3.3.7) e esterilizadas por filtração.

3.3.10 Solução de Lysing Enzymes (Novozym 234)

As soluções 2 mg/ml de Lysing Enzymes foram preparadas em tampão TPC (item 3.3.7) e esterilizadas por filtração.

3.3.11 Solução NaCl 0,8 M

Cloreto de sódio	46,8 g
Água destilada (q.s.p.)	1,0 l

3.3.12 Solução estoque de Tris - HCl 1 M, pH 8,0

Tris	12,1 g
Água destilada (q.s.p.)	100,0 ml

O pH foi ajustado com ácido clorídrico concentrado. A seguir, foi esterilizada e mantida a -20°C.

3.3.13 Solução estoque de Tris-HCl 1 M, pH 7,5

Preparada e estocada conforme o descrito no item anterior.

3.3.14 Solução estoque de EDTA 0,5 M, pH 8,0

EDTA (sal dissódico)	16,8 g
Água destilada (q.s.p.)	100,0 ml

O pH foi ajustado adicionando hidróxido de sódio em pastilhas. Após esterilização, foi mantida a -20°C.

3.3.15 Solução estoque de NaCl 5 M

Cloreto de sódio	29,2 g
Água destilada (q.s.p.)	100,0 ml

3.3.16 Solução estoque de SDS

SDS	20,0 g
Água destilada (q.s.p.)	100,0 ml

Foi mantida à temperatura ambiente, sem ter sido esterilizada.

3.3.17 Solução estoque de glicose 0,5 M

D-glicose anidra	9,0 g
Água destilada (q.s.p.)	100,0 ml

Foi esterilizada por filtração e mantida a -20°C.

3.3.18 Solução I (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM; glicose 50 mM)

Foi preparada adicionando-se 2,5 ml da solução estoque de Tris (item 3.3.12) e 2,0 ml da solução estoque de EDTA (item 3.3.14) em um frasco, e completando-se o volume para 90 ml com água destilada. Após esterilização, foi estocada a 4°C. Somente antes de ser utilizada, acrescentou-se 1/10 do volume da solução de glicose (item 3.3.17).

3.3.19 Solução II

Hidróxido de sódio	0,8 g
Água destilada (q.s.p.)	95,0 ml

A solução foi esterilizada e mantida à temperatura ambiente. Antes de ser utilizada, acrescentou-se 1/20 de seu volume da solução estoque de SDS 20% (item 3.3.16).

3.3.20 Solução III

Foram dissolvidas 40,8 g de acetato de sódio triidratado em aproximadamente 30 ml de água destilada, ajustando-se o pH para 4,8 com ácido acético glacial. A seguir, o volume foi completado para 100 ml e a solução estocada a 4°C (sem esterilizar).

3.3.21 Tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM)

Foi preparado adicionando-se 2,5 ml de solução estoque de Tris (item 3.3.12) e 2,0 ml da solução estoque de EDTA (item 3.3.14) em um frasco e completando-se o volume para 100 ml. Após esterilização foi estocada a 4°C.

3.3.22 Tampão R (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; EDTA 0,1 mM)

Foi preparado adicionando-se 2,0 ml da solução estoque de Tris (item 3.3.13) e 0,02 ml da solução estoque de EDTA (item 3.3.14) em um frasco, e completando-se o volume para 100 ml. Após esterilização foi estocada a 4°C.

3.3.23 Solução L (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; NaCl 150 mM)

Foi preparada adicionando-se 2,0 ml da solução estoque de Tris (item 3.3.12), 20 ml da solução estoque de EDTA (item 3.3.14) e 3,3 ml da solução estoque de cloreto de sódio (item 3.3.15) em um frasco, e completando-se o volume para 100 ml. Após esterilização, foi estocada a 4°C.

3.3.24 Tampão Tris de equilíbrio

Tris	24,2 g
Solução estoque de EDTA (item 3.3.14)	0,4 ml
Água destilada (q.s.p.)	100,0 ml

O pH foi ajustado para 11,0 com ácido clorídrico concentrado e a solução, esterilizada e estocada a -20°C.

3.3.25 Tampão Tris para estocagem

Tris	6,06 g
Solução estoque de EDTA (item 3.3.14)	0,40 ml
Solução estoque de cloreto de sódio (item 3.3.15)	2,00 ml
Água destilada (q.s.p.)	100,00 ml

O pH foi ajustado para 7,5 com ácido clorídrico concentrado e a solução, esterilizada e estocada a -20°C.

3.3.26 Tampão NCM (Tris 10 mM, pH 7,0; NaCl 0,8 M; CaCl₂ 50 mM)

Tris	0,121 g
NaCl	4,676 g
CaCl ₂	0,735 g

O pH do Tris foi acertado para 7,0 com HCl concentrado, acrescentou-se o NaCl e completou-se o volume para 80 ml com água. O CaCl₂ foi preparado em 20 ml de água e esterilizado separadamente, sendo adicionado ao restante da solução apenas no momento do uso.

3.3.27 Tampão CCM (Tris 10 mM, pH 7,0; NaCl 0,8 M; CaCl₂ 50 mM; PEG 18 ou 50%)

Tris	0,012 g
NaCl	0,467 g
CaCl ₂	0,735 g

A solução de Tris com NaCl foi preparada como no item anterior. O PEG 6000 (Sigma) foi adicionado (1,8 g para 18% e 5,0 para 50%) e o volume completado para 9 ml. Aliquotas de 1 ml de uma solução previamente preparada de CaCl₂ 500 mM foram adicionadas aos frascos acima somente na hora do uso.

3.3.28 Solução clorofane

A 1 volume de clorofórmio, foi adicionado 1 volume de fenol contendo 0,05% (p/v) de hidroxiquinolina e 0,5% (v/v) de β-mercaptoetanol. A esta solução foi adicionado igual volume do tampão Tris de equilíbrio (item 3.3.24). Após agitação por 30 minutos, a fase aquosa foi retirada e desprezada. À fase fenólica foi acrescentada igual volume de tampão Tris para estocagem (item 3.3.25). A mistura foi mantida a 4°C.

3.3.29 Solução clorofil

A 24 volumes de clorofórmio, foi acrescentado 1 volume de álcool isoamílico. À mistura foi adicionado igual volume de tampão TE (item 3.3.21). Após agitação de 30 minutos, a fase aquosa foi retirada e desprezada. A seguir, acrescentou-se novamente tampão TE, e a mistura foi mantida a 4°C.

3.3.30 Solução estoque de RNase (10 mg/ml)

Solução III (item 3.3.20)	0,17 ml
RNase	0,10 g
Água destilada (q.s.p.)	100,00 ml

A solução estoque foi fervida em banho-maria por 20 minutos e armazenada a -20°C.

3.3.31 Solução de PEG 4000 a 40% (Tris 50 mM, pH 7,5; sacarose 10,8%; CaCl₂ (50 mM))

Solução estoque de Tris (Item 3.3.13)	0,5 ml
Sacarose	1,08 g
PEG 4000 (Sigma)	4,0 g

A solução foi preparada em frascos contendo 9 ml de água esterilizada. O CaCl₂ foi acrescentado conforme indicado no item 3.3.27.

3.3.32 Solução Estoque de Higromicina B (Sigma)

Um total de 125 mg de higromicina B foi pesado e transferido para um frasco previamente esterilizado, ao qual adicionou-se água destilada esterilizada até completar o volume de 5 ml. A solução foi dividida em lotes de 1 ml e mantida a -20°C.

3.4 Esterilização e temperatura de incubação

Excetuando-se os casos especificados de maneira diferente, todos os meios de cultura e soluções foram autoclavados a 1 atm por um período de 15 minutos.

Quanto às temperaturas de incubação, utilizou-se 25°C para as culturas de *A. chrysogenum* e 37°C para *A. faecalis* e *E. coli*.

3.5 Curvas de resistência à luz ultravioleta

A partir de culturas incubadas 7 dias em tubos de MC inclinado, foram preparadas suspensões celulares adicionando-se 6 ml de solução salina (item 3.3.1) em cada tubo e raspando-se o micélio com a ponta da pipeta até que ele se desprendesse totalmente da superfície do meio de cultura. Visando a obtenção de suspensões com maior número de unidades formadoras de colônias (UFC), estas foram imediatamente transferidas para tubos contendo pérolas de vidro e agitadas em Vórtex por cerca de 1 minuto.

As suspensões celulares obtidas com este procedimento, que continham entre $5,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ UFC/ml, foram diluídas 1 vez em solução salina (item 3.3.1) na proporção de 1:10 e depois transferidas para placas de petri vazias esterilizadas, onde foram irradiadas por 30, 60, 90, 120 e 150 segundos com lâmpada emitindo luz ultravioleta (UV) de ondas curtas (254 nm), colocada a uma altura de 22 cm. Volumes de 0,5 ml das suspensões irradiadas nos diferentes tempos, bem como das suspensões não irradiadas, foram coletadas, convenientemente diluídas em solução salina e semeadas em placas contendo MC. Após 7 dias de incubação, as colônias foram contadas e a porcentagem de sobrevivência foi calculada para cada um dos tratamentos, tomando-se como 100% o número de colônias

crecidas a partir das suspensões não irradiadas. Foram feitos 3 experimentos com 3 repetições para cada um dos tempos ensaiados.

3.6 Crescimento da linhagem C-10 em vários meios de cultura

Toda vidraria utilizada neste caso foi lavada 2 vezes com detergente, 10 vezes em água de torneira e mais 10 vezes em água destilada, e seca em estufa cobertas com papel alumínio.

3.6.1 Em meio sólido

3.6.1.1 Em diluição para contagem

As suspensões celulares foram preparadas e diluídas de acordo com o item 3.5. Aliquotas de 0,1 ml da diluição final foram transferidas para placas de petri contendo os seguintes meios: MC, MM, MMS⁻, MMS⁻ preparado com água Milli-Q (MMS⁻MQ), MMS⁻ contendo 10 mg/l de D,L-metionina (MMS⁻M), MMS⁻MQ onde os 2% de sacarose foram substituídos por 2% de lactose (MMS⁻MQ L), MMS⁻MQ onde os 2% de sacarose foram substituídos por 2% de glicose (MMS⁻MQ G) e MMS⁻MQ onde utilizou-se 1% de sacarose e 1% de glicose (MMS⁻MQ SG).

As leituras foram realizadas após 17 dias de incubação, contando-se o número de colônias e calculando-se a porcentagem relativa de crescimento, tomando-se os resultados obtidos em MC como 100%. Foram feitas 3 repetições por tratamento.

3.6.1.2 Em inóculo por ponto

Esta técnica foi aplicada mergulhando-se um fio de platina numa suspensão celular, preparada como no item 3.5, e introduzindo-o nos mesmos meios empregados no item 3.6.1.1.

As leituras foram feitas com 10 e 21 dias de incubação, medindo-se os diâmetros das colônias e calculando-se a porcentagem relativa de crescimento, tomando-se como 100% os resultados obtidos em MC. Foram feitas 4 repetições por tratamento.

3.6.2 Em meio líquido

Volumes de 5 ml dos meios MC, MM, MMS⁻ e MMS⁻ MQ, distribuídos em tubos de ensaio de 20 ml, foram inoculados com suspensões celulares obtidas de acordo com o descrito no item 3.5, de tal forma a se obter uma concentração final de 10⁶ UFC/ml.

Após 6 dias de incubação sem agitação, a leitura foi feita comparando-se os resultados obtidos nos vários meios com os obtidos para MC. O teste foi feito em duplicata.

3.6.3 Em meio líquido com agitação

Uma suspensão de células foi preparada conforme indicado no item 3.5 e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes com solução salina. A seguir, a suspensão foi convenientemente diluída e utilizada para inocular erlenmeyers de 250 ml contendo 25 ml de MM e MMS⁻ na proporção de 10⁶ UFC/ml. Após 6 dias de incubação a 25°C e 250 rpm, os conteúdos dos frascos foram filtrados em filtro Millipore de 0,45 µm.

Antes de serem utilizados, os filtros foram pesados secos, depois umedecidos e pesados novamente tomando-se o cuidado de retirar o excesso de água. Os pesos secos e úmidos foram calculados pela diferença entre os pesos secos e úmidos dos filtros sem micélio e os pesos secos e úmidos dos filtros contendo micélio, respectivamente. A secagem foi feita a 40°C por 72 horas.

Este teste foi conduzido em duplicata. Volumes de 1 ml do outro frasco contendo MMS⁻ foram utilizados para inocular os 4 frascos da etapa seguinte. Foram feitos 3 etapas.

3.7 Metodologia utilizada nos testes de produção de cefalosporina C

3.7.1 Acúmulo de cefalosporina C em função do tempo

3.7.1.1 Pré-fermentação

Volumes de 2,5 ml de suspensões celulares, preparadas conforme o descrito no item 3.5, foram transferidas para frascos erlenmeyer sem aletas de 500 ml contendo 50 ml de meio de pré-fermentação (item 3.2.4). A seguir, eles foram incubados por 54 horas a 25°C e 250 rpm.

3.7.1.2 Fermentação

Aliquotas de 1,6 ml do caldo pré-fermentado foram utilizadas para inocular frascos erlenmeyer sem aletas de 500 ml contendo 40 ml de meio de fermentação (item 3.2.5). A fermentação foi conduzida a 25°C e 250 rpm. Diariamente, do 1º ao 7º dia, 3 frascos eram retirados e seus conteúdos centrifugados 15 minutos a 3.000 rpm. Os volumes dos precipitados foram medidos e transformados em porcentagem dividindo-se seus valores pelos volumes dos tubos. Os dados assim obtidos foram utilizados como medida de crescimento. Os sobrenadantes tiveram seus valores de pH medidos, sendo depois separados e usados para as demais análises, descritas nos itens seguintes.

3.7.2 Dosagem da cefalosporina C

3.7.2.1 Método microbiológico

- Curva padrão

Foram preparadas soluções contendo cefalosporina C (Sigma) com concentrações variando na faixa de 0,2 a 2,6 g/l. Aliquotas de 5 µl das mesmas foram transferidas para discos de papel de filtro Whatman 44 com aproximadamente 6 mm de diâmetro, os quais foram mantidos à temperatura ambiente até que estivessem secos. Então, eles foram transportados para placas de petri contendo meio TSA 50% (item 3.2.10) em cuja superfície tinha sido espalhada uma suspensão contendo o microrganismo sensível à cefalosporina C (*A. faecalis* ATCC 8750). O espalhamento foi obtido utilizando-se o método do "swab", feito a partir de culturas bacterianas crescidas em meio TSB (item 3.2.8) por um período de 4 horas (fase exponencial).

Após um período de incubação de 18 horas, a leitura foi realizada medindo-se os diâmetros dos halos de inibição. Com estes dados, foi possível obter a equação da reta de regressão.

Foram feitas 3 curvas, sendo que cada uma delas com 4 repetições por tratamento.

- Amostras

Os sobrenadantes dos caldos fermentados, obtidos conforme o descrito no item 3.7.1.2, foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm. A quantidade de cefalosporina C presente

nestas amostras foi ensaiada conforme o descrito no item anterior. O teste foi feito em duplicata.

A cada teste de dosagem realizado, também foram ensaiadas três concentrações conhecidas de cefalosporina C.

3.7.2.2 Dosagem por HPLC

- Padrão

Em solução 0,03% (p/v) de fosfato monobásico de potássio, foi acrescentado 0,01% (p/v) de cefalosporina C (Sigma). Aliquotas de 10 µl desta solução foram injetadas nos sistemas Varian 9010 e 9050 com integrador 4290. Utilizou-se coluna de fase reversa Lichrospher (Merck) RP-18 (5 µm; 100 x 4,6 mm).

O tempo de retenção da cefalosporina C é 7,30 minutos e sua detecção é feita a 254 nm com sensibilidade de 0,020 aufs, com integração PW: 6, cs: 0,25 e AT:4.

A quantificação é feita dividindo-se o valor da área integralizada pela concentração (em %).

O padrão foi injetado em duplicata e considerado como tendo 82% de cefalosporina C na forma ácida.

- Amostras

As amostras foram ensaiadas e quantificadas nas mesmas condições descritas para o padrão. Para se obter a concentração absoluta do produto nas amostras, os dados foram comparados com os valores obtidos no padrão.

Foram feitas duas repetições por amostra.

3.7.3 Determinação de açúcares redutores pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS), (MILLES, 1959)

3.7.3.1 Determinação de açúcares redutores

- Curva padrão

O método DNS apresenta sensibilidade ótima na faixa de 0,1 a 1,0 g/l. Assim sendo, a curva padrão foi elaborada utilizando-se soluções de glicose cujas concentrações variaram dentro desta mesma faixa, com intervalos de 0,1 g/l. A 1 ml de cada uma das soluções, foi acrescentado 1 ml de solução reagente de DNS (item 3.3.5). A mistura foi mantida 5 minutos em banho-maria em ebulição e depois transferida para banho de gelo. A seguir, foram adicionados 16 ml da solução estabilizante de cor (item 3.3.6) e a leitura da densidade óptica foi feita a 540 nm. Foram feitas 3 repetições por tratamento.

Com os dados obtidos foi feita a regressão linear, encontrando-se assim a equação da reta.

É necessário que se faça uma curva padrão toda vez que for preparada uma nova solução de DNS.

- Amostras

A determinação da quantidade de açúcares redutores nas amostras foi realizada medindo-se a densidade óptica a 540 nm, e introduzindo os valores obtidos na equação de regressão (item anterior).

As análises foram feitas em duplicata e, quando necessário, as amostras foram diluídas para que as concentrações de açúcares redutores se situasse na faixa de 0,1 a 1,0 g/l.

3.7.3.2 Determinação de açúcares redutores totais

- Curva de calibração

O primeiro passo para fazer a curva de calibração consiste em preparar uma solução de sacarose com 3 g/l e hidrolizá-la acrescentando à mesma HCl 2 N na proporção de 2 ml para 2 ml. A seguir, a mistura é colocada em banho-maria em ebulição por 5 minutos, transferida para banho de gelo e neutralizada com 2 ml de NaOH 2 N. Com este procedimento, a solução final é diluída 3 vezes.

Na etapa seguinte, a solução final foi utilizada para elaborar uma curva de calibração. O procedimento adotado foi idêntico ao descrito no item 3.7.3.1.

Também neste caso, é necessário fazer uma curva de calibração toda vez que se prepara uma nova solução de DNS.

- Amostras

A determinação foi feita medindo-se a densidade óptica em 540 nm e introduzindo os valores obtidos na equação de regressão (item 3.7.3.1).

As análises foram feitas em duplicata e, quando necessário, as amostras foram diluídas para que as concentrações de açúcares redutores totais se situasse na faixa de 0,1 a 1,0 g/l, levando-se em consideração a diluição de 1:3 proporcionada na etapa de hidrólise.

3.8 Curva do Halo de Inibição em Função do Tempo de Incubação

Suspensões celulares foram preparadas de acordo com o item 3.5 e, com auxílio de uma alça de platina, transferidas para placas de petri de 10 cm de diâmetro contendo 20 ml de meio sólido de produção (Item 3.2.6) através de inóculo por ponto. Foram preparadas 12 placas, cada uma delas contendo 2 inóculos.

A seguir, as placas foram incubadas e a cada 48 horas 2 eram retiradas e sobre elas vertidos 10 ml de meio contendo a bactéria teste *Alcaligenes faecalis* (Item 3.1). Após permanecerem 18 horas a 37°C, as colônias tiveram seus halos de inibição medidos.

O meio utilizado como teste foi obtido adicionando-se 1 ml de uma cultura de *A. faecalis* crescida por 4 horas a 37°C em TSB (Item 3.2.8) a 9 ml de meio TSA 50% (Item 3.2.10) mantido a 45°C em banho-maria.

3.9 Isolamento ao Acaso de Colônias com Maior Produção de Cefalosporina C em Meio Sólido

Seguindo metodologia descrita no item 3.5 suspensões celulares foram preparadas, irradiadas e diluídas até atingirem entre 50 e 100 UFC/ml. Aliquotas de 0,1 ml foram transferidas para placas de petri de 10 cm de diâmetro contendo 20 ml de meio sólido de

produção (Item 3.2.6) e espalhadas com auxílio da alça de Digralsky. Após 5 dias de incubação a 25°C, as placas foram replicadas utilizando-se carimbo de veludo e invertidas. Às tampas das mesmas foi acrescentado 1,5 ml de clorofórmio e, decorridos 30 minutos, elas foram abertas e mantidas assim por mais 15 minutos para que o clorofórmio evaporasse. Na sequência, 10 ml do meio contendo *A. faecalis* foram vertidos sobre as placas, conforme descrito no item anterior. Após incubação, os halos de inibição foram medidos e a quantidade de cefalosporina C produzida, calculada através da comparação com uma curva padrão (Item 3.7.2.1).

As colônias cuja produção apresentou-se mais promissora foram isoladas voltando-se às placas replicadas, mantidas em estoque a 4°C e posteriormente testadas em "shaker".

Foram considerados promissores ("+") os isolados cuja produção excedeu o valor da média da população acrescido de 1,96 multiplicado pelo desvio padrão, conforme SIMPSON e CATEN (1979).

3.10 Isolamento e Teste das Colônias de Crescimento Vegetativo Reduzido

Suspensões celulares foram preparadas conforme o item 3.5, irradiadas por 120 s e diluídas de modo a se obter de 1000 a 3000 UFC/ml. Aliquotas de 0,1 ml foram espalhadas em placas de petri contendo MM (Item 3.2.1) e, depois de 10 dias de incubação, as colônias de crescimento compacto foram contadas, objetivando calcular sua frequência, cultivadas em tubo inclinado contendo MC (Item 3.2.3) e estocadas a 4°C.

Os mutantes foram testados exatamente como o descrito no item 3.9, exceto que as colônias foram inoculadas por ponto. Foram ensaiadas 10 colônias por placa. Também neste caso, os mutantes com halos de inibição maiores ("+") foram estocados para testes posteriores.

3.11 Teste dos Isolados "+"

Os isolados ao acaso classificados como "+" (Item 3.9) e os mutantes com crescimento reduzido foram testados sob agitação (Item 3.7.1.2). Após 6 dias de fermentação foi feita a retirada das amostras para análise

O ensaio foi realizado com apenas uma repetição por isolado. Em cada lote a ser fermentado, cerca de 20% dos frascos era constituído por repetições da linhagem C-10, de tal forma que após testar todos os 152 mutantes, haviam sido feitas 42 repetições da C-10.

3.12 Teste dos Mutantes de Crescimento Reduzido "+" e dos Três Melhores Produtores entre os Isolados ao Acaso "+"

Os mutantes morfológicos "+" (M-5, M-76 e M-90) foram classificados conforme o item 3.9. Da mesma forma, os melhores produtores entre os isolados ao acaso "+" (A-79, A-818 e A-1191) também foram identificados.

Os 6 isolados tiveram sua produção de cefalosporina C estimadas em "shaker" e comparada com a linhagem C-10, seguindo metodologia descrita no item 3.7.1.2. Foram feitas 6 repetições por tratamento e as análises foram feitas no 6º dia.

3.13 Curvas de resistência ao selenato

3.13.1 Em MMS⁻ contendo D,L-metionina

Suspensões celulares preparadas de acordo com o descrito no item 3.5, foram diluídas em solução salina (item 3.3.1) até que concentrações da ordem de 10^3 UFC/ml fossem obtidas. Aliquotas de 0,1 ml da diluição final foram então transferidas para placas de petri vazias esterilizadas, sobre as quais adicionou-se MMS⁻ a uma temperatura de 45°C e contendo 10 mg/l de D,L-metionina e selenato de sódio nas seguintes concentrações: 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4, 12,8, 25,6, 51,2 e 102,4 mM. Após 10 dias de incubação, as colônias foram contadas e a porcentagem de sobrevivência foi calculada para cada um dos tratamentos, tomando-se como 100% o número de colônias crescidas nas placas contendo o meio de cultura sem selenato de sódio. Foram feitos dois experimentos com 3 repetições por tratamento.

Nas mesmas condições, foi preparada uma placa com cerca de 10^6 UFC para cada um dos tratamentos. Após 10 dias de incubação, o crescimento nas placas contendo selenato foi quantificado comparando-se com o controle sem a droga. Nas placas onde cresceram colônias isoladas e vigorosas, elas foram contadas e suas frequências calculadas.

3.13.2 Em MMS⁻ sem D,L-metionina

Foi conduzido de maneira idêntica é descrita no item 3.13.1, excetuando-se o fato de que neste caso utilizou-se 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,8 mM de selenato de sódio.

3.14 Curva de resistência ao cromato de sódio

3.14.1 Em MMS⁻ contendo 10 mg/l de D,L-metionina

Suspensões celulares foram preparadas, diluídas e plaqueadas de acordo com o item 3.13.1. As concentrações de cromato de sódio ensaiadas foram 0,0025, 0,005, 0,010, 0,020, 0,040 e 0,080 mM.

As porcentagens de sobrevivência bem como o crescimento nas placas contendo 10^6 UFC, também foram quantificadas de acordo com o item 3.13.1. O teste foi feito em duplicata.

3.15 Isolamento de mutantes espontâneos resistentes ao selenato

Suspensões celulares foram preparadas como no item 3.5 e aliquotas desta suspensão contendo cerca de 10^6 UFC foram transferidas para placas de petri vazias, sobre as quais adicionou-se MMS⁻ a 45°C contendo 10 mg/l de D,L-metionina e selenato nas concentrações de 2,5 mM e 6,4 mM. Foram preparadas 7 placas com 2,5 mM e 6 placas com 6,4 mM.

Após 7 a 10 dias de incubação, as colônias que apresentaram crescimento vigoroso foram contadas, isoladas e as frequências calculadas.

Alguns dos prováveis mutantes foram isolados através de estria por esgotamento em MMS⁻ contendo 6,4 mM de selenato e mantidos a 4°C no mesmo meio.

3.16 Teste de confirmação de resistência ao selenato

Utilizando-se o método de estrias, todos os mutantes resistentes ao selenato foram transferidos para placas de petri contendo MMS⁻, 10 mg/l de D,L-metionina e 3,2 mM de selenato. Como controle foi utilizada a linhagem C-10 sensível, inoculada no mesmo meio de cultura com e sem a droga.

Após 7 a 10 dias de incubação, as placas foram observadas com relação à presença ou ausência de crescimento.

3.17 Caracterização dos mutantes resistentes ao selenato

Suspensões celulares das linhagens foram preparadas de acordo com o descrito no item 3.5.

Com o auxílio de uma agulha de platina que foi mergulhada nas soluções a cada transferência efetuada, os inóculos foram feitos, por ponto, em placas com MMS⁻ (item 3.2.2) contendo 2 mg/l de D,L-metionina e selenato nas seguintes concentrações: 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 e 1,6 mM.

A leitura foi feita no 10^o e no 17^o dia de incubação, medindo-se o diâmetro das colônias. A linhagem C-10 foi ensaiada nas mesmas condições descritas para os mutantes. O teste foi feito em duplicata.

3.18 Caracterização dos mutantes resistentes ao selenato quanto a serem cromato sensíveis ou cromato resistentes

Este teste foi conduzido de maneira idêntica à descrita no item anterior.

O meio de cultura utilizado neste caso foi o MMS⁻ (item 3.2.2) contendo 10 mg/l de D,L-metionina e cromato nas seguintes concentrações: 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08 e 0,16 mM.

3.19 Curvas de resistência ao benomil

Suspensões celulares foram preparadas, diluídas e semeadas de acordo com o descrito no item 3.13.1. O meio de cultura nestes experimentos foi MC e as concentrações de benomil ensaiadas foram 0,25, 0,50, 0,75, 1,0 e 1,25 µg/ml.

As porcentagens de sobrevivência bem como o crescimento em placas contendo 10^6 UFC, foram quantificados da mesma maneira descrita no item 3.13.1. Foram feitos 4 experimentos com 3 repetições por tratamento.

3.20 Isolamento de mutantes resistentes ao benomil

3.20.1 Espontâneos

Aliquotas contendo 10^6 UFC foram retiradas de suspensões celulares preparadas como no item 3.5 e transferidas para placas de petri vazias sobre as quais adicionou-se MC a 45°C contendo benomil nas concentrações de 1,125, 1,25 e 1,375 µg/ml. Foram ensaiadas 7 placas por tratamento.

Após 7 dias de incubação, as colônias que apresentaram crescimento vigoroso foram contadas, isoladas e as frequências calculadas.

Alguns dos prováveis mutantes foram isolados através de estria por esgotamento em MC contendo 1,25 µg/ml de benomil e mantidos a 4°C no mesmo meio.

3.20.2 Induzidos

Este experimento foi conduzido exatamente como descrito no item 3.20.1, excetuando-se o fato das suspensões celulares terem sido expostas por 110 s à luz UV colocada a 22 cm de altura.

3.21 Caracterização dos prováveis resistentes ao benomil

As suspensões bem como os inóculos foram feitos de acordo com o descrito no item 3.17.

Utilizou-se o meio MC (item 3.2.3) contendo benomil nas seguintes concentrações: 0,5, 1,0, 1,25, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 µg/ml.

A leitura foi feita no 9º e 16º dia de incubação, medindo-se os diâmetros das colônias e considerando-se com 100% os valores obtidos no meio onde não foi adicionado benomil.

A linhagem C-10 foi ensaiada nas mesmas condições descritas para os prováveis mutantes. O teste foi feito em duplicata.

3.22 Resistência comparativa ao benomil em MC contendo 10,3% de sacarose

Suspensões celulares da linhagem C-10 e do mutante induzido *Ben^R₁* foram preparadas conforme descrito no item 3.5 e diluídas de tal forma a se obter suspensões finais com 10⁶ UFC/ml, das quais alíquotas de 1,0 ml foram transferidas para placas petri vazias. Sobre estas placas, adicionou-se MC com 10,3% de sacarose a uma temperatura de 45°C e contendo as seguintes concentrações de benomil: 0,5, 1,0, 1,25, 1,50, 1,75, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0. A leitura foi feita após 7 dias de incubação.

Neste teste comparativo também foram incluídos protoplastos da linhagem C-10, obtidos conforme descrição contida no item 3.26. Eles receberam tratamento idêntico ao das linhagens C-10 e *Ben^R₁*.

3.23 Curva de Resistência à Higromicina B de Micélio e Protoplastos da Linhagem C-10

Alíquotas de uma solução de 25 mg/ml de higromicina B (Item 3.3.32) foram adicionadas a frascos erlenmeyer mantidos a 45°C e contendo 100 ml de MC mais 10,3% de sacarose, de forma a se obter as seguintes concentrações: 2, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 µg/ml. Como controle foi utilizado apenas MC + 10,3% de sacarose.

A seguir, o conteúdo de cada um dos erlenmeyers foi vertido em 4 placas de petri contendo alíquotas de uma suspensão celular preparada de acordo com o item 3.5. Cada placa recebeu cerca de 10^7 UFC.

O mesmo procedimento foi seguido para testar os níveis de resistência dos protoplastos, cuja obtenção seguiu protocolo apresentado no item 3.26.

A leitura das placas foi feita após 5 dias de incubação.

3.24 Isolamento dos Mutantes Resistentes à Higromicina B

3.24.1 Espontâneos

Alíquotas da solução estoque de higromicina B (Item 3.3.32) foram adicionadas a frascos erlenmeyer mantidos a 45°C e contendo 100 ml de MC, de maneira a se obter a concentração final de 28 $\mu\text{g/ml}$. Como controle foi utilizado apenas MC.

O conteúdo dos erlenmeyers foi vertido em placas de petri contendo cerca de 10^6 UFC. Após 7 dias de incubação, as colônias que apresentaram crescimento vigoroso foram contadas, isoladas e suas frequências calculadas.

3.24.2 Induzidos

Este teste foi conduzido exatamente como no item anterior, excetuando-se o fato das UFC serem sobreviventes de uma irradiação de 120 s com luz ultravioleta.

3.25 Caracterização dos Mutantes Resistentes à Higromicina B

Suspensões celulares das linhagens foram preparadas de acordo com o item 3.5 e inoculadas por ponto em MC contendo as seguintes concentrações de higromicina B: 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 e 144 $\mu\text{g/ml}$. Foram feitas duas repetições por tratamento e as placas controle continham apenas MC.

A leitura foi efetuada após 12 dias de incubação medindo-se o diâmetro das colônias e transformando-os em porcentagem, considerando como 100% os resultados obtidos em MC.

A linhagem C-10 foi ensaiada nas mesmas condições.

3.26 Obtenção de protoplastos

Frascos erlenmeyer aletados de 500 ml contendo 100 ml de MPM (item 3.2.7) foram inoculados com 10^6 UFC/ml e incubados por 24 horas a 28°C e 200 rpm. A seguir, o conteúdo foi filtrado em filtro Millipore de 0,45 μ m e o micélio retido foi lavado 2 a 3 vezes com solução salina, sendo depois transferido para erlenmeyer sem aletas de 125 ml esterilizado e tarado.

A este erlenmeyer, foi adicionado ditioneitol 0,01 M (item 3.3.8) de tal forma a se obter uma suspensão final de 50 mg de micélio/ml. Após incubação de 90 minutos a 28°C e 150 rpm, o conteúdo foi filtrado em filtro Millipore de 0,45 μ m, e o micélio foi lavado 2 a 3 vezes com tampão TPC (item 3.3.7) e transferido para erlenmeyer sem aletas de 125 ml.

A ressuspensão foi feita em TPC contendo 2 mg/ml de Novozym 234 (item 3.3.9) ou seu similar comercializado pela Sigma, Lyzing Enzymes (item 3.3.10), reduzindo-se para 25 mg/ml a quantidade de micélio contida na suspensão. Depois de permanecer 150 minutos a 25°C e 150 rpm, a mistura foi filtrada em Nylon Cloth de 100 μ m e centrifugada por 3 minutos a 400 g. O sobrenadante foi desprezado e o pellet, lavado 3 vezes em TPC. A ressuspensão final foi feita em NaCl 0,8 M (item 3.3.11).

O número de protoplastos foi estimado em lâmina hematimétrica e, após terem sido diluídos na base 10 até 10^{-6} , foram semeados em TSA e/ou MC, ambos contendo 10,3% de sacarose (itens 3.2.11 e 3.2.12), a partir das menores diluições. Para se verificar a presença de fragmentos de hifas e esporos viáveis as diluições de ordem maior foram semeadas em TSA e/ou MC (itens 3.2.9 e 3.2.3).

A técnica utilizada para a semeadura foi "pour plate" e a contagem das colônias crescidas foi feita após 5 a 6 dias de incubação. O cálculo do número de protoplastos viáveis foi feito subtraindo-se do número de colônias crescidas nos meios contendo 10,3% de sacarose, as colônias crescidas nos meios sem sacarose, e dividindo-se o resultado pelo número de protoplastos estimado em lâmina hematimétrica.

Foram efetuadas 2 repetições para cada diluição em cada tratamento.

3.27 Maxipreparação do plasmídio pBT 6

3.27.1 Obtenção do caldo

Frascos erlenmeyer de 500 ml contendo 125 ml do meio LB com 100 µg/ml de ampicilina (item 3.2.14) foram inoculados utilizando-se 2 ml de uma cultura recente da *E. coli* TG2 contendo o plasmídio pBT 6. Após incubação a 37°C e 300 rpm por um período de 16 horas, 500 ml da cultura foram centrifugados a 5.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 25 ml da solução L (item 3.2.23) e divididas em três tubos de 40 ml.

3.27.2 Extração (Método 1)

Às células obtidas de acordo com o descrito no item anterior, foram adicionados 2,1 ml/tubo de solução I (item 3.3.18). Após vigorosa agitação por alguns segundos (Vórtex), adicionou-se 2,1 ml/tubo da solução I contendo 1 mg/ml de lisozima. Incubou-se no gelo por 25 minutos, agitando-se levemente de vez em quando.

Na seqüência, acrescentou-se 8,5 ml/tubo da solução II (item 3.3.19), agitando-se várias vezes por inversão suave do tubo, e adicionou-se 6,4 ml da solução III (item 3.3.20), agitando-se da mesma maneira. Após centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4°C, parte do precipitado não sedimentou e foi eliminado por filtração em Nylon Cloth 100 µm. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de isopropanol. A mistura foi mantida 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento mantido em dessecador por pelo menos 1 hora.

Depois, o sedimento foi ressuspensionado em 2 ml de tampão TE (item 3.3.21) e tratado por 30 minutos a 37°C com 30 µl de solução de RNase (item 3.3.30). À solução resultante foi adicionado 100 mM de NaCl e 1,5% de SDS, após o que, agitou-se vigorosamente por alguns segundos em Vórtex.

A seguir, foram feitas três extrações em clorofane (item 3.3.28), onde a interfase foi desprezada após a segunda etapa, e uma extração em clorofil (item 3.3.29).

O NaCl foi ajustado para 300 mM e 2,5 volumes de etanol 100% foram adicionados. Após 30 minutos de precipitação a 0°C, o sedimento foi coletado através de centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4°C e lavado duas vezes com etanol 70% a -20°C, centrifugando-o a 12.000 g por 2 minutos mas sem ressuspendê-lo. Depois de ter permanecido pelo menos

uma hora no dessecador, o sedimento foi ressuspensionado em 4 ml de tampão R (item 3.3.22) e estocado a -20°C.

3.27.3 Extração (Método 2)

O procedimento foi idêntico ao do item 3.27.2, exceto que neste caso não houve tratamento com RNase e nem as etapas de extração em clorofane e clorofil, ou seja, após a precipitação com isopropanol, o material foi ressuspensionado em 4 ml de TE e a seguir purificado em gradiente de cloreto de cézio.

3.27.4 Purificação em gradiente de cloreto de cézio

Foi adicionado 1 g de cloreto de cézio e 80 µl de uma solução 10 mg/ml de brometo de etídio para cada mililitro da solução final obtida na etapa de extração. A mistura foi centrifugada a 1.900 g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para tubos apropriados e centrifugado a 60.000 rpm (rotor VTi 80) por 20 horas a 20°C.

A banda inferior foi coletada com seringa adaptada à agulha de grosso calibre (40,0 x 1,2 mm) e o brometo de etídio removido adicionando-se 1 volume de butanol a 50%, centrifugando-se a mistura a 12.000 g e desprezando-se a fase superior. Este processo foi repetido até que ambas as fases estivessem límpidas.

O cloreto de cézio foi retirado dialisando-se a amostra contra 4 litros de água Milli-Q por 18 horas a 4°C. Este procedimento foi repetido por outras 24 horas e a pureza do material determinada dividindo-se o valor obtido com a absorbância a 260 nm pelo valor a 280 nm. A quantidade de DNA foi estimada multiplicando-se o valor da leitura a 260 nm por 50 e pelo fator de diluição.

Um método alternativo ao descrito no parágrafo anterior foi também utilizado. Após a remoção do brometo de etídio, o volume resultante foi medido, e a ele acrescentou-se 3 volumes de TE. A seguir, foi adicionado 1/10 do volume total de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol absoluto a -20°C, tendo a mistura ficado "overnight" a -20°C. Na sequência, o material foi centrifugado durante 15 minutos a 12000 g e 4°C. O "pellet" foi ressuspensionado em etanol 70% e centrifugado como descrito. A última etapa foi repetida por mais duas vezes e a ressuspensão final foi feita em 200 µl de TE.

3.28 Transformação da Linhagem C-10

3.28.1 Método I

Protoplastos preparados e contados como indicado no item 3.26 foram lavados e ressuspensos em tampão NCM (Item 3.3.26) de tal forma a se obter 10^9 protoplastos/ml. Aliquotas de 100 μ l deste material foram transferidas para tubos Eppendorf, às quais acrescentou-se 10 μ l de uma solução contendo entre 10 e 20 μ g de DNA e 10 μ l de tampão CCM (Item 3.3.27). Nos experimentos, utilizou-se tanto PEG tanto na concentração final de 18 quanto 50%. Controles sem DNA foram feitos em paralelo.

Após serem mantidos 20 minutos em banho de gelo, 500 μ l de tampão CCM foram adicionados a cada um dos tubos, que permaneceram mais 20 minutos à temperatura ambiente. Depois disso, 600 μ l de tampão NCM foram acrescentados aos todos e alíquotas de 50 ou 100 μ l desta suspensão final foram transferidas para placas de petri vazias, sobre as quais se colocou MC + 10,3% ou 20,6% de sacarose contendo benomil nas seguintes concentrações: 1,25, 1,50 e 1,75 μ g/ml, quando o plasmídeo utilizado era o pBT 6, e 24 μ g/ml de higromicina B no caso do pAN7-1. Outra condição ensaiada foi adicionar as drogas 24 horas depois do plaqueamento ter sido feito em MC contendo sacarose. Para tanto, foi acrescentado o mesmo volume de meio contendo o dobro da concentração das substâncias inibidoras.

A viabilidade dos protoplastos foi testada antes e depois do tratamento com o PEG, conforme descrição contida no item 3.26.

3.28.2 Método II (ISOGAI et al., 1991b)

Este teste foi conduzido de acordo com o descrito no item anterior excetuando-se as condições de transformação. Neste caso, alíquotas de 400 μ l de uma suspensão contendo cerca de 10^8 protoplastos/ml foram transferidas para frascos aos quais se acrescentou 20 μ g de DNA plasmidial e, após 30 minutos em banho de gelo, mais 4 ml de uma solução de PEG 4000 a 40% (Item 3.3.31). O material foi deixado por 15 minutos à temperatura ambiente, centrifugado durante 3 minutos a 400 g e ressuspensionado em 1,2 ml de NaCl 0,8 M.

3.29 Análise Estatística

3.29.1 Mann-Withney (ROSCOE, 1975)

Este teste não paramétrico foi utilizado para comparar a produção de cefalosporina C entre a linhagem C-10 e os mutantes resistentes ao selenato.

Os valores obtidos tanto para a população A quanto para a B são colocados em ordem crescente numa única coluna e ao menor deles atribui-se o valor 1. Os valores seguintes recebem os valores 2, 3, 4, etc... Toda vez que um determinado valor tiver ocorrência repetida, eles são dispostos numa mesma linha da coluna.

A seguir, são calculadas as freqüências das populações A e B para cada linha da coluna, as freqüências totais de A e B (f), bem como as freqüências acumuladas (fac).

Com os dados acima, calcula-se o valor de R ($R = fac + 0,5 - f/2$) para cada linha da coluna, atribuindo-se o valor obtido para A ou B, dependendo de qual população ele provem. Dessa forma, são obtidos os R_A e R_B . Nas linhas onde ocorrem repetições, os valores são proporcionalmente divididos entre R_A e R_B .

Depois, são calculados U_A e U_B , da seguinte forma:

$$U_A = n_A \times n_B + \frac{n_A \times n_B}{2} - \sum R_B$$

$$U_B = n_A \times n_B + \frac{n_A \times n_B}{2} - \sum R_A$$

Onde:

n_A = número de indivíduos (ou amostras) da população A

n_B = número de indivíduos (ou amostras) da população B

Quando $n > 20$, os valores de U distribuem-se normalmente com média X e variância Y, que são calculadas da seguinte maneira:

$$X = \frac{n_A \times n_B}{2}$$

$$Y^2 = \frac{n_A \times n_B}{N^2 - N} \times \left(\frac{N^3 - N}{12} - \sum T \right)$$

Onde:

N = número total de indivíduos (ou amostras: $n_A + n_B$)

T = é calculado da seguinte maneira:

$$T = \frac{E^3 - E}{12}, \text{ sendo E é o número de empates para uma determinada linha}$$

Na seqüência, calcula-se o valor $Z = (n_A - X)/Y$ e consulta-se a tabela para os valores de significância.

3.29.2 Kolmogorov-Smirnov (SIEGEL, 1975)

Este teste não paramétrico foi utilizado para comparar os valores obtidos para a produção de cefalosporina C da linhagem C-10 com aqueles observados para os isolados no método de seleção ao acaso e os mutantes morfológicos com crescimento reduzido.

Neste teste, as duas populações a serem comparadas podem ter tamanhos diferentes, desde que tanto n_1 quanto n_2 sejam maiores que 40. A diferença máxima entre as frequências cumulativas das amostras (D) é calculada empregando-se a seguinte fórmula: $D = \text{máxima } |S_{n_1}(X) - S_{n_2}(X)|$.

Se o valor obtido para D for maior ou igual ao calculado na tabela de significância, as amostras devem ser consideradas diferentes.

Os valores de significância para os níveis de 5 e 1% são calculados, respectivamente, pelas expressões (1) e (2).

$$(1) \quad 1,36 (n_1 + n_2/n_1 \cdot n_2)^{1/2}$$

$$(2) \quad 1,63 (n_1 + n_2/n_1 \cdot n_2)^{1/2}$$

3.29.3 Análise de Variância

A análise de variância foi elaborada utilizando-se o modelo de experimentos inteiramente casualizados e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey (PIMENTEL GOMES, 1984).

4: RESULTADOS

4.1 Porcentagens relativas e curva de sobrevivência da linhagem C-10 à luz ultravioleta

Os tratamentos com UV foram conduzidos de acordo com o descrito no item 3.5. Os resultados das porcentagens relativas de UFC sobreviventes são apresentados na tabela 1, e a curva de sobrevivência é mostrada na figura 8.

Como pode ser observado na tabela 1, 30 segundos de exposição à luz UV são suficientes para matar em torno de 65% das UFC e com 150 segundos, a mortalidade é total. A LD₉₅ da C-10 situou-se em torno de 110 segundos.

Tendo em vista que os mutantes induzidos serão isolados a partir de 1 a 5% de sobreviventes à luz UV, o tempo de exposição a ser utilizado nestes casos será de 110 a 120 segundos.

Tabela 1: Porcentagens relativas de sobrevivência das unidades formadoras de colônias (UFC) da linhagem C-10 ao tratamento com luz UV

Tempo (s)	1º Teste	2º Teste	3º Teste	Média	Desvio Padrão
0	100,0	100,0	100,0	100,0	0
30	26,8	26,1	50,3	34,4	13,8
60	10,0	9,0	36,1	18,3	15,3
90	-	5,4	26,9	16,1	15,2
120	1,1	0	1,1	0,7	0,6
150	0	-	0	0	0

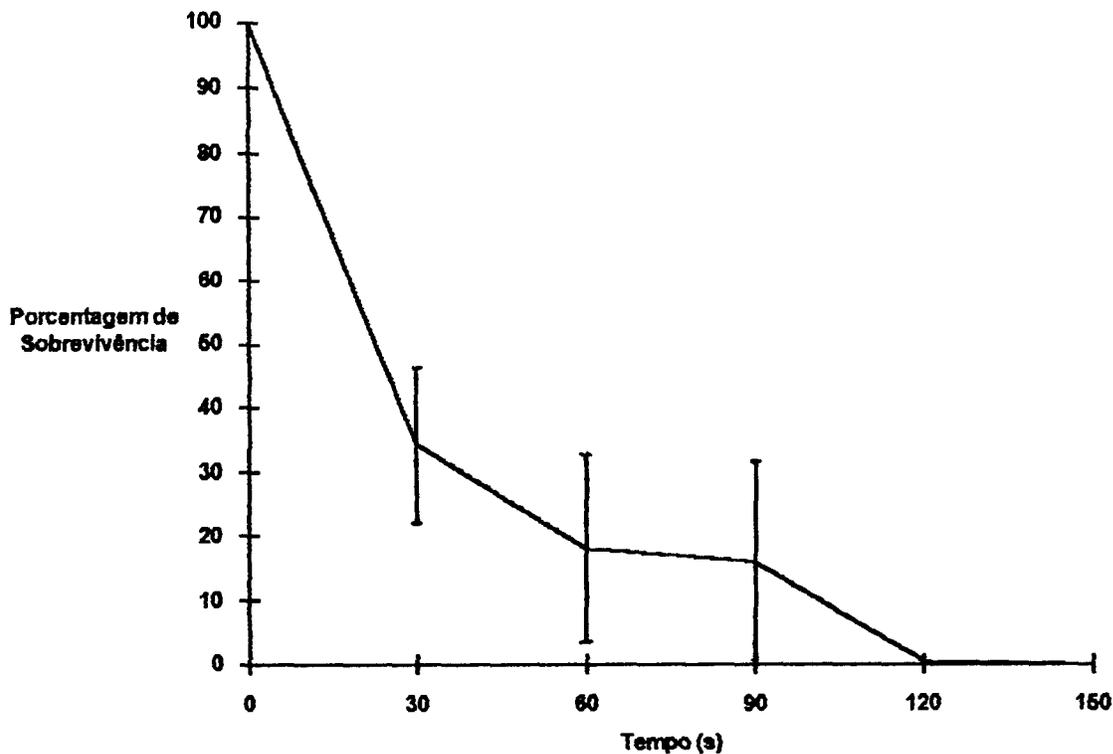


Figura 8: Curva de sobrevivência da linhagem C-10 à luz UV

4.2 Crescimento da linhagem C-10 em vários meios de cultura

Os testes em meio sólido foram elaborados de acordo com a metodologia descrita nos itens 3.6.1.1 e 3.6.1.2, e os resultados encontram-se sumarizados nas tabelas 2 e 3.

Observa-se que o crescimento da linhagem C-10 em MC e MM não diferiu muito, e foi praticamente igual nos meios MMS⁻, MMS⁻ contendo 10 mg/l de D,L-metionina (MMS⁻ M) e MMS⁻ preparado com água Milli-Q (MMS⁻ MQ). Os meios MMS⁻ MQ L e MMS⁻ MQ G, que possuem respectivamente lactose e glicose como fonte de carbono, proporcionaram crescimento menor. Já no meio contendo glicose e sacarose (MMS⁻ MQ SG), o crescimento situou-se numa posição intermediária ao MMS⁻ e MMS⁻ MQ L ou MMS⁻ MQ G.

Quando o crescimento foi medido pelo diâmetro (tabela 3), verificou-se maior discrepância entre MC e MM. Não houve praticamente diferença entre os diâmetros das colônias

crescidas em MM e MMS⁻. Com 21 dias de incubação, os meios MMS⁻ M, MMS⁻ MQ e MMS⁻ MQ SG apresentaram resultados semelhantes, embora isto não tenha ocorrido em 10 dias. Também neste caso, os meios MMS⁻ MQ L e MMS⁻ MQ G proporcionaram os menores crescimentos.

Também não houve diferença de crescimento quando o cultivo foi realizado em MM e MMS⁻ líquidos. A metodologia seguida neste teste está descrita no item 3.6.2.

Quando cultivada em meio líquido com agitação, conforme descrito no item 3.6.3, a linhagem C-10 apresentou crescimento em MMS⁻ mesmo após 3 etapas de inóculo (tabela 4). Neste caso, o desenvolvimento em MM foi maior.

Tabela 2: Número de colônias crescidas da linhagem C-10 nos diferentes meios de cultura

Meio	Média do Nº de Colônias	Porcentagem
MC	204,3	100,0
MM	196,0	95,9
MMS ⁻	173,7	85,0
MMS ⁻ M*	175,7	86,0
MMS ⁻ MQ	176,3	86,3
MMS ⁻ MQ L	95,3	46,7
MMS ⁻ MQ G	52,3	25,6
MMS ⁻ MQ SG	132,0	64,6

* Para simbologia, consultar o item 3.6.1.1

Tabela 3: Médias dos diâmetros (em mm) das colônias da linhagem C-10 após 10 e 21 dias de incubação em diferentes meios

Meios	10 Dias		21 Dias	
	Média	Porcentagem	Média	Porcentagem
MC	8,25	100,0	20,5	100,0
MM	6,50	78,8	13,5	65,8
MMS ⁻	6,75	81,8	13,7	67,1
MMS ⁻ M*	7,75	93,9	12,2	59,7
MMS ⁻ MQ	6,00	72,7	12,2	59,7
MMS ⁻ MQ L	4,00	48,5	10,5	51,2
MMS ⁻ MQ G	4,00	48,5	11,5	51,6
MMS ⁻ MQ SG	3,75	45,4	12,2	59,7

* Para simbologia, consultar o item 3.6.1.1

Tabela 4: Pesos secos e úmidos da linhagem C-10 crescida em meios de cultura líquido sob agitação

Etapa	Meio	Peso Úmido (g)	Peso Seco (g)
1a	MM	0,150	0,033
	MMS ⁻	0,045	0,007
2a	MM	0,245	0,052
	MMS ⁻	0,039	0,004
3a	MM	0,153	0,031
	MMS ⁻	0,024	0,004

4.3 Produção de cefalosporina C da linhagem C-10

4.3.1 Curva de acúmulo em função do tempo

Seguindo metodologia descrita no item 3.7.1, foi traçada a curva de acúmulo de cefalosporina C da linhagem C-10. Os métodos utilizados para a dosagem do antibiótico estão descritos nos itens 3.7.2.1 e 3.7.2.2. A determinação da quantidade de açúcares redutores e açúcares redutores totais foi conduzida de acordo com os itens 3.7.3.1 e 3.7.3.2, respectivamente. O crescimento foi estimado segundo descrição contida no item 3.7.1.2.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 5 e na figura 9, onde pode ser observado que o crescimento foi bem pronunciado nas primeiras 24 horas, tendo aumentado em menor proporção até a 48ª hora. Nesta fase, toda a glicose é praticamente consumida. Depois disso, o microrganismo começa a utilizar a segunda fonte de carbono (sacarose) e a produzir a cefalosporina C.

Como pode ser observado, a concentração do antibiótico aumenta até 144 horas de fermentação, decaindo um pouco a partir deste ponto.

Ainda com relação à cefalosporina C, nota-se que os valores obtidos com a dosagem microbiológica são superiores aos de HPLC.

No final da fermentação, as fontes de carbono estão praticamente esgotadas e o pH, que inicialmente estava em torno de 6,4, altera-se para 7,0.

Tabela 5: Dados referentes à curva de acúmulo da cefalosporina C em função do tempo

Tempo de Fermentação	Cefalosporina C (g/l)		Crescimento (%)	Açúcares redutores (g/l)	Sacarose (g/l)	pH
	Bio-ensaio ⁽¹⁾	HPLC				
0	0	0	4,1 ⁽²⁾	27,3	38,6	6,37
24	0,10	0	18,2	12,2	38,3	6,45
48	0,25	0,11	26,4	6,1	23,4	6,49
72	0,90	0,50	25,0	3,8	15,1	6,55
96	1,60	0,97	23,5	1,6	10,6	6,50
120	2,00	1,35	19,3	2,5	3,9	6,84
144	2,80	2,16	17,9	1,9	1,7	6,91
168	2,50	1,92	16,8	2,6	0,8	7,02

(1) Dosagem microbiológica com *Alcaligenes faecalis*

(2) Como o método utilizada é baseado em centrifugação (item 3.7.1.2), este número refere-se aos sólidos presentes no meio de fermentação, que vão sendo consumidos com o avanço do processo

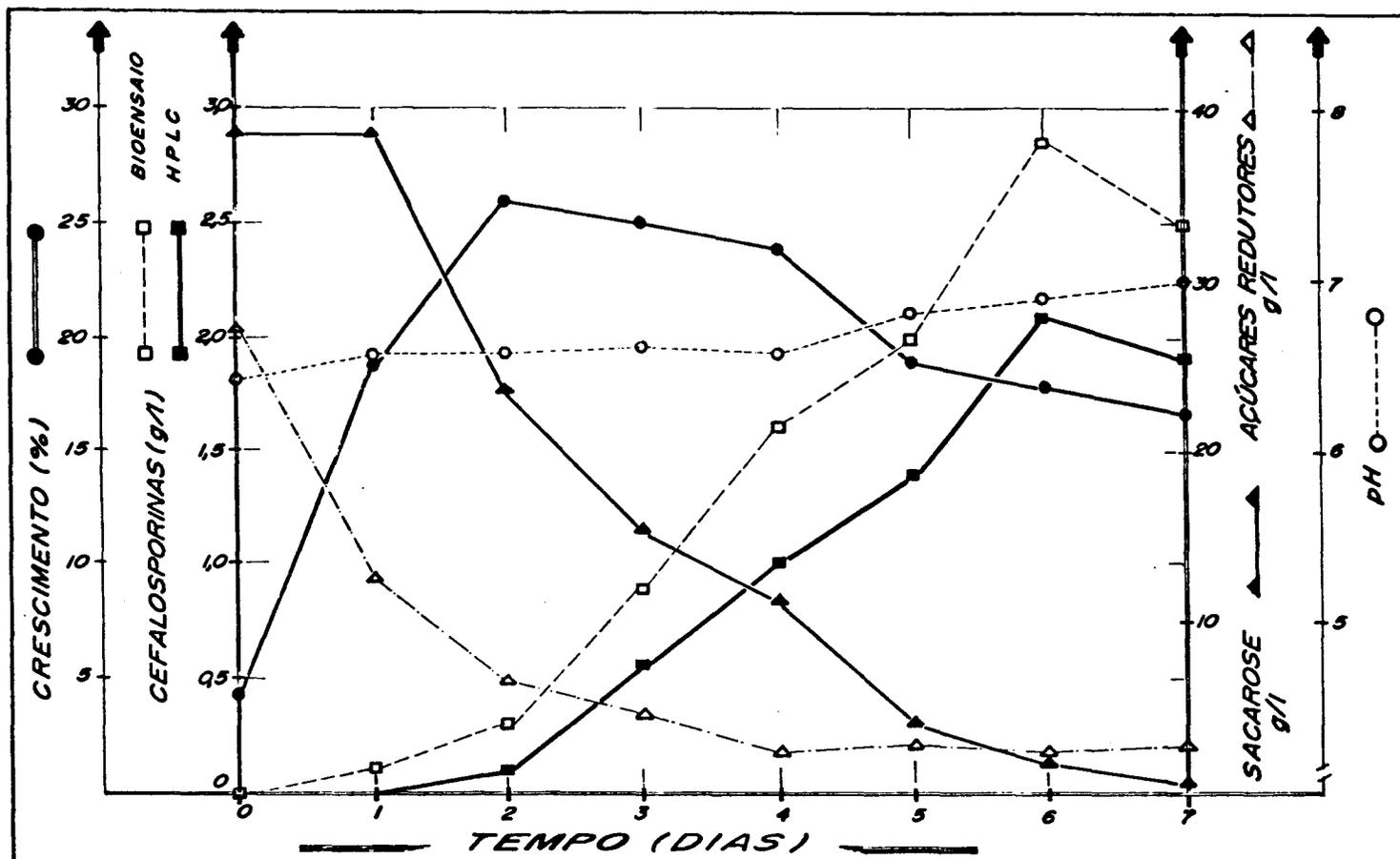


Figura 9: Curva de acúmulo da cefalosporina C em função do tempo

4.4 Curva do Halo de Inibição em Função do Tempo de Incubação

Este teste foi realizado de acordo com o item 3.8 e os resultados obtidos são apresentados na tabela 6, onde observa-se que o melhor crescimento ocorreu entre o 40 e o 60 dia.

Tabela 6: Diâmetro dos halos das colônias (em mm) nos vários intervalos de incubação

Tempo (dias)	Diâm do halo de inibição	Diâmetro da colônia	Colônia Halo
2	0,0	0,5	-
4	7,5	1,2	0,16
6	20,0	3,0	0,15
8	31,0	4,5	0,14
10	35,2	5,7	0,16
12	38,7	6,7	0,17

4.5 Produção em Meio Sólido das Colônias Isoladas ao Acaso

Seguindo metodologia descrita no item 3.9, estes testes foram elaborados e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 7 e na figura 10, onde pode ser observada a grande variação na produção de cefalosporina C mostrada pelos isolados após 5 dias de incubação em meio sólido. A classificação dos indivíduos que apresentam maiores produções ("+", vide item 3.9) foi feita somando-se ao valor da média (0,1396) o desvio padrão multiplicado por 1,96, o que resultou no valor 0,24. Assim sendo, os isolados com produção de cefalosporina C superior a este número foram considerados "+" e utilizados para testes fermentativos em "shaker". No total foram 54 indivíduos: 46 e 8, que produziram, respectivamente, entre 0,24 e 0,26 g/l e entre 0,26 e 0,28 g/l.

Tabela 7: Níveis de produção apresentados pelos isolados selecionados ao acaso após 5 dias de incubação

[Cefalosporina C]* (g/l)	Numero de isolados	[Cefalosporina C] (g/l)	Numero de isolados
0,00 - 0,02	9	0,14 - 0,16	271
0,02 - 0,04	37	0,16 - 0,18	286
0,04 - 0,06	116	0,18 - 0,20	180
0,06 - 0,08	143	0,20 - 0,22	124
0,08 - 0,10	171	0,22 - 0,24	87
0,10 - 0,12	212	0,24 - 0,26	46
0,12 - 0,14	298	0,26 - 0,28	8
Média = 0,1396		Desvio Padrão = 0,0532	

* concentrações obtidas pela equivalência entre os diâmetros dos halos das colônias e os diâmetros verificados na curva padrão feita com cefalosporina C.

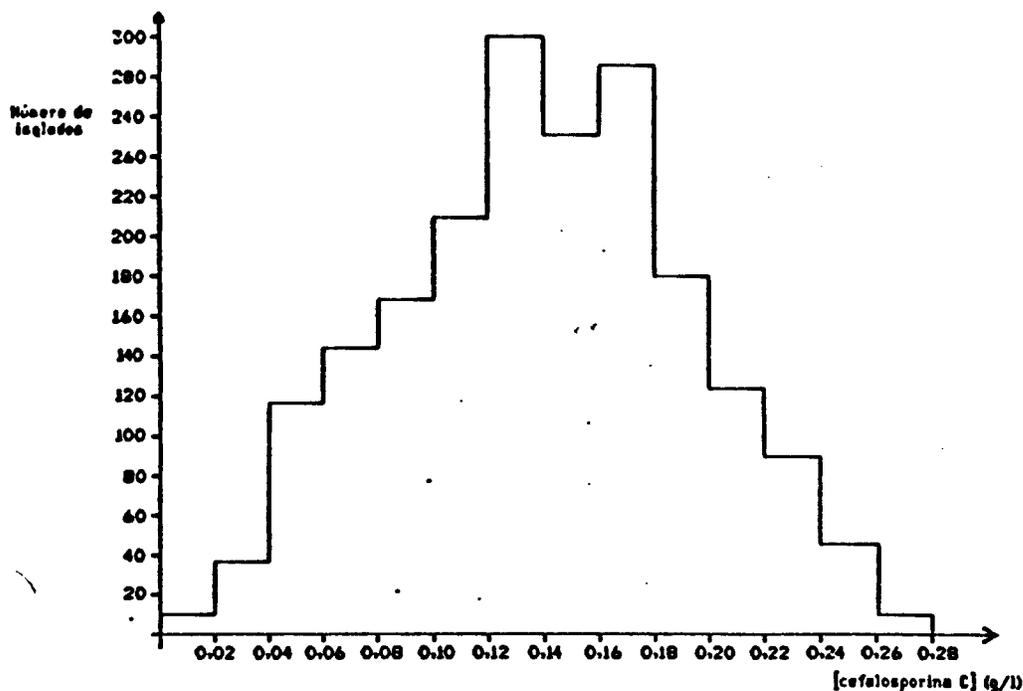


Figura 10: Níveis de produção dos isolados ao acaso

4.6 Isolamento de Colônias com Crescimento Reduzido

Seguindo metodologia descrita no item 3.10, foram isoladas 98 colônias com crescimento compacto. A frequência obtida foi $2,17 \times 10^{-3}$.

A contagem em placas sem indução com ultravioleta também revelou frequência de $3,05 \times 10^{-4}$.

4.7 Testes Fermentativos com agitação dos Isolados "+" e Comparação com a linhagem C-10

Os 54 isolados "+" foram ensaiados com agitação conforme metodologia descrita no item 3.11 e os resultados obtidos são mostrados na tabela 8 e na figura 11.

A análise estatística dos resultados foi efetuada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (Item 3.29.2) revelando que as duas populações não devem ser consideradas diferentes. A diferença máxima foi de 0,074 e o valor de significância ao nível de 1%, 0,335.

Mesmo assim, os 54 isolados passaram por nova classificação. Foram considerados como "+" os indivíduos A-79, A-818 e A-1191, que produziram respectivamente 2,0, 2,06 e 2,14 g/l.

Tabela 8: Produção de cefalosporina C (g/l) da linhagem C-10 e dos isolados ao acaso

Produção da linhagem C-10 em várias repetições			Produção dos isolados ao acaso		
0,55	1,29	1,66	0,62	1,25	1,54
0,63	1,33	1,69	0,77	1,25	1,55
0,72	1,33	1,71	0,81	1,26	1,55
0,84	1,35	1,80	0,85	1,28	1,56
0,91	1,36	1,82	0,89	1,29	1,57
0,97	1,36	1,94	0,93	1,29	1,62
1,05	1,38		0,96	1,32	1,65
1,08	1,40		1,04	1,32	1,66
1,10	1,44		1,06	1,33	1,67
1,16	1,45		1,08	1,35	1,73
1,16	1,45		1,08	1,37	1,78
1,19	1,49		1,10	1,38	1,79
1,19	1,51		1,12	1,41	1,87
1,21	1,51		1,13	1,44	1,87
1,22	1,53		1,17	1,45	1,91
1,24	1,57		1,17	1,48	2,00
1,26	1,58		1,21	1,50	2,06
1,27	1,64		1,24	1,52	2,14
Média = 1,3176			Média = 1,3748		
Desvio Padrão = 0,3107			Desvio Padrão = 0,3402		

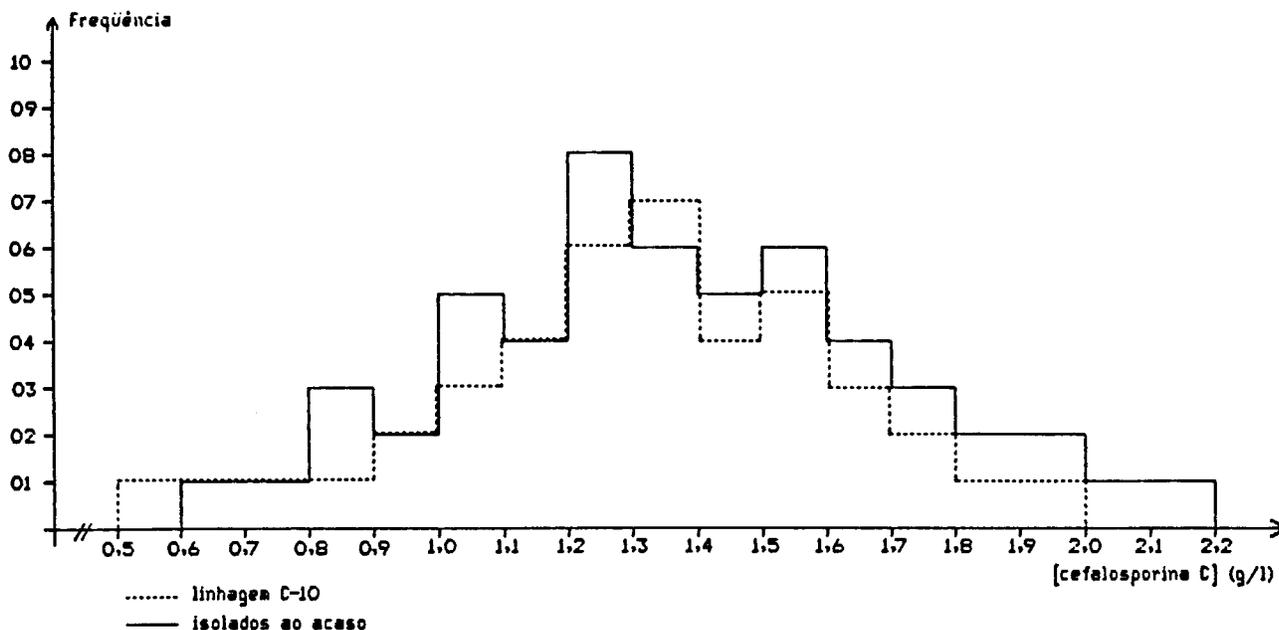


Figura 11: Níveis de produção da linhagem C-10 e dos isolados ao acaso "+"

4.8 Testes Fermentativos com agitação dos Mutantes Morfológicos e Comparação com a Linhagem C-10

Os 98 mutantes com crescimento radial reduzido foram ensaiados com agitação de acordo com o descrito no item 3.7.1.2 e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 9 e na figura 12.

Os níveis de produção destes mutantes foram comparados com os da C-10 (tabela 8). A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov (Item 3.29.2), através do qual ficou demonstrado não haver diferença significativa entre as duas populações. A diferença máxima foi de 0,160 e o nível de significância a 1%, 0,300.

Também neste caso, os mutantes passaram por classificação. Foram considerados como "+" os indivíduos M-5, M-76 e M-90, que produziram respectivamente 2,44, 2,45 e 2,53 g/l.

Tabela 9: Produção de cefalosporina C (g/l) dos mutantes com crescimento radial reduzido

Produção de cefalosporina C dos mutantes morfológicos						
0,25	0,91	1,16	1,33	1,49	1,67	1,88
0,34	0,94	1,17	1,35	1,50	1,68	1,93
0,43	0,96	1,17	1,36	1,51	1,69	1,97
0,51	0,97	1,23	1,36	1,52	1,69	2,00
0,53	0,97	1,24	1,38	1,53	1,75	2,01
0,64	1,02	1,25	1,40	1,53	1,75	2,01
0,69	1,05	1,25	1,40	1,55	1,76	2,06
0,70	1,08	1,26	1,44	1,57	1,78	2,17
0,72	1,08	1,28	1,44	1,58	1,79	2,22
0,76	1,10	1,28	1,45	1,59	1,80	2,30
0,85	1,12	1,29	1,46	1,62	1,84	2,33
0,85	1,13	1,31	1,46	1,63	1,86	2,44
0,88	1,14	1,32	1,47	1,64	1,87	2,45
0,91	1,14	1,33	1,49	1,66	1,87	2,53
Média = 1,4083			Desvio Padrão = 0,4755			

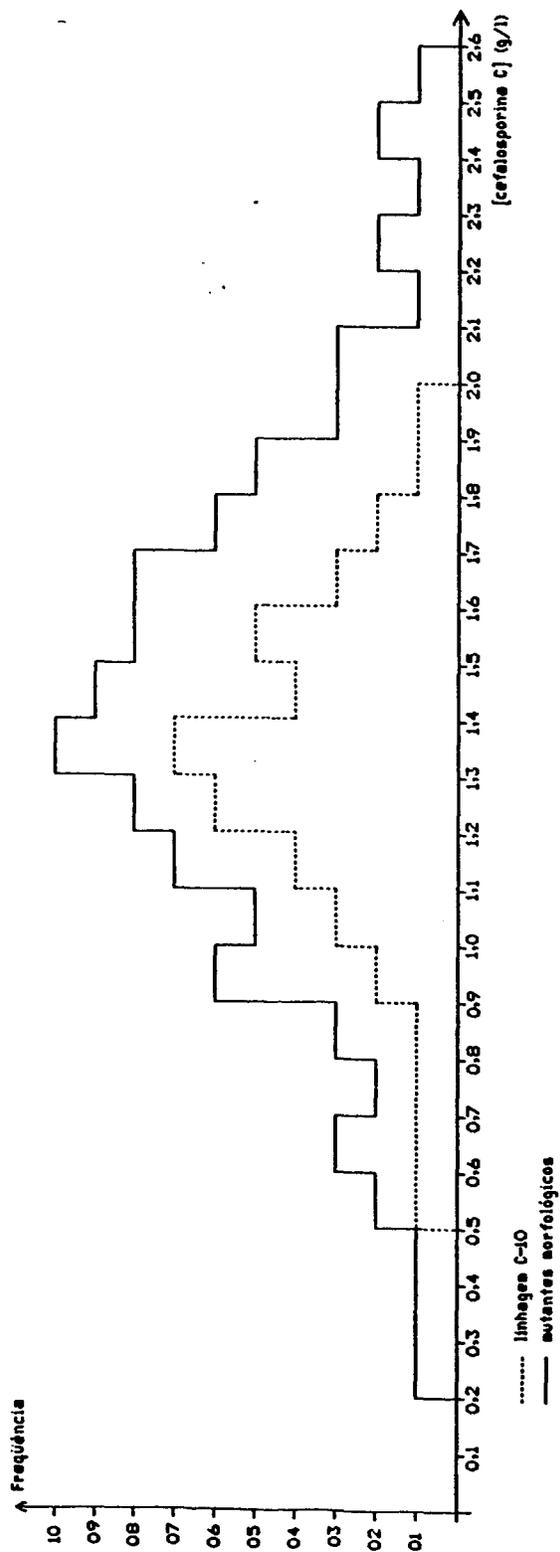


Figura 12: Níveis de produção da linhagem C-10 e dos mutantes morfológicos

4.9 Comparação de Produção entre a Linhagem C-10 e seus Derivativos A-79, A-818, A-1191, M-5, M-76 e M-90

Este estudo foi conduzido conforme metodologia descrita no item 3.12. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 10. A análise estatística foi realizada de acordo com o item 3.29.3 e encontra-se sumarizada na tabela 11. A comparação das médias, com diferença mínima significativa de 0,68, é mostrada na tabela 12.

Como pode ser observado, apenas o derivativo M-76 teve produção significativamente superior à linhagem C-10. Assim, dos 98 mutantes morfológicos isolados, apenas 1 produziu mais cefalosporina C.

Tabela 10: Produção de cefalosporina C (g/l) da linhagem C-10 e alguns de seus mutantes e derivativos

C-10	A-79	A-818	A-1191	M-5	M-76	M-90
0,82	1,27	1,08	0,82	1,17	1,23	1,26
0,90	1,41	1,13	1,00	1,61	1,89	1,55
1,15	1,46	1,13	1,25	1,91	2,04	1,55
1,33	1,64	1,32	1,39	2,15	2,45	1,87
1,49	1,85	1,47	1,58	2,20	2,53	2,01
1,68	1,87	1,82	1,66	2,41	2,72	2,30

Tabela 11: Análise de variância dos dados da tabela 10

Fonte de Variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F
Linhagens	6	4,374	0,729	5,08*
Resíduo	35	5,022	0,143	

C.V. = 29,8%

* significativo ao nível de 1%

Tabela 12: Comparação das médias pelo teste de Tukey

Linhagens	Médias
C-10	1,23 a*
A-1191	1,28 a
M-5	1,36 a
A-79	1,58 a b
M-90	1,76 a b
A-818	1,91 a b
M-76	2,14 b

* linhagens com a mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5%

4.10 Porcentagens relativas, curva de sobrevivência e frequência de prováveis mutantes da linhagem C-10 ao tratamento com selenato

As porcentagens relativas de sobrevivência da linhagem C-10 ao selenato foram obtidas em MMS⁻ contendo 10 mg/l de D,L-metionina, conforme metodologia descrita no item 3.13.1, e os resultados encontram-se sumarizados na tabela 13. Com estes dados, foi traçada uma curva de sobrevivência (figura 04).

A tabela 14 contém os resultados de crescimento em placas com cerca de 10⁶ UFC bem como as frequências de prováveis mutantes crescidos nas várias concentrações da droga, enquanto que na tabela 15 podem ser observados os mesmos tipos de dados obtidos, porém, em MMS⁻.

Pelos dados expostos na tabela 13, pode ser verificado que, em MMS⁻ contendo 10 mg/l de D,L-metionina, ocorre grande redução no número de colônias (cerca de 80%) na concentração de 0,8 mM de selenato. Porém, para elevar esta redução até 99%, é necessário 50 mM da droga. Com relação às placas de 10⁶ UFC (tabela 14), a inibição total do crescimento só ocorreu em 12,8 mM de selenato.

Quando utilizou-se MMS⁻, 0,05 mM de selenato já foi suficiente para causar inibição total tanto nas placas contendo 10⁶ UFC (tabela 15) quanto nas placas contendo colônias isoladas.

Consultando-se a tabela 14, observa-se que as frequências de prováveis mutantes variaram de $10,52 \times 10^{-6}$ até $18,02 \times 10^{-6}$ nas placas contendo concentrações intermediárias de selenato (0,8 a 51,2 mM), tendo sido bem menores tanto em 0,4 mM ($3,38 \times 10^{-6}$) quanto em 102,4 mM ($2,42 \times 10^{-6}$). Quando a estimativa foi feita em meio sem D,L-metionina (tabela 15) as frequências variaram entre $0,71 \times 10^{-6}$ e $5,00 \times 10^{-6}$.

Seguindo a metodologia descrita no item 3.15 foi montado um experimento objetivando o isolamento de mutantes resistentes espontâneos ao selenato. A frequência, neste caso, foi de $9,84 \times 10^{-6}$. Colônias de crescimento vigoroso foram isoladas em diferentes concentrações de selenato, tanto a partir de MMS⁻ quanto a partir de MMS⁻ contendo 10 mg/l de D,L-metionina (tabela 16).

Os prováveis mutantes apresentados na tabela 16 foram ensaiados preliminarmente para confirmação da resistência, conforme metodologia descrita no item 3.16, onde pode ser constatado que todos eles cresceram em 3,2 mM de selenato, o que não ocorreu com a linhagem C-10.

Tabela 13: Porcentagens relativas de sobrevivência das unidades formadoras de colônias (UFC) da linhagem C-10 ao tratamento com selenato

[Selenato] (mM)	1 ^o Teste	2 ^o Teste	Média	Desvio Padrão
0	100,0	100,0	100,0	0
0,4	44,6	47,1	45,8	1,7
0,8	17,0	21,3	19,1	3,0
1,6	14,9	14,4	14,6	0,3
3,2	13,6	12,1	12,8	1,0
6,4	2,0	8,2	5,1	4,4
12,8	0,9	6,9	3,9	4,2
25,6	0	5,1	2,5	3,6
51,2	0	1,7	0,8	1,2
102,4	0	0	0	0

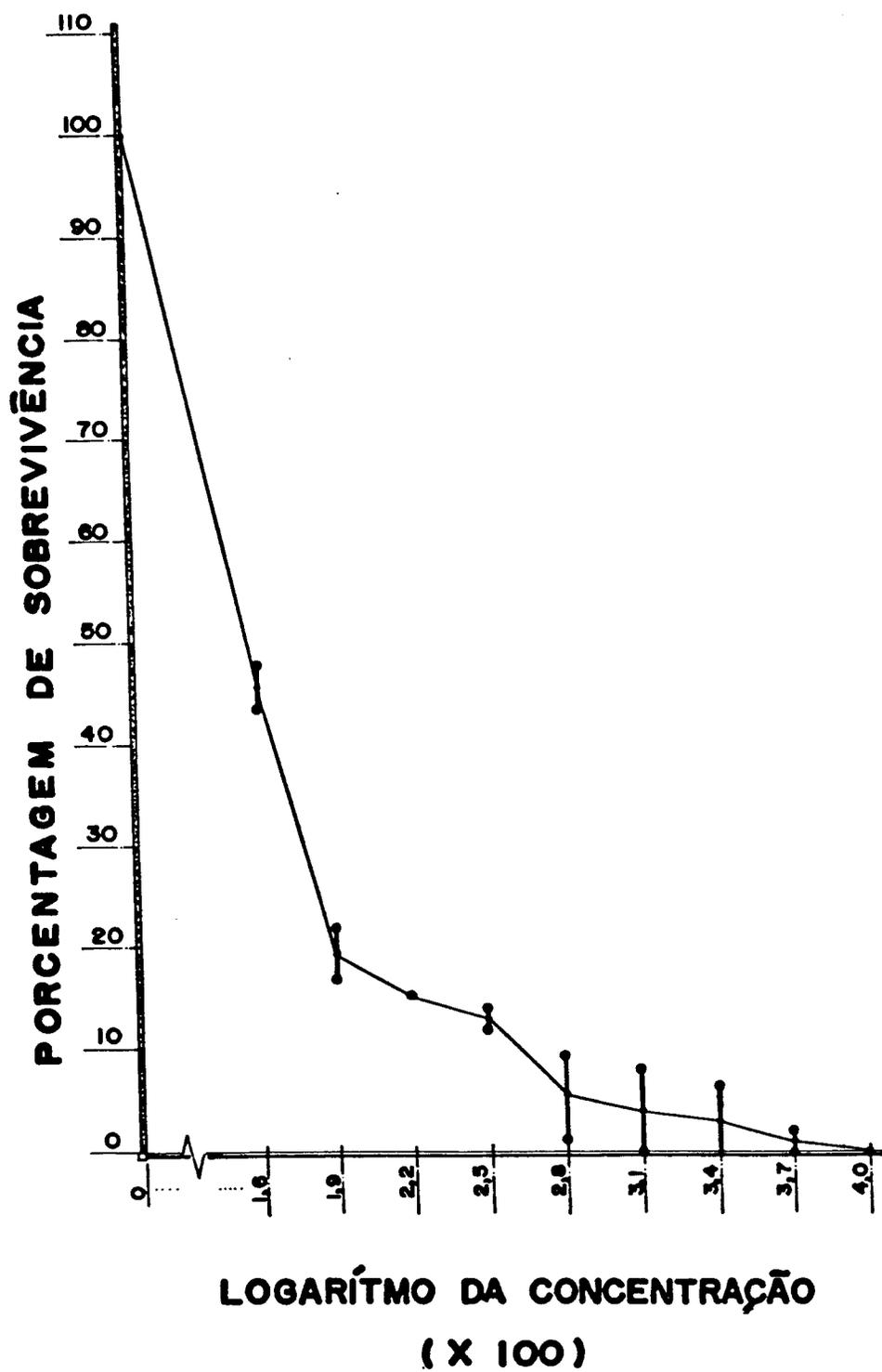


Figura 13: Curva de sobrevivência da linhagem C-10 ao tratamento com selenato

Tabela 14: Crescimento e frequência de prováveis mutantes da linhagem C-10 em MMS⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina contendo várias concentrações de selenato

[Selenato] (mM)	Crescimento	Nº de UFC por Placa ($\times 10^6$)	Nº de Colônias por Placa	Frequência de Prováveis Mutantes ($\times 10^6$)
0	++++	1,33	NC	
0,4	+++-	1,33	4,6	3,38
0,8	++-	1,33	17,5	13,16
1,6	+--	1,33	17,0	12,78
3,2	+---	1,33	15,5	11,65
6,4	+---	1,33	24,0	18,04
12,8	----	1,33	18,0	13,53
25,6	----	1,33	16,5	12,40
51,6	----	1,33	14,0	10,52
102,4	----	1,24	3,0	2,42

+ = presença de crescimento

- = crescimento apenas das colônias resistentes

NC = não contado

Tabela 15: Crescimento e frequência de prováveis mutantes da linhagem C-10 em MMS⁻ contendo várias concentrações de selenato e $1,4 \times 10^6$ UFC/placa

[Selenato] (mM)	Crescimento	Nº de Colônias por Placa	Frequência de Prováveis Mutantes ($\times 10^6$)
0	+	NC	
0,05	-	NC	
0,10	-	7	5,00
0,15	-	5	3,57
0,20	-	5	3,57
0,30	-	1	0,71
0,40	-	3	2,14
0,80	-	3	2,14

+ = presença de crescimento

- = crescimento apenas das colônias resistentes

NC = não contado

Tabela 16: Condições de isolamento dos prováveis mutantes espontâneos resistentes ao selenato

Mutante Nº	Meio do qual foi isolado	Concentração de selenato no meio (mM)
SeR1*	MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina	1,6
SeR2	MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina	3,2
SeR3	MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina	3,2
SeR4	MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina	6,4
SeR5	MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina	12,8
SeR6	MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina	12,8
SeR7	MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina	51,2
SeR8	MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina	51,2
SeR9	MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina	6,4
SeR10	MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina	3,2
SeR11	MMS ⁻	12,8
SeR12	MMS ⁻	1,6
SeR13	MMS ⁻	3,2
SeR14	MMS ⁻	3,2
SeR15	MMS ⁻	6,4
SeR16	MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina	3,2
SeR17	MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina	6,4
SeR18 a SeR32	MMS ⁻ + 10 mg/l de D,L-metionina	6,4

* Os prováveis mutantes SeR1 a SeR30 foram isolados a partir de placas inoculadas com 10⁶ UFC. Os prováveis mutantes SeR31 e SeR32 foram isolados de placas estriadas

4.11 Porcentagens relativas, curva de sobrevivência e frequência de prováveis mutantes da linhagem C-10 ao tratamento com cromato

Os números, porcentagens relativas e curva de sobrevivência ao cromato da linhagem C-10 em MMS⁻ contendo 10 mg/l de D,L-metionina, foram obtidos conforme metodologia descrita no item 3.14.1 e os resultados são apresentados na tabela 17 e figura 14.

A inibição total do crescimento ocorre no intervalo de 0,020 a 0,040 mM tanto nas placas com inóculo para contagem (tabela 17) quanto nas placas contendo 10⁶ UFC (tabela 18). Na tabela 18, pode ser observado que a frequência de prováveis mutantes variou de 4 a 16 x 10⁻⁶.

Um ensaio realizado utilizando-se as mesmas concentrações de cromato e elevando-se a quantidade de D,L-metionina para 100 mg/l (item 3.14.2), revelou a ausência total de crescimento nas placas de contagem, inclusive do controle, e crescimento reduzido nas placas com 10^6 UFC (dados não mostrados). Outro ensaio onde foram utilizados 500 mg/l de D,L-metionina e concentrações maiores de cromato (item 3.14.2) mostrou resultados semelhantes, tendo ocorrido crescimento apenas na placa controle contendo 10^6 UFC.

Tabela 17: Porcentagens relativas de sobrevivência das unidades formadoras de colônias (UFC) da linhagem C-10 em MMS^- + 10 mg/l de D,L-metionina contendo várias concentrações de cromato

{Cromato} (mM)	Porcentagem de sobrevivência
0	100,0
0,0025	73,0
0,005	50,0
0,010	33,0
0,020	6,7
0,040	0
0,080	0

Tabela 18: Crescimento e freqüência de prováveis resistentes da linhagem C-10 em MMS^- + 10 mg/l de D,L-metionina contendo várias concentrações de cromato e 10^6 UFC/placa

{Cromato} (mM)	Crescimento	Nº de Colônias por Placa	Freqüência de Prováveis Mutantes ($\times 10^6$)
0	++++	NC	
0,0025	++--	16	16
0,005	+---	4	4
0,010	+---	8	8
0,020	+---	0	0
0,040	----	0	0
0,080	----	0	0

NC = não contado

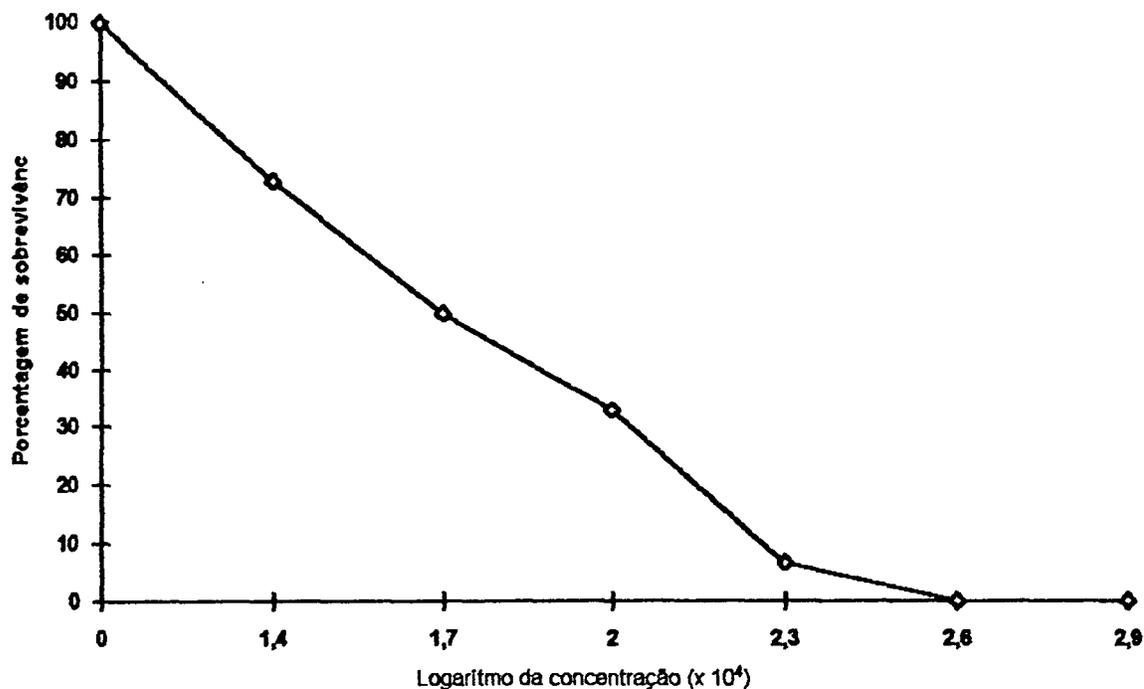


Figura 14: Curva de sobrevivência da linhagem C-10 ao tratamento com cromato

4.12 Caracterização dos mutantes resistentes ao selenato

A caracterização dos prováveis mutantes foi feita em MMS- contendo 2 mg/l de D,L-metionina, conforme metodologia descrita no item 3.17.

Os 32 mutantes testados cresceram em todas as concentrações de selenato utilizadas. O índice de inibição na mais elevada delas (1,6 mM) variou de 6 a 50%, sendo que para a maioria das linhagens ele situou-se entre 20 e 30%.

A linhagem C-10 apresentou 100% de inibição em 0,1 mM de selenato.

4.13 Caracterização dos mutantes resistentes ao selenato quanto a serem cromato sensíveis ou cromato resistentes

Estes testes foram feitos conforme o descrito no item 3.18.

Dos 32 mutantes resistentes ao selenato ensaiados, apenas 3 mostraram-se sensíveis ao cromato, ou seja, apresentam lesão no gene *sC* que codifica a ATP sulfurilase (enzima 2, figura 5). Os demais mutantes são resistentes às duas drogas, apresentando, portanto, lesão no gene *sB* que codifica a sulfato permease (enzima 1, figura 5) ou em ambos os genes.

Os mutantes resistentes tanto ao selenato quanto ao cromato apresentaram índices de inibição que variaram de 5 a 30% na presença de 0,16 mM de cromato.

4.14 Crescimento da Linhagem C-10 e dos Mutantes *sC-1*, *sC-2* e *sB-* em MMS⁻ líquido sob agitação

Este teste foi executado conforme o descrito no item 3.6.3 e os resultados obtidos estão expostos na tabela 19. Não houve praticamente diferença de crescimento entre os mutantes e a C-10 nos dois meios ensaiados. O desenvolvimento em MMS⁻ foi menor e sofreu grande redução, principalmente da 1ª para a 2ª etapa. Apesar disso, mesmo na 4ª etapa, houve crescimento em MMS⁻ de todas as linhagens testadas.

Tabela 19: Peso seco (em mg) das linhagens crescidas em meio líquido sob agitação

Etapa	Linhagem*							
	<i>sC-1</i>		<i>sC-2</i>		<i>sB</i> **		C-10	
	MM	MMS ⁻	MM	MMS ⁻	MM	MMS ⁻	MM	MMS ⁻
1ª	118	99	102	98	113	100	67	113
2ª	153	11	88	9	46	12	135	12
3ª	145	9	115	14	127	15	140	17
4ª	165	7	126	6	125	2	141	7

* *sC-1* = SeR8; *sC-2* = SeR21 e *sB* = SeR1 (vide tabela 16)

** este mutante pode ser tanto *sB*⁻ quanto *sB*⁻*sC*⁻ (vide item 2.5).

4.15 Comparação de produção entre a C-10 e os mutantes resistentes ao selenato

O teste foi conduzido de acordo com a metodologia descrita no item 3.7. Os resultados obtidos estão expostos na tabela 20 e na figura 15.

Como a distribuição das produções da linhagem C-10 e dos mutantes foram diferentes e não normais (figura 15), optou-se por utilizar o teste não paramétrico de Mann-Whitney (item 3.29.1) para elaborar a análise estatística dos dados obtidos. Procedendo-se desta forma, foram encontrados os seguintes resultados: $U_A = 353,5$; $U_B = 430,5$; $X = 392$; $Y = 61,00$ e $Z = 0,6311$. Comparando-se o último resultado com os valores da tabela, pode-se concluir que não há diferença significativa entre os dois grupos analisados, ou seja, que os valores comportam-se como se tivessem sido amostrados a partir da mesma população.

Tabela 20: Produção de cefalosporina C (g/l) apresentada pela linhagem C-10 e mutantes resistentes ao selenato, utilizando o método de dosagem por HPLC (item 3.7.2.2)

Produção da linhagem C-10 em várias repetições		Produção dos mutantes resistentes ao selenato(*)	
0,40	0,67	0,73	0,76
0,60	0,32	0,50	0,81
0,30	0,89	1,15	0,63
0,50	0,92	0,65	0,46
1,20	0,88	1,14	0,63
1,00	1,00	0,80	1,13
0,93	0,63	0,99	1,02
0,96	1,10	0,81	0,85
0,77	1,20	0,80	0,73
0,72	0,97	1,29	0,82
0,80	1,00	0,94	0,99
0,72	0,90	1,27	1,04
0,75	1,10	0,73	0,70
0,34	0,74	0,77	0,80

(*) cada valor é a média de duas repetições

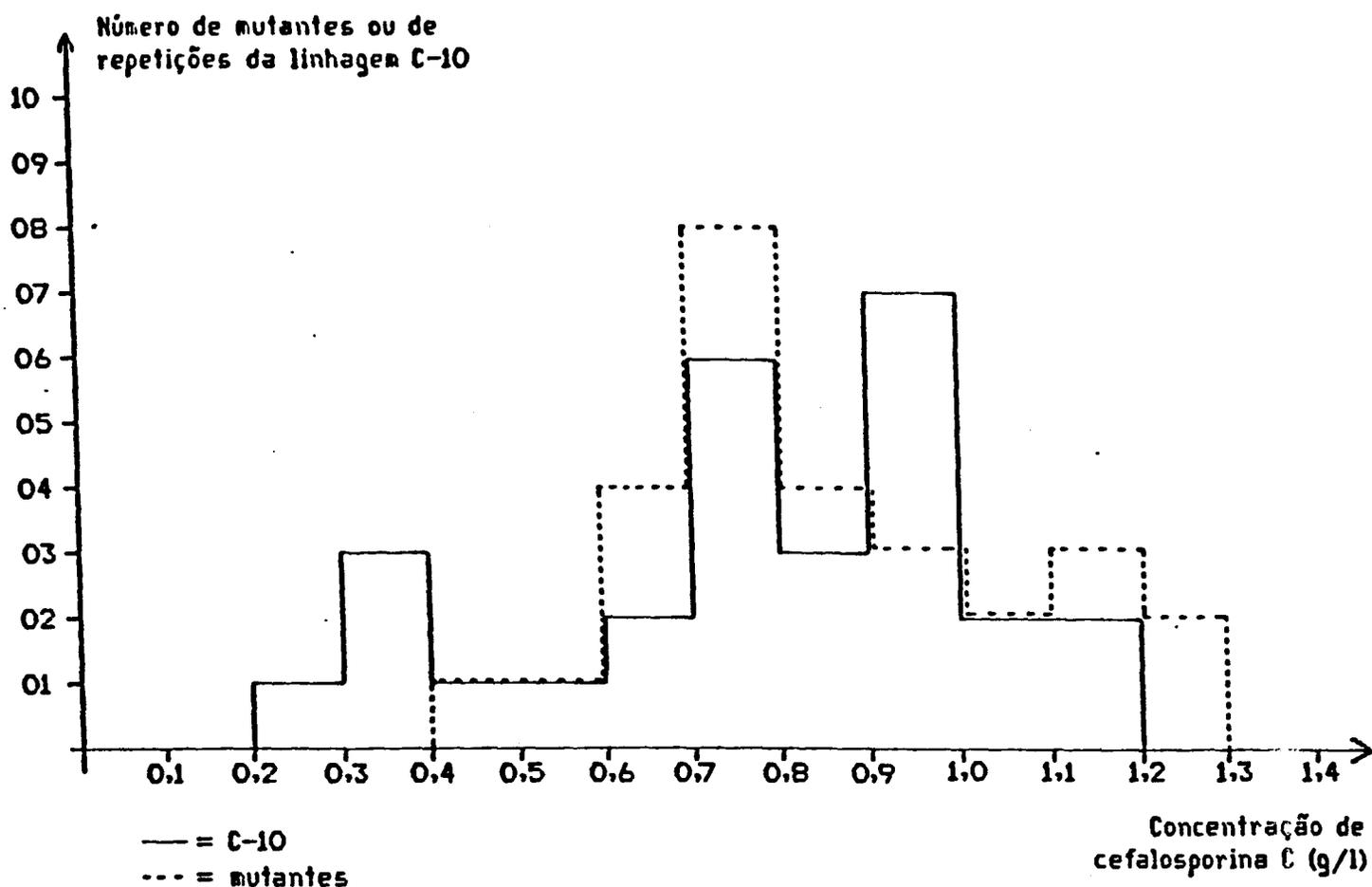


Figura 15: Distribuição dos valores apresentados na tabela 20

4.16 Porcentagens relativas, curva de sobrevivência e freqüência de prováveis mutantes da linhagem C-10 ao tratamento com benomil

As porcentagens relativas de sobrevivência da linhagem C-10 ao benomil foram obtidos seguindo a metodologia descrita no item 3.19. Os resultados são apresentados na tabela 21 e a curva de sobrevivência, na figura 16.

Pode ser constatado que a inibição total do crescimento ocorre entre 1,00 e 1,25 $\mu\text{g/ml}$, fato que também foi verificado no caso das placas contendo 10^6 UFC (tabela 22).

O processo de obtenção e isolamento de prováveis mutantes espontâneos e induzidos foi conduzido utilizando-se as metodologias descritas nos itens 3.20.1 e 3.20.2, respectivamente. A frequência de prováveis mutantes induzidos pode ser calculada em $12,92 \times 10^{-6}$, e foi cerca de 26 vezes superior à dos espontâneos, estimada em $0,49 \times 10^{-6}$. Foram isolados 13 prováveis mutantes induzidos e 4 espontâneos, todos a partir de placas contendo $1,25 \mu\text{g/ml}$ de benomil.

Tabela 21: Porcentagens relativas de sobrevivência das unidades formadoras de colônias (UFC) da linhagem C-10 ao tratamento com benomil.

[Benomil] ($\mu\text{g/ml}$)	1 ^a Teste	2 ^a Teste	3 ^a Teste	4 ^a Teste	Média	Desvio Padrão
0	100,00	100,0	100,0	100,0	100,0	0
0,25	79,0	98,4	89,5	-	89,0	9,7
0,50	76,3	78,1	90,2	-	81,5	7,5
0,75	60,0	70,0	52,8	-	60,9	8,6
1,00	0	0	-	88,9	29,6	51,3
1,25	0	0	0	0	0	0

- = não ensaiado

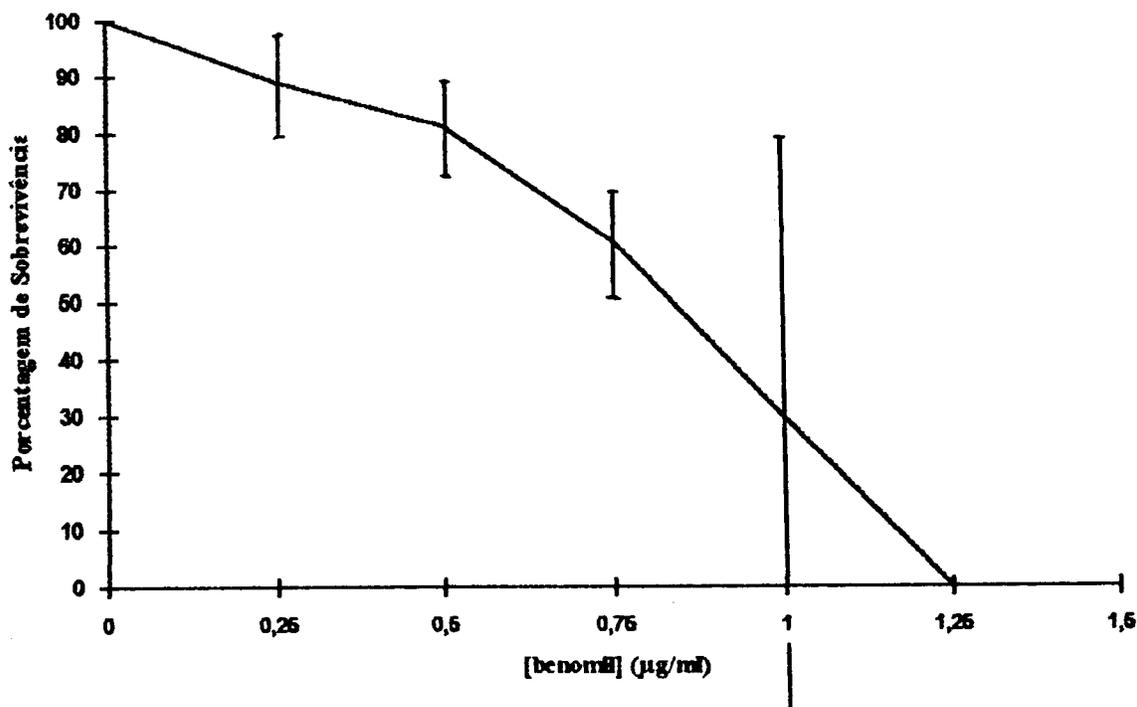


Figura 16: Curva de sobrevivência de linhagem C-10 ao tratamento com benomil

Tabela 22: Crescimento da linhagem C-10 em MC contendo várias concentrações de benomil

[Benomil] ($\mu\text{g/ml}$)	Crescimento*		
0	+	+	+
0,25	+	+	-
0,50	+	+	-
0,75	+	-	-
1,00	+	-	-
1,25	-	-	-

* Foram utilizadas placas contendo cerca de 10^6 UFC

+ = presença de crescimento

- = ausência de crescimento

4.17 Caracterização dos prováveis mutantes resistentes ao benomil

A caracterização dos prováveis mutantes foi conduzida conforme descrição apresentada no item 3.21.

Das 11 linhagens ensaiadas, 7 apresentaram altos níveis de resistência. Nesses casos, a inibição variou de 20 a 60% na concentração de $6,0 \mu\text{g/ml}$ de benomil. Os outros 4 mutantes tiveram seu crescimento totalmente inibido com $4,0 \mu\text{g/ml}$ da droga, indicando um nível de resistência intermediário tendo em vista que a linhagem C-10 apresentou 100% de inibição com $1,0 \mu\text{g/ml}$.

4.18 Resistência ao benomil em MC contendo 10,3% de sacarose

Utilizando os procedimentos descritos no item 3.22, foi feita uma comparação de crescimento entre a linhagem C-10, seus protoplastos e um de seus mutantes resistentes, em MC + 10,3% de sacarose contendo várias concentrações de benomil.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 23, onde pode ser observado que os protoplastos foram um pouco mais sensíveis ao benomil que as formas celulares normais (C-10), apesar de terem seu crescimento totalmente inibido com $1,5 \mu\text{g/ml}$ da droga. Conforme o esperado, o mutante cresceu em concentrações bem mais elevadas de benomil.

Tabela 23: Crescimento comparativo em MC + sacarose contendo várias concentrações de benomil

[Benomil] (µg/ml)	Ben R1	C-10	Protoplastos
0	+ + + +	+ + + +	+ + + +
0,5	+ + + +	+ + + -	+ + + -
1,0	+ + + -	+ + - -	+ - - -
1,25	+ + + -	+ - - -	- - - - *
1,50	+ + + -	- - - -	- - - -
1,75	+ + + -	- - - -	- - - -
2,0	+ + + -	- - - -	- - - -
3,0	+ + - -	- - - -	- - - -
4,0	+ + - -	- - - -	- - - -
5,0	+ - - -	- - - -	- - - -
6,0	- - - -	- - - -	- - - -
7,0	- - - -	- - - -	- - - -
8,0	- - - -	- - - -	- - - -

* - *crescimento de poucas colônias com diâmetro inferior a 1 mm*

+ = *presença de crescimento*

- = *ausência de crescimento*

4.19 Resistência à Higromicina B em MC contendo 10,3% de Sacarose

Utilizando a metodologia descrita no item 3.23, foi feita uma comparação de crescimento entre micélio e protoplastos da linhagem C-10, em várias concentrações de higromicina B.

Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 24. Os protoplastos tiveram seu crescimento totalmente inibido com 20 µg/ml da droga, tendo sido um pouco mais sensíveis que o micélio, cuja concentração de inibição foi 24 µg/ml

Tabela 24: Crescimento comparativo de micélio e protoplastos da linhagem C-10 em MC + 10,3% de sacarose

[Higromicina B] (µg/ml)	Protoplasto				Micélio			
0	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	-	+	+	+	+
8	+	+	-	-	+	+	+	-
12	+	-	-	-	*	+	+	-
16	-	-	-	-	**	+	-	-
20	-	-	-	-		-	-	-
24	-	-	-	-		-	-	-

* *Desenvolvimento de algumas colônias com diâmetro de aproximadamente 1 mm e crescimento residual ralo*

** *Apenas crescimento residual ralo*

+ = *presença de crescimento*

- = *ausência de crescimento*

4.20 Isolamento de Mutantes Resistentes à Higromicina B

Os prováveis mutantes espontâneos foram isolados de acordo com os procedimentos descritos no item 3.24.1. A frequência de mutantes foi de $0,026 \times 10^{-6}$.

Foram isolados 8 prováveis mutantes a partir de 16 placas contendo um total de $1,91 \times 10^7$ UFC cada e estocados a 4°C para serem caracterizados posteriormente quanto aos níveis de resistência.

Seguindo metodologia descrita no item 3.24.2, os mutantes induzidos tiveram sua frequência estimada em 3×10^{-6} . Neste caso, foram isolados 6 mutantes para testes futuros.

4.21 Caracterização dos Mutantes Resistentes à Higromicina B

Este teste foi realizado conforme descrição contida no item 3.25 e os resultados estão dispostos na tabela 25.

Os dados revelam que três mutantes espontâneos (4, 6 e 7) apresentam ED_{50} (concentração necessária para reduzir o crescimento radial da colônia em 50%) na faixa de 72 a 96 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina B. Outros três (3, 8 e 5), têm ED_{50} entre 24 e 48 $\mu\text{g/ml}$. A ED_{50} do mutante 1 ocupou posição intermediária com relação aos dois grupos anteriores, situando-se entre 48 e 72 $\mu\text{g/ml}$, enquanto o mutante 2 revelou a maior ED_{50} : entre 120 e 144 $\mu\text{g/ml}$.

Com exceção do isolado 1, cuja ED_{50} ficou entre 24 e 36 $\mu\text{g/ml}$, os demais mutantes tiveram suas ED_{50} acima de 72 $\mu\text{g/ml}$. O mutante 2 foi o que mostrou a maior ED_{50} : entre 120 e 144 $\mu\text{g/ml}$.

Já a linhagem C-10 teve seu crescimento totalmente inibido por 24 $\mu\text{g/ml}$ da droga.

Tabela 25: Crescimento (em %) da linhagem C-10 e seus mutantes resistentes à higromicina

Linhagens	Concentração de Higromicina B ($\mu\text{g/ml}$)								
	0	12	24	36	48	72	96	120	144
C-10	100	24	0	0	0	0	0	0	0
Espon-tâneos									
1	100	100	95	80	70	35	0	0	0
2	100	100	95	89	89	84	74	68	42
3	100	87	75	62	21	0	0	0	0
4	100	96	87	82	69	61	48	43	43
5	100	76	57	28	0	0	0	0	0
6	100	100	100	94	83	67	44	39	17
7	100	82	77	77	68	59	36	23	4
8	100	91	90	77	50	14	0	0	0
Induzidos									
1	100	78	57	36	18	4	0	0	0
2	100	96	91	87	83	69	52	52	48
3	100	100	84	78	73	69	61	60	58
4	100	86	82	82	73	68	54	32	27
5	100	100	95	86	76	67	47	43	43
6	100	92	79	75	71	62	58	54	33

4.22 Protoplastização da linhagem C-10

Utilizando a metodologia descrita no item 3.26, foram realizados vários testes visando estabelecer o procedimento que proporcionasse melhor rendimento e, ao mesmo tempo, maior viabilidade.

4.22.1 Teste com a enzima

Este teste foi conduzido com o intuito de verificar possíveis diferenças de atividade entre a enzima Novozym 234 e sua similar comercializada pela Sigma, Lysing Enzymes. A regeneração dos protoplastos foi conduzida em TSA contendo 10,3% de sacarose, e os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 26.

Tabela 26: Dados referentes à obtenção de protoplastos utilizando enzima de duas procedências

Nome Comercial da enzima	Nº de colônias/ml em TSA (x 10 ⁶)	Nº de colônias/ml em TSA + sacarose (x 10 ⁶)	Quantidade de micélio (%)	Quantidade de protoplasto ^s (%)	Viabilidade (%)
Novozym 234	1,50*	10,11	0,68	4,60	3,92
Lysing Enzymes	2,96	5,32	1,87	3,32	1,45

* os dados são médias de dois experimentos

4.22.2 Teste com meios diferentes

Foram testados os meios TSA e MC contendo 10,3% de sacarose como estabilizador osmótico. O objetivo neste caso foi observar se os meios propiciavam regenerações diferenciadas dos protoplastos, que deveriam refletir-se no tamanho das colônias, e se influenciavam na viabilidade dos protoplastos. A tabela 27 contém os resultados obtidos.

Tabela 27: Dados referentes à obtenção de protoplastos utilizando meios diferentes

Meio	Nº de colônias/ ml em meio sem estabilizador osmótico (x 10 ⁶)	Nº de colônias/ ml em meio com estabiliza- dor osmótico (x 10 ⁶)	Quantidade de micélio (%)	Quantidade de protoplastos (%)	Viabilidade (%)
MC	2,06	6,20	0,82	3,55	2,73
TSA	1,55	7,60	0,68	3,04	2,36

4.22.3 Testes com MC contendo 20% de sacarose

Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 28, onde observa-se que não houve diferença entre as duas situações ensaiadas.

Tabela 28: Produção de protoplastos em MC contendo diferentes concentrações de sacarose

Porcentagem de sacarose no meio	Nº de colônias/ml em MC (x 10 ⁶)	Nº de colônias/ml em MC + sacarose (x 10 ⁶)	Quantidade de micélio (%)	Quantidade de protoplasto (%)	Viabilidade (%)
10,3	4,99*	10,70	2,17	4,67	2,50
20,0	4,99	10,77	2,17	4,68	2,51

* Este teste foi feito em paralelo com o experimento nº 4, apresentado na tabela 29

4.22.4 Protoplastização Utilizando MC + 10,3% de Sacarose como Estabilizador Osmótico

Estes testes foram realizados seguindo metodologia descrita no item 3.26. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 29.

Tabela 29: Produção de protoplastos apresentada pela linhagem C-10 em MC + 10,3% de sacarose

Teste nº	Nº de colónias/ml em MC ($\times 10^{-6}$)	Nº de colónias/ml em MC + sacarose ($\times 10^{-6}$)	Quantidade de micélio (%)	Quantidade de protoplastos (%)	Viabilidade (%)
1	0,63	2,09	0,25	0,84	0,59
2	0,96	7,01	0,39	2,84	2,45
3	2,07	4,48	0,97	1,96	0,99
4	4,99	10,70	2,17	4,67	2,50
5	3,34	12,37	0,65	2,01	1,36
6	3,71	6,64	2,06	3,68	1,62
7	2,23	3,33	1,81	2,72	0,91
8	0,43	5,23	0,19	1,75	1,56
9	2,32	8,69	0,92	3,45	2,53
10	0,73	1,07	0,71	1,07	0,36
11	0,74	2,90	0,27	1,25	0,98
		média	0,94	2,38	1,44

Pelos dados apresentados na tabela 29, observa-se que a quantidade de micélio presente nos ensaios pode ser considerada baixa (média de 0,94). A quantidade de protoplastos obtida foi de 2,38 (média) e a viabilidade média situou-se em 1,44.

4.23 Preparação do plasmídeo pBT 6 em larga escala

Segundo a metodologia descrita no item 3.27, foram feitas três preparações do plasmídeo pBT 6. Os resultados encontram-se sumarizados na tabela 30.

Tabela 30: Dados relativos às preparações do plasmídeo pBT 6

Preparação Nº	Absorbância em 230 nm	Absorbância em 260 nm	Absorbância em 280 nm	R1	R2	DNA (μ g)
1*	0,0930	0,1960	0,0950	0,4745	2,0632	196,0
2*	0,1520	2,2520	1,1060	0,0675	2,0362	1126,0
3**	0,6610	3,2050	1,7510	0,2062	1,8304	1602,5

* - Extração conduzida com o método 1 (item 3.27.2) e cloreto de céσιο retirado por diálise

** - Extração pelo método 2 (item 3.27.3 e cloreto de céσιο retirado conforme o descrito no último parágrafo do item 3.27.4

Comparando-se os resultados da preparação 1 e 2, elaboradas utilizando-se a mesma metodologia, observa-se alta similaridade no grau de pureza do material (R2) e grande diferença na concentração final do mesmo.

Já a preparação 3 apresentou concentração final de DNA maior que a preparação 2, apesar de estar com grau de pureza inferior.

4.24 Transformação

Utilizando metodologia descrita nos itens 3.28.1 e 3.28.2, foram realizados 13 testes objetivando transformar a linhagem C-10 com o plasmídeo pBT6. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 31. Apesar dos esforços, nenhum transformante pôde ser isolado.

Também não foi obtido sucesso nas várias tentativas de transformar a linhagem C-10 com o plasmídeo pAN7-1. Neste caso, os testes foram efetuados utilizando-se metodologia descrita no item 3.28.1. As condições utilizadas foram 10,3% de sacarose no meio de regeneração, PEG 50%, inóculo de 50 ou 100 µl/placa e adição de higromicina B 24 horas após o inóculo.

Tabela 31: Condições utilizadas para transformação com o plasmídeo pBT 6

Teste	Método	Concentração de Sacarose (%)	Concentração de PEG (%)	Inóculo por Placa (µl)	Adição de Benomil*
1	Item 3.28.1	10,3	18	100 e 200	I e A
2	Item 3.28.1	10,3	50	100 e 200	I e A
3	Item 3.28.1	10,3	18	10, 50 e 100	A
4	Item 3.28.1	10,3	50	10, 50 e 100	A
5	Item 3.28.1	20,6	18	10, 50 e 100	A
6	Item 3.28.1	20,6	50	10, 50 e 100	A
7	Item 3.28.1	10,3	18	50 e 100	A
8	Item 3.28.1	10,3	18	50 e 100	I
9	Item 3.28.1	10,3	50	50 e 100	I
10	Item 2.28.2	10,3	40	50 e 100	A
11	Item 2.28.2	10,3	40	50 e 100	I
12	Item 3.28.1	10,3	18	100	A
13	Item 3.28.1	10,3	50	100	A

*I = benomil adicionado junto ou imediatamente após o inóculo

A = benomil adicionado 24 horas após o inóculo

5: DISCUSSÃO

5.1 Crescimento da linhagem C-10 em vários meios de cultura

Uma das melhores fontes de carbono para se cultivar *A. chrysogenum* em meio sólido é a sacarose. Isso explica o fato de seu crescimento em MMS⁻ contendo lactose e em MMS⁻ contendo glicose ter sido menor que em MMS⁻ (tabelas 2 e 3). Confirmando isso, observa-se que a linhagem C-10 apresentou desenvolvimento intermediário quando o meio teve sacarose e glicose em sua formulação (MMS⁻ MQ SG).

O crescimento da linhagem C-10 em meio mínimo sólido sem fonte de enxofre (MMS⁻), mesmo elaborado com água Milli-Q (MMS⁻ MQ) ou em meio mínimo contendo apenas metionina como fonte de enxofre (MMS⁻ M), foi praticamente idêntico ao observado para MM (tabelas 2 e 3). As colônias desenvolvidas nestes meios também não puderam ser distinguidas morfológicamente.

Como o ágar contém quantidades significativas de enxofre orgânico ligado covalentemente de tal forma que pode suportar o crescimento de linhagens de *A. chrysogenum* (QUEENER et al., 1984), os testes seguintes foram realizados em meio líquido.

Os primeiros testes em meio líquido foram conduzidos em tubo de ensaio sem agitação. Os resultados (não mostrados) confirmaram aqueles obtidos em meio sólido, ou seja, o crescimento vigoroso foi verificado mesmo nos meios sem adição proposital de enxofre. Este fenômeno foi observado em outras linhagens de *A. chrysogenum* por TREICHLER et al. (1978), segundo os quais o crescimento ocorreria devido a traços do elemento presentes no meio. Outra possibilidade que deve ser citada é a presença de estoques intracelulares que seriam utilizados pelo microrganismo nestes casos de privação de enxofre. Obviamente, os dois fatores podem estar atuando em conjunto.

Tais hipóteses foram reforçadas quando os testes de crescimento foram conduzidos em meio líquido sob agitação (tabela 4). Apesar dos resultados obtidos em MMS⁻ terem sido proporcionalmente menores do que em MM, pode ser observado que o crescimento ocorreu mesmo após três etapas consecutivas de inóculo.

5.2 Produção de cefalosporina C

5.2.1 Curva de acúmulo

Sendo um metabólito secundário típico, a cefalosporina C começa a ser produzida logo após a etapa de crescimento, ou seja, na idiofase. Observando-se a tabela 5 e a figura 9, verifica-se que a concentração do antibiótico aumentou até 144 horas de fermentação, diminuindo um pouco a partir deste ponto.

O fato dos valores obtidos com a dosagem microbiológica terem sido superiores aos de HPLC deve-se basicamente à especificidade deste último método, que mede apenas a cefalosporina C produzida. Apesar de ter sido empregada uma linhagem de *Alcaligenes faecalis* especial para as análises microbiológicas (Item 3.1), outras moléculas da via biossintética tais como a deacetil e a deacetoxicefalosporina C, e a própria penicilina N (figura 2), são capazes de inibir o crescimento da bactéria, interferindo no resultado.

Como o tempo de 144 horas foi aquele onde a cefalosporina C estava presente em maior concentração, ele foi escolhido para a realização dos testes de produção futuros, tanto para a própria C-10 quanto para seus mutantes e derivativos.

As demais variáveis comportaram-se da maneira esperada para processos dessa natureza. O crescimento atingiu seu máximo após 48 horas, período em que foi consumida a maior parte da glicose presente no meio, uma vez que ela é a fonte de carbono preferencial (Item 2.2.3.1). Na idiofase foi consumida a sacarose de tal forma que no final da fermentação as fontes de carbono estavam praticamente esgotadas e o pH, que inicialmente estava em 6,4, alterou-se para 7,0. O valor do pH final não foi mais baixo que o inicial devido à presença de carbonato de cálcio no meio de fermentação, substância que apresenta um efeito tampão (Item 2.2.3.5).

5.2.2 Produtividade da linhagem C-10

No caso de fermentações conduzidas com agitação, SHEN et al. (1986) constataram que a linhagem C-10 produzia 18 g/l de cefalosporinas. Como os autores fizeram a dosagem utilizando método microbiológico, parte desta quantidade corresponde aos intermediários. Supondo que 80 a 90% deste total seja cefalosporina C, isso resultaria numa produção de 14,4 a 16,2 g/l. Como estes valores são muito superiores aos encontrados no presente

trabalho (tabela 5) inúmeros testes foram realizados visando reproduzir ou pelo menos aproximar-se dos resultados preconizados na literatura.

Apesar do meio de fermentação utilizado para fazer a curva de acúmulo já ter sido aquele que demonstrou melhores resultados dentre vários ensaiados (Item 3.2.5), inúmeros outros meios ainda foram experimentados sem que fosse obtido algum sucesso (resultados não mostrados). Além dos meios, foram alteradas as condições tais como a agitação, temperatura e pré-inóculo. Mais uma vez, nenhum ganho de produção foi conseguido. Mesmo processos conduzidos em fermentador, onde os controles são mais efetivos, a agitação e a aeração mais eficientes e o pH pode ser mantido no ponto ideal durante todo o tempo, não revelaram resultados mais promissores (dados não mostrados).

Com esses resultados, ficou evidenciado que a baixa produtividade estaria associada à linhagem C-10 e não ao processo. Assim sendo, uma nova ampola liofilizada da cultura foi pedida à ATCC.

Vários testes foram efetuados com a nova amostra, porém os índices de produtividade situaram-se nos mesmos níveis encontrados anteriormente.

Como a ATCC não realiza testes de produtividade nas culturas que mantém em depósito, haveria ainda a possibilidade da linhagem ter perdido sua característica de produção durante os vários anos de estocagem, ou já ter sido depositada desta maneira. O passo seguinte foi tentar conseguir a linhagem da PANLABS, empresa que a desenvolveu num extenso programa de melhoramento.

O contato inicial na PANLABS foi feito com o Dr. Christopher Ball e, em seguida, com o Dr. Robert T. Rowlands, que gentilmente providenciou o envio da linhagem C-10 mantida no banco de culturas da empresa. Além da cultura, o Dr. Rowlands enviou o procedimento para reativação da mesma e o protocolo para fermentação com agitação, utilizando-se meio complexo.

Durante a reativação da primeira ampola recebida, constatou-se a baixíssima viabilidade da cultura: nenhuma colônia se desenvolveu nas placas de diluição. Apenas algumas colônias cresceram nas placas inoculadas com alíquotas retiradas de meio líquido contendo todo o liofilizado de uma segunda ampola e que foi mantido por 7 dias a 25 C e 120 rpm.

Mesmo com a baixa viabilidade, os testes fermentativos foram realizados seguindo tanto o protocolo recomendado pelo Dr. Rowlands quanto aqueles desenvolvidos na Codetec. Mais uma vez, os melhores resultados foram conseguidos utilizando-se o meio descrito no item

3.2.5., tendo a produção apresentado níveis similares aos da linhagem da ATCC. A obtenção de resultados tão inferiores aos esperados poderia ser consequência da baixa viabilidade. Ou a liofilização teria sido conduzido de maneira inadequada, destruindo a maior parte das células com boa produção e, de alguma forma, selecionando aquelas com baixa produção, ou todo esse processo teria ocorrido por deficiência na estocagem das ampolas liofilizadas. Ou ainda, poderia estar ocorrendo uma associação dos dois fatores.

Esses resultados foram passados para o Dr. Rowlands que, mais uma vez demonstrando muito interesse, gentilmente enviou mais duas ampolas liofilizadas da linhagem C-10. Segundo ele, essa nova amostra tinha passado por vários testes, estando com ótima viabilidade e produzindo os 10 a 12 g/l de cefalosporina C anteriormente mencionados.

De fato, a manipulação da nova amostra revelou boa viabilidade, tendo uma das colônias com crescimento vigoroso sido isolada e submetida aos testes fermentativos. Porém, a produção novamente situou-se nos patamares anteriores.

Como os testes tinham sido conduzidos com o microrganismo isolado de uma única colônia, suspeitou-se que este procedimento poderia ter acarretado na seleção de um clone cuja capacidade de produção havia sido perdida. Com o objetivo de comprovar tal suspeita, cerca de 30 colônias de diferentes diâmetros foram isoladas e submetidas aos mesmos testes. A análise dos respectivos caldos fermentados mostrou que os níveis de produção eram os mesmos constatados anteriormente, bem aquém dos 10 a 12 g/l (dados não mostrados).

A discrepância observada entre os resultados obtidos e os esperados aponta para a hipótese de perda da característica de produção, que pode ter ocorrido em algum ciclo de liofilização ou em algum ponto dos longos anos de estocagem, provavelmente anterior ao seu depósito na ATCC. Por problemas semelhantes estão passando outros grupos de pesquisadores da Califórnia (DEMAIN, A. L. ; comunicação pessoal) e de Cuba (VALLIN, C.; comunicação pessoal), fatos que vêm reforçar a hipótese proposta.

É importante salientar que a linhagem C-10 foi utilizada industrialmente no início dos anos 80, tendo sido em seguida substituída por linhagens superiores. Somente alguns anos depois ela foi depositada na ATCC. É justamente neste intervalo entre o final de sua utilização comercial e transferência para a ATCC que a C-10 deve ter sofrido algum problema que provocou a redução nos seus níveis de produção, visto que culturas oriundas das duas fontes não foram capazes de produzir cefalosporina C nas quantidades observadas na época de sua utilização industrial (10 a 12 g/l).

Outra evidência que reforça esta hipótese é o fato do próprio Prof. DEMAIN ter afirmado ao Dr. VALLIN que os resultados relacionados à produção de cefalosporina C das linhagens C-10 e CW-19 e contidos no trabalho realizado por seu grupo (SHEN et al., 1986) estavam superestimados.

É extremamente difícil apontar qual fenômeno genético seria o responsável pela queda na produção porém, conforme discutido anteriormente, ele deve ter sido fruto dos vários ciclos de liofilização ou da estocagem. MacDONALD (1968) e BALL (1973) trabalharam com linhagens de *Penicillium chrysogenum* e explicaram o surgimento de derivados com produção reduzida por ocorrência de mutações associadas à estocagem. O último autor ressalta ainda a falta de dados na literatura relativa à ocorrência dessas variações.

Mesmo tendo constatado que a linhagem C-10 produz cerca de 2 g/l de cefalosporina C, ela continuou a ser a cultura de maior produtividade disponível em coleções de culturas e portanto um excelente ponto de partida para um programa de melhoramento genético.

Uma sondagem na literatura disponível revelou que, além da transformação com vetores contendo genes da via biossintética da cefalosporina C, três procedimentos clássicos pareceram ser mais promissores para se conseguir isolados com ganho de produção. São eles: mutação e seleção da colônias através de halo de inibição, seleção de colônias com crescimento vegetativo reduzido, e obtenção de revertentes para a via do enxofre, uma vez que este elemento está presente na molécula de cefalosporina C e apresenta importante papel em sua síntese.

Definidas as estratégias, os estudos foram realizados e a discussão dos resultados obtidos está exposta nos itens seguintes.

5.2.3 Produção dos isolados ao acaso

5.2.3.1 Em meio sólido

A ampla variação de produção de cefalosporina C observada nos 1988 indivíduos estudados (tabela 7 e figura 10) é uma ocorrência característica de trabalhos desta natureza, especialmente naqueles envolvendo metabólitos secundários. SIMPSON e CATEN (1979) verificaram fenômeno semelhante em linhagens de *Penicillium chrysogenum* e estabeleceram um método de classificação baseado na distribuição dos valores de produtividade da população (Ítem 3.9.).

A aplicação deste método nos isolados da linhagem C-10 resultou na classificação de 54 indivíduos "+", que foram separados e ensaiados sob agitação.

5.2.3.2 Em meio líquido sob agitação

Os 54 indivíduos classificados como "+" tiveram seus níveis de produção ensaiados sob agitação (tabela 8 e figura 11). Conforme discutido no caso da produção em meio sólido, houve ampla variação dos níveis de produção tanto nos isolados ao acaso quanto na linhagem C-10.

Como o número de isolados era grande e nenhum deles apresentou produção que se destacasse, optou-se por classificar os indivíduos "+" entre os 54. Assim, somente os 3 isolados (A-79, A-818 e A-1191) passaram para a fase seguinte de testes (Item 4.7.). Eles produziram respectivamente 2,00, 2,06 e 2,14 g/l de cefalosporina C. Visando eliminar a possível interferência de variáveis associadas à distribuição natural dos níveis de produtividade, foi escolhido para efeito de comparação o indivíduo da C-10 que apresentou maior produção (1,94 g/l, vide tabela 8).

Os resultados referentes a esta comparação são apresentados na tabela 10 e a análise estatística na tabela 11. A comparação das médias (tabela 12) mostra que nenhum dos isolados (A-79, A-818 e A-1191) apresentou produção significativamente superior à linhagem C-10.

Os resultados aqui obtidos contrastam com os de CHANG e ELANDER (1979), que conseguiram isolar 4 indivíduos com produção superior dentre os 2000 ensaiados. Esta diferença pode se dever ao fato dos autores empregarem outra linhagem de *A. chrysogenum* em seus estudos, à diferença do método de seleção, já que eles ensaiaram as 2000 colônias sob agitação, e/ou talvez ao próprio critério de classificação empregado.

Com relação à diferença de linhagens, deve ser enfatizado que, normalmente, quanto maior a produção da linhagem, maior é também a dificuldade de se conseguir isolados superiores. Pode ser que CHANG e ELANDER (1979) tenham utilizado linhagens com produção bem inferior à apresentada pela C-10.

5.2.4 Produção dos mutantes com crescimento reduzido sob agitação

A população destes mutantes apresentou distribuição cujo desvio padrão (0,4755, vide tabela 9 e figura 12) foi maior que o apresentado pela C-10 (0,3107, vide tabela 8). A média também foi um pouco maior: 1,4083 contra 1,3176.

Apesar dessas diferenças, a comparação da produção de cefalosporina C entre as duas populações demonstrou não haver diferenças significativas entre elas (item 4.8.).

O emprego do método de classificação de SIMPSON e CATEN (1979) identificou 3 indivíduos "+" (M-5, M-76 e M-90), cujos níveis de produção foram comparados com o isolado da C-10 que apresentou maior produção (1,94 g/l). Os resultados estão sumarizados na tabela 10 e a análise estatística na tabela 11. Através da comparação das médias na tabela 12, verifica-se que apenas o mutante M-76 apresentou produção significativamente superior à linhagem C-10. Em seus estudos, CHANG e ELANDER (1979) conseguiram 2 destes mutantes com ganho de produção entre os 52 que testaram, frequência superior à encontrada no presente trabalho. As razões para esta diferença devem ser as mesmas discutidas no item anterior.

A superioridade do mutante morfológico M-76 pôde ser confirmada em mais três ensaios (dados não mostrados), após os quais seus níveis de produção baixaram para o patamar da linhagem C-10. Como este fenômeno ocorreu de forma abrupta, é provável que a instabilidade presente estivesse relacionada com fatores genéticos e não ambientais, uma vez que estes últimos caracterizam-se por causarem flutuações na produção.

SKATRUD e QUEENER (1989), SMITH et al. (1991) e WALZ e KÜCK (1991), utilizando métodos diferentes, constataram que linhagens industriais de *A. chrysogenum* possuem padrão cromossômico claramente distinguível das parentais, indicando que translocações ocorridas durante o processo de melhoramento genético devem ter levado a rearranjos que provavelmente são responsáveis pelo aumento de produção nestas linhagens. Tendo isto em vista, é possível que o mutante M-76 tenha sofrido algum rearranjo que o tornou melhor produtor, porém instável geneticamente. Dessa forma, em poucos ciclos houve um retorno à estabilidade que acabou proporcionando a diminuição da produção aos níveis da linhagem C-10.

Outro fenômeno apontado como causador de instabilidade em várias linhagens industriais é a heterocariose (HAAS et al., 1956; REUSSER et al., 1961; BONATELLI e AZEVEDO, 1974). Entretanto, este tipo de ocorrência em *A. chrysogenum* fica minimizado pelo fato de

ser difícil encontrar células binucleadas após anastomose de hifas nesta espécie (PEBERDY, 1987). O autor sugere que a presença de um segundo núcleo desestabiliza o mecanismo que controla a relação proporcional entre genoma e massa citoplasmática.

Há ainda a possibilidade da instabilidade ter sido causada por fatores extranucleares, conforme constatado por MAYNE et al. (1971).

5.3 Isolamento de mutantes resistentes

5.3.1. Ao selenato e/ou cromato

Conforme exposto no item 2.5., os mutantes resistentes ao selenato podem apresentar lesões no gene *sB*, que codifica a sulfato permease (enzima 1 da figura 5), e/ou no gene *sC*, que codifica a ATP sulfurilase (enzima 2 da figura 5). Os mutantes resistentes também ao cromato apresentam lesões no gene *sB*. Já os mutantes resistentes ao selenato e sensíveis ao cromato apresentam lesões apenas no gene *sC*.

A relação existente entre resistência ao selenato e/ou cromato e as lesões nos genes *sB* e *sC* faz deste método uma excelente maneira de se isolar mutantes deficientes para a via metabólica do enxofre.

Comparando-se os níveis de resistência obtidos em MMS⁻ contendo 10 mg/l de D,L-metionina (tabela 14) com os obtidos em MMS⁻ (tabela 15), constata-se enorme discrepância, ou seja, em MMS⁻ o crescimento foi totalmente inibido numa concentração de selenato 256 vezes menor. Esses resultados revelam claramente que a D,L-metionina aumenta a resistência da linhagem C-10 ao selenato e concordam com o observado por QUEENER et al. (1984), onde uma outra linhagem de *A. chrysogenum* (M-8650) teve sua toxicidade revertida com 100 mg/l de metionina.

No caso da curva de sobrevivência com colônias isoladas (tabela 13 e figura 13) a resistência foi ainda maior, tendo ocorrido crescimento em até 51,2 mM da droga.

Os níveis de tolerância ao selenato apresentados pela linhagem C-10 em MMS⁻ contendo 10 mg/l de D,L-metionina são muito mais elevados que os encontrados para espécies de *Aspergillus* (ARST, 1968; BUXTON et al., 1989), onde a faixa inibitória de crescimento situa-se em torno de 0,05 mM.

A frequência de prováveis mutantes resistentes variou de $2,42 \times 10^{-6}$ a $18,02 \times 10^{-6}$ em MMS- contendo 10 mg/l de D,L-metionina e de $0,71 \times 10^{-6}$ a $5,00 \times 10^{-6}$ em MMS- (tabelas 14 e 15). Embora não tenha sido possível encontrar na literatura relatos que permitissem uma comparação destes dados, as frequências podem ser consideradas como relativamente altas uma vez que não houve tratamento com agentes mutagênicos.

A caracterização dos prováveis mutantes (tabela 16) foi conduzida em MMS- contendo 2 mg/l de D,L-metionina. A concentração deste aminoácido foi definida após a realização de vários testes preliminares (resultados não mostrados) onde foi necessário adequar paralelamente as concentrações de selenato. Optou-se por utilizar MMS- contendo menor concentração de D,L- metionina porque, neste caso, a concentração de selenato necessária para inibir totalmente o crescimento das linhagens sensíveis passou a ser 0,1 mM e não mais os cerca de 12,8 mM (tabela 14) ou de 51,2 mM (tabela 13). Conforme já discutido, a redução da concentração de D,L-metionina no meio eleva a sensibilidade do microrganismo à droga.

Conforme pode ser observado no item 4.12., as 32 linhagens ensaiadas cresceram mesmo na concentração mais elevada de selenato (1,6 mM) enquanto que a C-10 apresentou 100% de inibição já em 0,1 mM da droga. Estes resultados permitem que se possa afirmar com segurança que todas as linhagens ensaiadas são resistentes ao selenato, apresentando portanto lesões nos genes *sB* e *sC*, ou em apenas um deles.

A caracterização dos mutantes resistentes ao selenato quanto a serem cromato sensíveis ou cromato resistentes revelou que, dos 32 mutantes ensaiados, apenas 3 mostraram-se sensíveis à droga (Item 4.13.), ou seja, apresentam lesão apenas no gene *sC* que codifica a ATP sulfurilase (enzima 2 da figura 5). Os demais mutantes são resistentes às duas drogas, apresentando, portanto, lesão apenas no gene *sB* que codifica a sulfato permease (enzima 1 da figura 5) ou em ambos os genes. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos para *Aspergillus nidulans* (ARST, 1968) e para *Aspergillus niger* (BUXTON et al., 1989).

Comparando com os resultados obtidos com o selenato, a concentração de cromato necessária para inibir totalmente o crescimento da linhagem C-10 em MMS- contendo 10 mg/l de D,L-metionina foi bem menor (0,040 mM, vide tabela 17). Já a frequência de prováveis mutantes (4×10^{-6} a 16×10^{-6} , vide item 4.11.) foi semelhante à constatada para os mutantes resistentes ao selenato.

A inibição de crescimento detectado principalmente nas placas de inóculo pouco denso quando a concentração de D,L-metionina foi elevada de 10 para 100 ou 500 mg/l (Item 4.11.), pode se dever a um efeito inibitório observado por TREICHLER et al. (1978) em mutantes de *A. chrysogenum* que utilizam eficientemente sulfato inorgânico para produzirem cefalosporina C. Porém, para comprovar tal suspeita, mais estudos seriam necessários.

Conforme discutido no item 5.1., a linhagem C-10 foi capaz de crescer em MMS⁻ líquido mesmo após 3 etapas de inóculo, fato que reforçou a existência de traços de enxofre no meio e/ou a manutenção de estoques intracelulares do referido elemento. Testes semelhantes conduzidos com dois mutantes resistentes apenas ao selenato e um mutante resistente ao selenato e ao cromato revelaram resultados idênticos. Mesmo apresentando deficiência na metabolização do sulfato, as linhagens conseguiram crescer até a quarta etapa de inóculo (tabela 19). Obviamente, os resultados agora obtidos não descartam as hipóteses propostas mas revelam que o enxofre armazenado pelas células ou contido em traços no meio encontra-se numa forma mais reduzida que o sulfato, como por exemplo o sulfeto, na forma fosforilada (figura 5), ou ainda na forma orgânica, uma vez que os mutantes com lesão no gene *sB* são incapazes de absorver o sulfato do meio extracelular e os mutantes com lesão apenas no gene *sC* conseguem incorporar o sulfato externo mais não metabolizá-lo. Apesar da existência de traços de enxofre orgânico ou sulfato fosforilado no MMS⁻ ser menos provável que a presença de sulfeto, por exemplo, intracelularmente, a estocagem de qualquer uma dessas formas é perfeitamente possível.

O fato dos mutantes *sC* crescerem em MMS⁻ inviabiliza a obtenção de revertentes e a complementação da marca via transformação com o plasmídeo pANDY 1, na medida em que torna-se impossível estabelecer um meio de seleção. Dessa forma, uma outra etapa inicialmente proposta não pôde ser concluída: o teste de produção dos revertentes e dos transformantes.

Todavia, a comparação entre a produção apresentada pela linhagem C-10 e a de seus mutantes foi realizada (tabela 20 e figura 15), revelando não haver diferença significativa entre as duas populações. Do ponto de vista biológico, tais resultados poderiam ser justificados pela presença de D,L-metionina no meio de fermentação, facilmente metabolizada pelos mutantes que não conseguem absorver ou metabolizar os íons sulfato. Aparentemente, este desvio não está proporcionando dificuldades para o microrganismo, nem com relação ao crescimento e nem com relação à produção de cefalosporina C. A utilização de estoques intracelulares não pode ser descartada.

5.3.2 Ao benomil

Através da curva de sobrevivência da linhagem C-10 ao benomil (tabela 21 e 22 e figura 16) foi observado que a inibição total do crescimento ocorreu na faixa de concentração entre 1,00 e 1,25 µg/ml. Estes valores foram superiores aos 0,50 a 0,75 µg/ml apresentados por algumas linhagens de *Aspergillus niger* (FERREIRA, 1991).

A frequência média de prováveis mutantes induzidos resistentes ao benomil ($12,92 \times 10^{-6}$) foi 26 vezes maior que a dos espontâneos ($0,49 \times 10^{-6}$) e semelhante à dos mutantes resistentes ao selenato, estimada em $10,87 \times 10^{-6}$.

A frequência dos prováveis mutantes resistentes ao benomil estimada neste trabalho foi superior às obtidas por TUYL (1975) nas espécies *Aspergillus nidulans*, ($0,5 \times 10^{-6}$), *Aspergillus niger* ($2,5 \times 10^{-6}$) e *P. chrysogenum* ($1,0 \times 10^{-6}$). O fato da linhagem C-10 apresentar frequência mais alta de mutantes, em parte pode ser devido às suas UFC serem compostas principalmente por fragmentos de hifas contendo de 1 a mais de 10 células, enquanto que nas espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* as UFC são compostas basicamente por conídios que, mesmo sendo multinucleados, não atingem a proporção de núcleos encontrada nos fragmentos de hifa.

A constatação de que existem dois níveis distintos de resistência nos mutantes de *Acremonium chrysogenum*, sugere a ocorrência de um fenômeno semelhante ao observado em *Aspergillus nidulans*. Nesta espécie, há pelo menos três genes que determinam a resistência ao benomil (TUYL, 1977; MORRIS, 1986), sendo que um deles (*ben A*) confere alto nível de resistência e codifica os polipeptídeos β -tubulina 1 e 2 (HASTIE e GEORGOPOULOS, 1971; TUYL, 1977; SHEIR-NEISS et al., 1978), e os outros dois (*ben B* e *ben C*) conferem resistência menos pronunciada a este fungicida (TUYL, 1977).

TUYL (1975) constatou que dentro de cada uma das espécies que estudou, o grau de resistência dos diferentes mutantes variou de baixos até altos níveis, tendo as médias das ED_{50} situado-se na faixa de 30 $\mu\text{g/ml}$ para *A. nidulans* a mais de 500 $\mu\text{g/ml}$ para *A. niger*.

O teste comparativo, cujos resultados estão sumarizados na tabela 23, revelam que os protoplastos da linhagem C-10 foram um pouco mais sensíveis ao benomil do que as formas vegetativas. Como era de ser esperar, o mutante resistente cresceu em concentrações bem mais elevadas. A sensibilidade um pouco mais acentuada dos protoplastos provavelmente deve-se à sua maior fragilidade.

5.3.3 À higromicina B

Os protoplastos também foram mais sensíveis à higromicina B, tendo crescido até 16 $\mu\text{g/ml}$, do que as formas vegetativas, que foram capazes de crescer até 20 $\mu\text{g/ml}$ (tabela 24). Em função desses resultados, a concentração de antibiótico a ser utilizada no meio de seleção dos transformantes será 24 $\mu\text{g/ml}$, enquanto que no caso do isolamento de mutantes, onde são utilizadas as formas vegetativas, a concentração será de 28 $\mu\text{g/ml}$.

A sensibilidade apresentada pela C-10 é consideravelmente maior que a constatada por SMITH et al. (1992) para a linhagem M 8650, cujos transformantes foram isolados em meio contendo cerca de 100 µg/ml de higromicina B, e relativamente próxima à que SKATRUD et al. (1989) observou para a linhagem 394-4, que teve seu crescimento inibido totalmente com 15 µg/ml e foi considerada extremamente sensível.

A frequência dos prováveis mutantes espontâneos resistentes à higromicina B foi estimada em $0,026 \times 10^{-6}$ (item 4.20.), valor 20 vezes menor que o obtido para o benomil (item 5.3.2.) e cerca de 380 vezes menor que o constatado para o selenato (item 5.3.1.). Já a frequência de prováveis mutantes induzidos pôde ser calculada em 30×10^{-7} , valor 115 vezes maior que dos espontâneos.

A caracterização dos prováveis mutantes revelou que a maioria deles tem ED_{50} acima de 72 µg/ml (tabela 25), enquanto que a linhagem C-10 teve seu crescimento totalmente inibido com 24 µg/ml. Assim sendo, pode-se afirmar com segurança que as 14 linhagens testadas são realmente resistentes à higromicina B.

SMITH et al. (1992), trabalhando com a linhagem M-8650, obtiveram 135 transformantes para resistência à higromicina B. Todos eles cresceram em 350 µg/ml, sendo que 70% deles foi capaz de crescer em mais de 1600 µg/ml. Estes resultados também são superiores aos constatados para os mutantes aqui testados e confirmam a maior sensibilidade da linhagem C-10.

5.4 Protoplastização

Uma vez estabelecido o protocolo inicial para a obtenção de protoplastos, vários testes foram realizados com o intuito de definir a enzima a ser utilizada, o meio de cultura e o estabilizador osmótico.

Por ter apresentado melhores resultados tanto com relação ao número de protoplastos produzidos quanto à viabilidade dos mesmos (tabela 26), a enzima Novozym 234 foi escolhida em detrimento de sua similar comercializada pela Sigma. É importante enfatizar que as diferenças aqui observadas não estão necessariamente relacionadas com a procedência das enzimas. Com maior probabilidade, elas devem refletir diferenças dos lotes de produção.

Já a opção por utilizar MC ao invés de TSA foi mais difícil, visto que os resultados tiveram valores bem mais próximos. Houve uma diferença de apenas 16% na viabilidade (tabela 27).

Como há na literatura relatos da utilização de vários estabilizadores osmóticos para *A. chrysogenum*, entre eles a sacarose (DÍEZ et al. 1987; GUTIÉRREZ et al. 1991 a) e cloreto de sódio (FAWCETT et al. 1973; HAMLIN et al. 1981), alguns testes preliminares foram realizados (dados não mostrados) com o objetivo de definir o estabilizador mais apropriado. Também foi incluído nestes testes o sorbitol nas concentrações de 0,15, 0,30 e 0,50 M.

O cloreto de sódio 0,8 M foi aquele que permitiu a regeneração do maior número de colônias, porém, somente algumas delas apresentaram bom desenvolvimento. A maioria das colônias apresentou crescimento radial menor que 1 mm. A sacarose a 10,3% e o sorbitol a 0,30 ou 0,50 M apresentaram índices de regeneração semelhantes. Houve superioridade da sacarose com relação ao vigor das colônias crescidas e, por isso, ela foi escolhida. Além disso, seu preço é bem menor.

Uma vez que WHITEHEAD et al. (1990) utilizaram sacarose a 20% em seus experimentos, optou-se por testar as duas concentrações (tabela 28). Os resultados foram praticamente idênticos e, obviamente, a concentração de 10,3% foi adotada para a realização dos experimentos futuros.

Observando-se dos dados obtidos nos vários testes donde foi utilizada a sacarose a 10,3% com estabilizador osmótico (tabela 29), constata-se que a quantidade de micélio presente nos ensaios pode ser considerada relativamente baixa, fato que traz uma contribuição positiva em experimentos dessa natureza.

Já o baixo número de protoplastos viáveis traz uma contribuição que contrasta com a anterior. Porém, este problema fica de certa forma minimizado pela alta eficiência de protoplastização apresentada pela linhagem C-10, que situou-se na faixa de $1,0$ a $4,0 \times 10^9$ /g de micélio. Estes resultados estão bem próximos dos $4,0 \times 10^9$ protoplastos/g de micélio descritos na literatura (GUTIÉRREZ et al. 1991 a).

Ainda com relação ao número de protoplastos viáveis, o resultado aqui obtido (média de 1,44) foi um pouco inferior ao encontrado por SKATRUD et al. (1987) com a linhagem ATCC 11550, cuja média de 13 ensaios foi 1,7%, e situou-se dentro da faixa de 2,0 a 7,0% observada por MINUTH e ESSER (1983).

A viabilidade dos protoplastos em *A. chrysogenum* pode ser considerada baixa quando comparada com outras espécies de fungos filamentosos, como por exemplo *Aspergillus niger* e *Aspergillus awamori*, cujos valores situam-se na faixa de 7,5 a 19,0% (VIALTA, 1987).

5.5 Preparação do plasmídeo pBT6

A alta similaridade no grau de pureza observada entre as preparações 1 e 2 (tabela 30) era esperada uma vez que o método empregado nos dois casos foi o mesmo. A grande diferença que estas preparações apresentaram com relação à quantidade de DNA produzida deve-se, provavelmente, a algum problema ocorrido na etapa de produção, extração ou purificação.

Já a preparação 3 apresentou concentração final de DNA maior que a preparação 2, apesar de estar com um grau de pureza inferior. Essas disparidades podem ser explicadas pelas diferenças contidas nas metodologias empregadas para cada um dos casos. A ausência de tratamento com RNase e das etapas de extração com clorofil e clorofane, deve ter proporcionado menor perda de DNA na preparação 3, mas impediu que impurezas fossem retiradas.

5.6 Transformação

Apesar das várias tentativas realizadas (tabela 31), não foi possível isolar transformantes resistentes ao benomil. Talvez resida nesta dificuldade a razão pela qual não puderam ser encontrados na literatura relatos de transformação de linhagens de *A. chrysogenum* onde este marcador tenha sido utilizado, excetuando-se o trabalho de WHITEHEAD et al. (1990), onde o plasmídeo pBT6 foi usado num sistema de co-transformação. Já em outras espécies de fungos filamentosos tais como *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans*, há vários relatos de transformação com o gene de resistência ao benomil isolado de *Neurospora crassa* (ORBACH et al., 1986; RAMBOSEK e LEACH, 1987; FERREIRA, 1991).

Além disso, o não surgimento de transformantes poderia resultar do baixo número de protoplastos viáveis (média 1,44; vide tabela 29) ou do fato de linhagens de uso comercial como a C-10, que já passaram por extensos programas de melhoramento genético, estarem mais sujeitas a apresentar problemas de regeneração da parede celular e frequência de transformação bem mais baixa (CULLEN e BERKA, 1987; SKATRUD et al. 1987; ISOGAI et al., 1991b).

Ao contrário do que ocorre com o benomil, a marca de resistência à higromicina B tem sido utilizada com sucesso na transformação de várias linhagens de *A. chrysogenum* (SKATRUD et al., 1987; KÜCK et al. 1989; KIMURA et al. 1989; SMITH et al. 1992), apesar de sua frequência ser considerada relativamente baixa, situando-se na faixa de 0,05 a 25 transformantes por micrograma de DNA (SMITH et al. 1992).

Mesmo utilizando o gene da higromicina B como marcador (plasmídio pAN7-1), não foi possível isolar transformantes nas várias tentativas realizadas. Além das justificativas acima apontadas, o insucesso desta nova empreitada faz com que seja necessário contar, de maneira mais incisiva, com a possibilidade da existência de problemas em um ou mais passos do procedimento técnico empregado.

6: CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

- a) A linhagem C-10 de *A. chrysogenum* e os mutantes resistentes ao selenato e/ou cromato dela derivados são capazes de crescer em meio líquido desprovido de qualquer fonte intencional de enxofre, mesmo depois de quatro etapas de inóculo. Estas mutações não alteraram os níveis de produção de cefalosporina C.
- b) Os níveis de produção verificados para a linhagem C-10 foram bem inferiores àqueles preconizados pela literatura. É provável que esta queda na produção deva-se a alguma mutação ocorrida durante os longos anos de estocagem.
- c) O único indivíduo com produção superior obtido entre os mutantes isolados ao acaso e morfológicos perdeu esta característica abruptamente após três ensaios, caracterizando a ocorrência de algum tipo de instabilidade associada a fatores genéticos.
- d) Os níveis de tolerância ao selenato apresentados pela linhagem C-10 são muito mais elevados do que os observados em espécies do gênero *Aspergillus*, tomando-se menores à medida que diminui a concentração de metionina no meio.
- e) A inibição de crescimento detectada para concentrações mais elevadas de metionina é um fenômeno que já foi anteriormente observado em *A. chrysogenum* e pode refletir uma utilização mais eficiente do sulfato inorgânico.
- f) A existência de dois níveis de resistência ao benomil em *A. chrysogenum*, sugere ocorrência de fenômeno semelhante ao observado em *Aspergillus nidulans*, espécie onde existem pelo menos três genes que conferem resistência a esta droga.
- g) A super-sensibilidade à higromicina B apresentada pela linhagem C-10 de *A. chrysogenum* foi observada apenas em uma outra linhagem, a 394-4.
- h) A luz ultravioleta mostrou-se um excelente agente indutor tanto para as mutações que conferem resistência ao benomil quanto à higromicina B.
- i) O baixo número de protoplastos viáveis apresentado pela linhagem C-10 é, de certa forma, compensado pela alta eficiência de protoplastização.

7: RESUMO

O objetivo inicial do presente trabalho foi elevar os níveis de produção de cefalosporina C da linhagem C-10 de *Acromonium chrysogenum* para que eles fossem comparáveis aos citados na literatura, que situam-se na faixa de 10 a 16 g/l. Apesar das inúmeras tentativas, constatou-se produção bem inferior, cerca de 2 g/l. Foram empregadas duas estratégias de melhoramento: mutação e seleção de isolados com maior produção em meio sólido, e mutantes morfológicos com crescimento vegetativo reduzido. No primeiro caso não foi possível isolar qualquer colônia com produção superior. Já utilizando a segunda estratégia, foi isolado o mutante M-76, cuja superioridade foi confirmada em apenas três ensaios subsequentes. A queda abrupta em seus níveis de produção reforçou a hipótese de instabilidade devido a alguma causa genética. Mutantes resistentes ao selenato foram isolados e caracterizados com relação à tolerância ao cromato. A maioria dos mutantes de *Acromonium chrysogenum* apresentaram lesão no gene *sB* ou nos genes *sB* e *sC*. Somente 10% dos mutantes apresentou lesão apenas no gene *sC*. Todos os mutantes obtidos foram ensaiados quanto à produção de cefalosporina C e mostraram-se idênticos à linhagem C-10. Tanto a linhagem C-10 quanto seus mutantes resistentes ao selenato têm sua resistência à droga reduzida quando D,L-metionina é adicionada ao meio de cultura e são capazes de crescer em meio desprovido de qualquer fonte intencional de enxofre, mesmo após quatro etapas de inóculo. Esta última característica impediu o isolamento de revertentes dos mutantes *sC*⁻ e a complementação da marca através da transformação heteróloga com o gene *sC* de *Aspergillus nidulans*, contido no plasmídeo pANDY 1. Mutantes resistentes ao benomil foram isolados e caracterizados. Os induzidos apresentaram frequência 26 vezes maior que os espontâneos. Eles exibiram dois níveis distintos de resistência, sugerindo a ocorrência de mais de um gene que confere resistência a esta droga. A linhagem C-10 teve seu crescimento totalmente inibido por 20 µg/ml de higromicina B e, comparando-se com os dados disponíveis na literatura, ela pode ser considerada super-sensível à droga. Os mutantes resistentes induzidos dela isolados apresentaram frequência 115 vezes maior do que os espontâneos. Assim como ocorreu com a C-10, seus mutantes também mostraram-se mais sensíveis à higromicina B do que os mutantes de outras linhagens de *A. chrysogenum*. A protoplastização da linhagem C-10 mostrou que a quantidade de micélio presente nas amostras tratadas com Novozym 234 é relativamente pequena (média de 0,94%) e o número de protoplastos produzidos é grande (de 1,0 a 4,0 x 10⁹/g de micélio). Apesar disso, a viabilidade obtida pode ser considerada baixa (média de 1,44%). O estabilizador osmótico que se revelou mais apropriado para os testes foi a sacarose a 10,3%. Finalmente, também foi objetivo do presente trabalho transformar a linhagem C-10 com o gene *tub-2* de *N. crassa* (plasmídeo pBT6) e com o gene *hph* de *E. coli* (plasmídeo pAN7-1). Porém, com as técnicas aqui empregadas, não foi possível isolar transformantes em nenhum dos dois casos.

8: SUMMARY

The first aim of the present work was to improve cephalosporin C titre of *Acremonium chrysogenum* strain C-10 in shake - flasks condition in order to reach between 10 and 16 g/l, levels that have been found by other authors. Attempts were carried out but the antibiotic titre stayed at the same level, about 2 g/l. Two procedures were used in order to improve cephalosporin C titre in strain C-10: mutation and selection based on antibacterial activities, and isolation of morphological mutants that form smaller, compact colonies on a chemically defined medium. None improved mutant was isolated when the first procedure was employed. However, one morphological mutant (M-76) showed a higher level of cephalosporin C production. After three fermentation cycles, the M-76 titre decreased abruptly showing that this phenomenon is probably related to genetics factors. Selenate resistant mutants were isolated and their levels of resistance to the drug was studied. They were also investigated about being chromate sensible or chromate resistant. Only ten percent of the selenate resistant mutants was chromate sensible and therefore showed lesions in the gene *sC* encoding sulphate adenylyltransferase. The chromate resistant mutants have lost their sulphate permease and/or sulphate adenylyltransferase activities due to lesions in gene *sC*, or both *sC* and *sB*. All the isolated mutants have their cephalosporin C titre tested but none of them had its titre improved. The selenate resistant mutants and the strain C-10 showed a decrease in their resistance levels when methionine was added to the medium. They also were able to grow in liquid medium without any intentional source of sulphur, even after four inoculation steps. So, it was impossible to isolate revertents for *sC*⁻ mutation and to complement this mark through a heterologous transformation using the gene *sC* from *Aspergillus nidulans* (plasmid pANDY-1). Benomyl resistant mutants were also isolated. Those obtained by UV treatment showed frequencies 26 times higher than the spontaneous one. They exhibit two different levels of resistance, suggesting the occurrence of more than one gene responsible for benomyl resistance. Strain C-10 can be considered super-sensitive to hygromycin B because its growth was completely inhibited by 20 µg/ml of the antibiotic. The resistant mutants isolated after being induced by UV light showed a frequency 115 times higher than the spontaneous one. Like it was observed to C-10, the resistant mutants also were more sensitive to hygromycin B than mutants isolated from other strains of *Acremonium chrysogenum*. During the protoplastization tests, it was observed that samples treated with Novozym 234 contained few micelium fragments (average of 0,94%) and a high number of protoplasts (between 1,0 and 4,0 x 10⁹/g of micelium). The best osmotic stabilizer was sucrose 10,3%. Finally, attempts to transform protoplasts of strain C-10 using the gene *tub-2* from *Neurospora crassa* or the gene *hph* from *E. coli* have failed. Neither benomyl nor hygromycin B resistant mutants were isolated from the selective media.

9: BIBLIOGRAFIA

- ANNÉ, J.; EYSSSEN, H. and DE SOMER, P. Somatic hybridization of *Penicillium roquefortii* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature* (London), 262: 719-721, 1976
- ANNÉ, J. and PEBERDY, J.F. Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylenoglicol solutions. *Arch. Microbiol.*, 105: 201-205, 1975
- ANNÉ, J. and PEBERDY, J.F. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylenoglicol. *J. Gen. Microbiol.*, 92: 413-417, 1976
- ARAMORI, I.; FUKAGAWA, M.; TSUMURA, M.; IWAMI, M.; YOKOTA, Y.; KOJO, H.; KOHSAKA, M.; UEDA, Y. and IMANAKA, H. Isolation of soil strains producing new cephalosporin acilases. *J. Ferm. Bioeng.*, 72: 227-231, 1991
- ARST, H.N. Genetic analysis of the first steps of sulphate metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Nature* (London), 219: 268-270, 1968
- BACHMANN, B. J. and BONNER, D. M. Protoplasts from *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 78: 550-556, 1959
- BALDWIN, J.E.; BIRD, J.W.; FIELD, R.A.; O'CALAGHAN, N. and SCHOFIELD, C.J. Isolation and parcial characterization of ACV synthetase from *Cephalosporium acremonium* and *Streptomyces clavuligerus*. *J. Antibiot.*, 18: 1055-1057, 1990
- BALL, C. Improvement of penicillin productivity in *Penicillium chrysogenum* by recombination. In: VANEK, Z.; HOSTALEK, Z. and CUDLIN, J., Eds Genetics of Industrial Microorganisms, Vol. II, Amsterdam, Elsevier Publishing Co., pp. 227-237, 1973
- BALL, C. and HAMLIN, P.F. The genetics of *Acremonium chrysogenum*. *Rev. Bras. Genet.*, 83-96, 1978
- BAYER, T.; HEROLD, T.; HIDDESEN, R. and SCHÜGERL, K. Investigations of cephalosporin C production in an airlift tower loop reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 26-33, 1989
- BINDING, H. The isolation, regeneration and fusion of *Phycomyces* protoplasts. *Mol. Gen. Genet.*, 135: 273-276, 1974
- BONATELLI Jr., R. and AZEVEDO, J.L. Instabilidade em *A. niger*. *Relatório Científico do Instituto de Genética/ESALQ-USP*, 8: 47-49, 1974.

- BONATELLI Jr., R.; AZEVEDO, J.L. and VALENT, G.U. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Rev. Bras. Genet.*, 6: 399-405, 1983.
- BORCK, K. and BRAYMER, H. D. The genetic analysis of resistance to benomil in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.*, 85: 51-56, 1974
- BOS, C.J. and SLAKHORST, S.M. Isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans* conidiophores. *Can. J. Microbiol.*, 27: 408-416, 1981
- BOUCOURT, R. Synthetic or hemisynthetic pathways? An open question for the routes to cephalosporins of the new generation. In: GREGORY, G.I. (Ed.). Recent Advances in the Chemistry of β -Lactam Antibiotics. The Royal Society of Chemistry. London, 1981
- BRADSHAW, R.E.; KANG-UP, L. and PEBERDY, J.F. Aspects of genetic interaction in hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 3525-3533, 1983
- BROWN, A.G. and ROBERTS, S.M. (Eds.). Recent Advances in the Chemistry of β -Lactam antibiotics. The Royal Society of Chemistry. London, p. iii-iv, 1985
- BROWN, J.P. Susceptibility of the cell walls of some yeasts to lysis by enzymes of *Helix pomatia*. *Can. J. Microbiol.*, 17: 205-208, 1971
- BUXTON, F.P.; GWYNNE, D.I. and DAVIES, R.W. Cloning of a new bidirectionally selectable marker for *Aspergillus* strains. *Gene*, 84: 329-334, 1989
- BYWOOD, R.; ROBINSON, C.; STABLES, H.C.; WALKER, D. and WILSON, E.M. Extractive esterification of naturally occurring cephalosporins. In: ELKS, J. (Ed.). Recent Advances in the Chemistry of β -Lactams Antibiotics. The Chemical Society, London, 1977
- CARR, L. G.; SKATRUD, P.L.; SCHEETZ III, M.E.; QUEENER, S.W. and INGOLIA, T.D. Cloning and expression of the isopenicillin N synthetase gene from *Penicillium chrysogenum*. *Gene*, 48: 257-266, 1986
- CATÁLOGO PANLABS INCORPORATED. Fermentation Services Division, Bothel, WA, 1989
- CHANG, L.T. and ELANDER, R. P. Rational selection for improved cephalosporin C productivity in strains of *Acremonium chrysogenum* Gams *Dev. Ind. Microbiol.*, 20: 367-379, 1979

- CHAPMAN, J.L.; SKATRUD, P.L.; INGOLLA, T.D.; SAMSON, S.M.; KASTER, K.R. and QUEENER, S.W. Recombinant DNA studies in *Cephalosporium acremonium*. *Dev. Ind. Microbiol.*, 27: 165-174, 1987
- CONSTABEL, F. and KAO, K.N. Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethylenoglicol. *Can. J. Bot.*, 52: 1603-1606, 1974
- CRUEGER, W. and CRUEGER, A. Biotechnology - A Textbook of Industrial Microbiology. Sinauer Associates Sunderland, MA, p. 38, 180, 206-209, 1984
- CULLEN, D. and BERKA, R.M. Molecular genetics of commercially important filamentous fungi. *Chimicaoggi*, 1-2: 57-59, 1987
- 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. Reading, MA, 1983
- DEUTCH, C.E. and PARRY, J.M. Sphaeroplasts formation in yeast during the transition from exponential phase to stationary phase. *J. Gen. Microbiol.*, 80: 259-268, 1974
- De VRIES, O. M. H. and WESSELS, J. G. H. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by combined action of purified alfa-1,3-glucanase and chitinase derived from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Microbiol.*, 76: 319-330, 1973
- DIATEWA, M.; VIARD, I. and STAHL, A.J.C. Yeast protoplasts gained with various preparationns of *Helix pomatia* digestive juice. *Biochimie*, 63: 1982
- DÍEZ, B.; ALVAREZ, E.; CANTORAL, J.M.; BARREDO, J.L. and MARTÍN, J.F. Selection and characterization of *pyr* G mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase and complemantation by the *pyr* 4 gene of *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.*, 12: 277-282, 1987
- DÍEZ, B.; BARREDO, J.L.; ALVAREZ, E.; CANTORAL, J.M.; VAN SOLINGEN, P., GROENEN, M.A.M.; VEENSTRA, A.E. and MARTÍN, J.F. Two genes envolved in penicillin biosynthesis are linked in a 5.1 kb *Sal* I fragment in the genome of *Penicillium chrysogenum*. *Mol. Gen. Genet.*, 218: 572-576, 1989
- DÍEZ, B.; GUTIÉRREZ, S.; BARREDO, J.L.; VAN SOLINGEN, P.; VAN DER VOORT, L.H.M. and MARTÍN, J.F. The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcb C* and *pen AB* genes encoding the α -aminoadipylcysteinyl-valine synthetase and linkage to the *pcb C* and *pen DE* genes. *J. Biol. Chem.*, 265: 16358-16365, 1990

- DOOLJEWAAARD, A.M.P.; SIESTMA, J.H. and WOUTERS, J.T.M. Formation and regeneration of *Geotrichum candidum* protoplasts. *J. Gen. Microbiol.*, 74: 205-209, 1973
- DREW, S.W. and DAMAIN, A.L. 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
- EDDY, A.A. and WILLIAMSON, D.H. A method of isolating protoplasts from yeasts. *Nature (London)*, 119: 1252-1253, 1957
- EDDY, A.A. and WILLIAMSON, D.H. Formation of aberrant cell walls and of spores by the growing yeast protoplast. *Nature (London)*, 183: 1101-1104, 1959
- ELANDER, R.P. Genetic aspects of cephalosporin⁻ and cephamycin⁻ producing microorganisms. *Dev. Ind. Microbiol.*, 16: 356-373, 1975
- EMERSON, S. and EMERSON, M.R. Production, reproduction and reversion of protoplasts - like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 44: 668-671, 1958
- FAWCETT, P.A.; LODER, P.B.; DUNCAN, M.J.; BEESLEY, T.J. and ABRAHAM, E.P. Formation and properties of protoplasts from antibiotic - producing strains of *Cephalosporium acremonium*. *J. Gen. Microbiol.*, 79: 293-309, 1973
- FERENCZY, L.; KEVEL, F. and SZEGEDI, M. High-frequency fusion of fungal protoplasts. *Experientia*, 31: 1028-1030, 1975
- FERENCZY, L.; KEVEL, F. and ZSOLT, J. Fusion of fungal protoplasts. *Nature (London)*, 238; 793-794, 1974
- FERREIRA, A.V.B. Transformação genética de *Aspergillus niger* com um gene heterólogo de resistência ao benomil. Campinas, 120 pp., Tese de Mestrado - UNICAMP, 1991
- FINKELMAN, M.A.J.; ZAJIC, J.E. and VARDANIS, A. New method of producing protoplasts of *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 923-925, 1980

- FOURY, F. and GOFFEAU, A. Combination of 2-deoxyglucose and snail-gut enzyme treatments for preparing sphaeroplasts of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Microbiol.*, 75: 227-229, 1973
- FUJISAWA, Y. and KANZAKI, T. Role of acetyl-CoA: deacetylcephalosporin C acetyl transferase in cephalosporin C biosynthesis by *Cephalosporium acremonium*. *Agric. Biol. Chem.*, 39: 2043-2048, 1975
- FUJISAWA, Y.; KITANO, K. and KANZAKI, T. Accumulation of deacetoxycephalosporin C by a deacetylcephalosporin C negative mutant of *Cephalosporium acremonium*. *Agric. Biol. Chem.*, 39: 2049-2055, 1975
- GENTHNER, F.J. and BORGIA, P.T. Sphaeroplasts fusion and heterokaryon in *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.*, 134: 349-352, 1978
- GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W. and MURAD, F. (Eds.) Goodman and Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th Edition. MacMillan Publishing Co., New York, p. 1137-1145, 1985
- GONZALES, A.; JIMENEZ, A.; VASQUEZ, D.; DAVIES, J.E. and SCHINDLER, D. Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta*, 521: 459-469, 1978
- GRITZ, L. and DAVIES, J. Plasmid encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 25: 179-188, 1983
- GUTIÉRREZ, S.; DÍEZ, B.; ALVAREZ, E.; BARREDO, J.L. and MARTÍN, J.F. Expression of *pen DE* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding isopenicillin N acyltransferase in *Cephalosporium acremonium*: production of benzylpenicillin by the transformants. *Mol. Gen. Genet.*, 225: 56-64, 1991a
- GUTIÉRREZ, S.; DÍEZ, B.; MONTENEGRO, E. and MARTÍN, J.F. Characterization of a *Cephalosporium acremonium pcb AB* gene encoding alfa-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the *pcb C* gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. *J. Bacteriol.*, 173: 2354-2365, 1991b
- GUTIÉRREZ, S.; VELASCO, J.; FERNANDEZ, F.J. and MARTÍN, J. F. The *cef G* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cef EF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine-O-acetyltransferase. *J. Bacteriol.*, 174: 3056-3064, 1992

- HAAS, F.L.; PUGLISI, T.A.; MOSES, A.J. and LEIN, J. Heterokaryosis as a cause of culture rundown in *Penicillium*. *Appl. Microbiol.*, 4: 187-195, 1956
- HAMILL, R.L. and CRANDALL, L.W. Cephalosporin antibiotics. *In*: WEINSTEIN, M.J. and WAGMAN, G.H. (Eds.). *Antibiotics - Isolation, Separation and Purification*, Elsevier, Amsterdam, 1978
- HAMLYN, P.F.; BIRKETT, J.A.; PEREZ, G. and PEBERDY, J.F. Protoplast fusion as a tool for genetic analysis in *Cephalosporium acremonium*. *J. Gen. Microbiol.*, 131: 2813-2823, 1985
- HAMLYN, P.F.; BRADSHAW, R.E.; MELLON, F.M.; SANTIAGO, C.M.; WILSON, J.M. and PEBERDY, J.F. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 3: 321-325, 1981
- HASTIE, A.C. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, (London), 226: 77, 1970
- HASTIE, A.C. and GEORGOPOULOS, S.G. Mutational resistance to fungitoxic benzimidazole derivatives in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 67: 371-373, 1971
- HEIM, J.; SHEN, Y.Q.; WOLFE, S. and DAMAIN, A.L. Regulation of isopenicillin N synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase by carbon source during the fermentation of *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 232-236, 1984
- HEROLD, T.; BAYER, T. and SCHÜGERL, K. Cephalosporin C production in a stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 168-173, 1988
- HERSBACH, G.J.M.; VAN DER BEEK, C.P. and VAN DIJCK, W.M. The penicillins: properties, biosynthesis, and fermentation. *In*: VANDAMME, E.J. (Ed.). *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, Marcel Dekker, New York, 1984
- HOSKINS, J.A.; O'CALLAGHAN, N.; QUEENER, S.W.; CANTWELL, C.A.; WOOD, J.S.; CHEN, V.J. and SKATRUD, P.L. Gene disruption of the *pcb AB* gene encoding ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*. *Curr. Genet.*, 18: 523-530, 1990
- HOUSSET, P.; NAGY, M. and SCHWENCKE, J. Protoplasts of *Schizosaccharomyces pombe*: an improved method for their preparation and the study of their guanine uptake. *J. Gen. Microbiol.*, 90: 260-264, 1975

- ISOGAI, T.; FUKAGAWA, M.; ARAMORI, I.; IWAMI, M.; KOJO, H.; ONO, T.; UEDA, Y.; KOHSAKA, M. and IMANAKA, H. Construction of a 7-aminocephalosporanic (7-ACA) biosynthetic operon and direct production of 7-ACA in *Acremonium chrysogenum*. *Biotechnology*, 9: 188-191, 1991b
- ISOGAI, T.; FUKAGAWA, M.; KOJO, H.; KOHSAKA, M.; AOKI, H. and IMANAKA, H. Cloning and nucleotide sequences of the complementary and genomic DNAs for the alkaline protease from *Acremonium chrysogenum*. *Agric. Biol. Chem.*, 55: 471-477, 1991a
- KAPPAS, A.; GEORGOPOULOS, S.G. and HASTIE, A.C. On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploid *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 26: 17-27, 1974
- KASTER, K.R.; BURGETT, S.G. and INGOLIA, T.D. Hygromycin B resistance as dominant selectable marker in yeast. *Curr. Genet.*, 8: 353-358, 1984
- KASTER, K.R.; BURGETT, S.G.; RAO, R.N. and INGOLIA, T.D. Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and by DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.*, 11: 6895-6911, 1983.
- KELLY, B.K.; MILLER, G.A. and CODNER, R.C. Production of cephalosporin C. U.S. Patent 3.082.155 de 19.03.1963, propiedad de National Research Development Corporation, London
- KENNEDY, J.H. High performance liquid chromatographic analysis of fermentation broths: cephalosporin C and tylosin. *J. Chromat. Sci.*, 16: 492-495, 1978
- KHANG, Y. H.; SHANKAR, H. and SENATORE, F. Comparison of free and immobilized *Cephalosporium acremonium* for β -lactam antibiotic production. *Biotechnology Letters*, 10 (10): 719-724, 1988
- KIMURA, H.; SUMINO, Y. and SUZUKI, M. Cloning and sequencing of the putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Cephalosporium acremonium* and its application to heterologous gene expression. *J. Ferm. Bioeng.*, 71: 145-150, 1991
- KOMATSU, K.I.; MIZUNO, M. and KODAIRA, R. Effect of methionine on cephalosporin C and penicillin N production by a mutant of *Acremonium chrysogenum*. *J. Antibiot.*, 28: 881-888, 1975
- KONING, J.J. et al. One-step, high-yield conversion of penicillin sulfoxides to deacetoxy-cephalosporins. *J. Org. Chem.*, 40: 1346-1347, 1975

- KÜCK, U.; WALZ, M.; MOHR, G. and MRACEK, M. The 5'-sequence of the isopenicillin N synthetase gene (*pcb C*) from *Cephalosporium acremonium* directs the expression of the prokaryotic hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*) in *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 358-365, 1989

- KÜENZI, M.T. Process design and control in antibiotic fermentation. *In*: HÜTTER, R. et al. (Eds.). *Antibiotics and Other Secondary Metabolites*. Academic Press, London, 1978

- LEIN, J. Strain development with non-recombinant DNA techniques. *ASM News*, 49: 576-579, 1983

- LIERSCH, M.; NÜESCH, J. and TREICHLER, H.J. Final steps in the biosynthesis of cephalosporin C. *In*: MACDONALD, K. (Ed.). *Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms*. Academic Press, London, p. 179-198, 1976

- LOPEZ-BELMONTE, F.; ACHA, I.G. and VILLANUEVA, J.R. Observations on the protoplasts of *Fusarium culmorum* and on their fusion. *J. Gen. Microbiol.*, 45: 127-134, 1966

- LÜBBE, C.; SHEN, Y.Q. and DEMAÏN, A.L. A simple and rapid chemical method for the determination of cephalosporins. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 12: 31-35, 1986

- MacCABE, A.P.; RIACH, M.B.R.; UNKLES, S.E. and KINGHORN, J.R. The *Aspergillus nidulans npe A* locus consists of three contiguous genes required for penicillin biosynthesis. *EMBO J.*, 9: 279-297, 1990

- MacDONALD, K.D. Degeneration of penicillin titre in cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Nature (London)*, 218: 371-372, 1968

- MALPARTIDA, F.; ZALACAIN, M.; JIMENEZ, A. and DAVIES, J. Molecular cloning and expression in *Streptomyces lividans* of a hygromycin B phosphotransferase gene from *Streptomyces hygroscopicus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 117: 6-12, 1983

- MARTÍN, J.F. Manipulation of gene expression in the development of antibiotic production. *In*: HÜTTER, R. et al., (Eds.). *Antibiotics and Other Secondary Metabolites*. Academic Press, London, 1978

- MARTINEZ-ROSSI, N.M. and AZEVEDO, J.L. Characterization of benomil resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Rev. Bras. Genet.*, 12: 477-484, 1989

- MATHISON, L.; SOLIDAY, C.; STEPAN, T.; ALDRICH, T. and RAMBOSEK, J. Cloning, characterization, and use in strain improvement of the *Cephalosporium acremonium* gene *cefG* encoding acetyl transferase. *Curr. Genet.*, 23: 33-41, 1993
- MATSUDA, A.; SUGIURA, H.; MATSUYAMA, K.; MATSUMOTO, H.; ICHIKAWA, S. and KOMATSU, K. Molecular cloning of acetyl coenzyme A: deacetylcephalosporin C O-acetyltransferase cDNA from *Acremonium chrysogenum*: sequence and expression of catalytic activity in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 182: 995-1001, 1992a
- MATSUDA, A.; SUGIURA, H.; MATSUYAMA, K.; MATSUMOTO, H.; ISHIKAWA, S. and KOMATSU, K. Cloning and disruption of the *cef G* gene encoding acetyl coenzyme A: deacetylcephalosporin C O-acetyltransferase from *Acremonium chrysogenum*. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 186: 40-46, 1992b
- MATSUMURA, M.; IMANAKA, T.; YOSHIDA, T. and TAGUSHI, H. Morphological differentiation in relation to cephalosporin C synthesis by *Cephalosrium acremonium*. *J. Ferment. Technol.*, 58 (3): 197-204, 1980
- MILLER, J.H. Experiments in molecular biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972
- MILLES, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31 (3): 426-428, 1959
- MINUTH, W. and ESSER, K. Intraspecific, interspecific, and intergeneric recombination in β -lactam producing fungi via protoplast fusion. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18: 38-46, 1983
- MORRIS, N.R. Preparation of large molecular weight from the fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 106: 387-389, 1978
- MORRIS, N.R. The Molecular genetics of microtubule proteins in fungi. *Exp. Mycol.*, 10: 77-82, 1986
- MOSS, M.O. Morfology and physiology of *Penicillium* and *Acremonium*. In: PEBERDY, J.F. (Ed.). *Penicillium and Acremonium*. Biotechnology Hand-books, Vol. 1, Plenum Press, NY, 1987
- MUSÍLKOVÁ, M. and FENCL, Z. Some factors affecting the formation of protoplasts in *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.*, 13: 235-239, 1968

- MUSÍLKOVÁ, M.; FENCL, Z. and SEICHERTOVA, O. Release of *Aspergillus niger* protoplasts by *Penicillium purpurogenum* enzymes. *Folia Microbiol.*, 14: 47-50, 1969
- NASH, C.H. and HUBER, F.M. Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Microbiol.*, 22: 6-10, 1971
- NASH, C.H. and RAJANIKANT, J.M. and BALL, C. *Cephalosporium acremonium*: A β -lactam antibiotic - producing microbe. In: DEMAIN, A.L. and SOLOMON, A.N., *Biology of Industrial Microorganisms*, The Benjamin Publishing Company Inc., Menlo Park, CA, 1985
- NEWALL, C.E. The synthesis and biological properties of recent cephalosporins. In: BROWN, A.G. and ROBERTS, S.M. (Eds.). *Recent Advances in the Chemistry of β -Lactam Antibiotics*. The Royal Society of Chemistry, London, 1985
- NÜESCH, J.; TREICHLER, H.J. and LIERSCH, M. The biosynthesis of cephalosporin C. In: VANEK, Z.; HOSTALEK, Z. and CUDLIN, J. (Eds.). *Genetic of Industrial Microorganisms*. Amsterdam Elsevier Publishing Co., 1973
- ONIONS, A.H.S. and BRADY, B.L. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In: PEBERDY, J.F. (Ed.). *Penicillium and Acremonium*. Biotechnology Handbooks, Vol. 1, Plenum Press, NY, 1987
- ORBACH, M.J. et al. Cloning and characterization of the gene for β -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant marker. *Mol. Cell Biol.*, 6: 2452-2461, 1986
- PAN, C.H.; SPETH, S.V.; MCKILLIP, E. and NASH, C.H. Methyl oleate-based fermentation medium for cephalosporin C production. *Dev. Ind. Microbiol.* 23: 315-323, 1982
- PARTRIDGE, B.M. and DREWE, J.A. *Candida* protoplasts and their ultrastructure. *Sabouradia*, 12: 166-178, 1974
- PEBERDY, J. F. (Ed.) *Penicillium and Acremonium*. Biotechnology Handbook, Vol. I, Plenum Press, NY, 1987
- PEBERDY, J.F.; BUCKLEY, C.E.; DALTREY, D.C. and MOORE, P.M. Factor affecting protoplasts release in some filamentous fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 67: 23-26, 1976

- PEREZ-MARTINEZ, G. and PEBERDY, J.F. Production of cephalosporin C, and its intermediates, by raised-titre strains of *Acremonium chrysogenum*. *Enz. Microb. Technol.*, 7: 389-394, 1985
- PIMENTEL GOMES, F. Curso de Estatística Experimental. Livraria Nobel S.A., São Paulo, 430 p.
- PLATT, T.B. and FRAZIER, W.R. Method of producing cephalosporin C. U.S. Patent 3.129.388 de 30.06.64, propriedade de Olin Mathieson Chemical Corporation, New York
- PRÄVE, P.; FAUST, U.; SITTIG, W. and SUKATSCH, D.A. Fundamentals of biotechnology, VCH, Weinheim, p. 302, 528-533, 686-697, 1987
- PUNT, P.J.; OLIVER, R.P.; DINGEMANSE, M.A.; POUWELS, P.H. and VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, 56: 117-124, 1987
- QUEENER, S.W. and ELLIS, L.F. Differentiation of mutants of *Cephalosporium acremonium* in complex medium: the formation of unicellular arthrospores and their germination. *Can. J. Microbiol.*, 21: 1981-1996, 1975
- QUEENER, S.W.; INGOLIA, T.D.; SKATRUD, P.L.; CHAPMAN, J.L. and KASTER, K.R. A system for genetic transformation of *Cephalosporium acremonium*. In: LEIVE, L. (Ed.). Microbiology. ASM Publications, Washington, D.C., p. 468-472, 1985
- QUEENER, S.W.; WILKERSON, S.; TUNIN, D.R.; MCDERMOTT, J.R.; CHAPMAN, J.L.; NASH, C.; PLATT, C. and WESTPHELING, J. Cephalosporin C fermentation: biochemical and regulatory aspects of sulphur metabolism. In: VANDAMME, E.J. (Ed.), Biotechnology of Industrial Antibiotics, Vol. 22, Marcel Dekker Inc., NY, 1984
- RAMBOSEK, J. and LEACH, J. Recombinant DNA in filamentous fungi: progress and prospects. *CRC Critical Rev. Biotechnol.*, 6: 357-393, 1987
- RAMÓN, D.; CARRAMOLINO, L.; PATÑO, C.; SÁNCHEZ, F. and PAÑALVA, M.A. Cloning and characterization of the isopenicillin N synthetase gene mediating the formation of the β -lactam ring in *Aspergillus niger*. *Gene*, 57: 171-181, 1987
- RAMOS, F.R.; LÓPEZ-NIETO, M.J. and MARTÍN, J.F. Coordinate increase of isopenicillin N synthetase, isopenicillin N epimerase and deacetoxycephalosporin C synthetase in a high cephalosporin - producing mutant of *Acremonium chrysogenum* and simultaneous loss of the three enzymes in a non-producing mutant. *FEMS Microbiology Letters*, 35: 123-127, 1986

- RAMSDEN, M.; MCQUADE, B.A.; SAUNDERS, K.; TURNER, M.K. and HARFORD, S. Characterization of a loss-of-function mutation in the isopenicillin N synthetase gene of *Acremonium chrysogenum*. *Gene*, 85: 267-273, 1989
- REUSSER, F.; KOEPEL, H.J. and SAVAGE, G.M. Degeneration of *Streptomyces niveus* with repeated transfer. *Appl. Microbiol.*, 9: 342-345, 1961
- ROSCOE, J.T. Fundamental Research Statistics for Behavioral Sciences, 2nd Edition, Holt, Rinehart and Winston Inc., New York, 1975
- SAMSON, S.M.; BELAGAJE, R.; BLANKENSHIP, D.T.; CHAPMAN, J.L.; PERRY, D.; SKATRUD, P.L.; VANFRANK, R.M.; ABRAHAM, E.P.; BALDWIN, J.E.; QUEENER, S.W. and INGOLIA, T.D. Isolation, sequence determination and expression in *E. coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium*. *Nature*, 318: 191-194, 1985
- SAMSON, S.M.; DOTZLAF, J.E.; SLISZ, M.L.; BECKER, G.W.; VAN FRANK, R.M.; VEAL, L.E.; YEH, W-K; MILLER, J.R.; QUEENER, S.W. and INGOLIA, T.D. Cloning and expression of the fungal expandase/hygroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis. *Bio/technology*, 5: 1027-1214, 1987
- SAVIDGE, T.A. Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins. In: VANDAMME, E.J. (Ed.). Biotechnology of Industrial Antibiotics, Marcel Dekker, New York, 1984
- SEILER, J.P. Toxicology and genetic effects of benzimidazole compounds. *Mutation Research*, 32: 151-168, 1975
- SHAHIM, M.M. Preparation of protoplasts from stationary phase cells of *Schizosaccharomyces pombe*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 13: 714-719, 1971
- SHEIR-NEISS et al. Identification of a gene for alfa-tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 15: 639-647, 1978
- SHEN, Y.Q.; HEIM, J.; SOLOMON, N.A.; WOLFE, S. and DEMAINE, A.L. Repression of β -lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources. *J. Antibiot.*, 37: 503-511, 1984
- SHEN, Y.Q.; WOLFE, S. and DEMAINE, A.L. Levels of isopenicillin N synthetase in *Cephalosporium acremonium* producing high and low levels of cephalosporin C. *Bio/technology*, 4: 61-64, 1986

- SHIRAFUJI, H.; FUJISAWA, Y.; KIDA, M.; KANZAKI, T. and YONEDA, M. Accumulation of tripeptide derivatives by mutants of *Cephalosporium acremonium*. *Agric. Biol. Chem.*, 43: 155-160, 1979
- SIEGEL, S. Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento, McGraw Hill do Brasil, São Paulo, 1975
- SIESTMA, J.H. and BOER, W.R. Formation and regeneration of protoplasts from *Pythium* PRL 2142. *J. Gen. Microbiol.*, 74: 211-217, 1973
- SIMPSON, I.N. and CATEN, C.E. Induced quantitative variation for penicillin titre in clonal populations of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 110: 1-12, 1979
- SKATRUD, P.L. and QUEENER, S.W. An electrophoretic molecular karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium*. *Gene*, 79: 331-338, 1989
- SKATRUD, P.L.; QUEENER, S.W.; CARR, L.G. and FISHER, D.L. Efficient integrative transformation of *Cephalosporium acremonium*. *Curr. Genet.*, 12: 337-348 1987
- SKATRUD, P.L.; TIETZ, A.J.; INGOLIA, T.D.; CANTWELL, C.A.; FISHER, D.L.; CHAPMAN, J.L. and QUEENER, S. W. Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. *Biotechnology*, 7: 477-485, 1989
- SMITH, A. Cephalosporins. In: MOO-YOUNG, M. et al., (Eds.). *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, Pergamon Press, Oxford, 1985
- SMITH, D.J.; BURNHAM, M.K.R.; BULL, J.H.; HODGSON, J.E.; WARD, J.M.; BROWNE, P.; BROWN, J.; BARTON, B.; EARL, A.J. and TURNER, G. β -lactam antibiotic biosynthetic genes have been conserved in cluster in prokaryotes and eukaryotes. *The EMBO Journal*, 9: 741-747, 1990
- SMITH, A.W.; COLLIS, K.; RAMSDEN, M.; FOX, H.M. and PEBERDY, J.F. Chromosome rearrangements in improved cephalosporin C - producing strains of *Acetamonium chrysogenum*. *Curr. Genet.*, 19: 235-237, 1991
- SMITH, A.W.; RAMSDEN, M. and PEBERDY, J.F. Analysis of promoter activity by transformation of *Acetamonium chrysogenum*. *Gene*, 114: 211-216, 1992
- SMITH, B.; WARREN, S.C.; NEWTON, G.G.F. and ABRAHAM, E.P. Biosynthesis of penicillin N and cephalosporin C. *Biochem. J.*, 103: 877-890, 1967

- STEPHEN, E.R. and NASIM, A. Production of protoplasts in different yeasts by mutanase. *Can. J. Microbiol.*, 27: 550-553, 1981
- TREICHLER, H.J.; LIERSCH, M. and NÜESCH, J. Genetic and biochemistry of cephalosporin biosynthesis. *In: HÜTTER, R. et al. (Eds.), Antibiotics and Other Secondary Metabolites, FEMS Symposium 5, Academic Press, London, 1978*
- TRILLI, A.; MICHELINI, V.; MANTOVANI, V. and PIRT, S.J. Development of an agar disk method for the rapid selection of cephalosporin producers with improved yields. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, 13: 7-15, 1978
- TUYL, J.M.V. Genetic aspects of acquired resistance to benomyl and thiabendazole in a number of fungi. *Med. Fac. Landbowav Rijkswniv. Gent.*, 40: 661-697, 1975
- TUYL, J.M.Van. Ph.D. Thesis, Department of Phytopatology, Department of Genetics, Agriculture University, Wageningen, The Netherlands, 1977
- TUYL, J.M.V.; DAVIDSE, L.C. and DEKKER, J. Lack of cross resistance to benomyl and thiabendazole in some strains of *Aspergillus nidulans*. *Neth. J. Pl. Path.*, 80: 165-168, 1974
- UPSHALL, A. Naturally occurring diploid isolates of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 122: 7-10, 1981
- UPSHALL, A.; GIDDINGS, B. and MORTIMORE, I.D. The using of Benlate of distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. *J. Gen. Microbiol.*, 100: 413-418, 1977
- VIALTA, A. Genética e produção de amiloglicosidase em *Aspergillus awamori* e no híbrido interespecífico com *Aspergillus niger*. Campinas, 184 p., Tese de Mestrado, UNICAMP, 1987
- WALTON, R.B. Process for producing 7-aminocephalosporanic acid U.S.Patent 3.239.394 de 08.03.66, propriedade de Merck & Co.
- WALZ, M. and KÜCK, U. Polymorphic karyotypes in related *Acremonium* strains. *Curr. Genet.*, 19: 73-76, 1991
- WANG, D.I.C.; COONEY, C.L.; DEMAIN, A.L.; DUNNIL, P.; HUMPHREY, A.E. and LILLY, M.D. Fermentation and Enzyme Technology. John Wiley & Sons, New York, p. 29 e 40, 1979

- WHITE, E.R.; CARROL, A. and ZAREMBO, J.E. Reverse phase high speed liquid chromatography of antibiotics. *J. Antibiot.*, 30: 811-818, 1977
- WHITEHEAD, M.P.; GURR, S.J.; GRIEVE, C.; UNKLES, S.E.; SPENCE, D.; RAMSDEN, M. and KINGHORN, J.R. Homologous transformation of *Cephalosporium acremonium* with the nitrate reductase - encoding gene (*nia D*). *Gene*, 90: 193-198, 1990
- WILDFEWER, M.E. Approaches to cephalosporin C purification from fermentation broth. In: LEROITH, D. et al. (Eds.). Purification of Fermentation Products-Applications to Large-Scale Processes. American Chemistry Society, Washington D.C., 1985
- YAMAMURA, M.; THERANISHI, Y.; TANAKA, A. and FUKUI, S. Preparation of protoplasts of hydrocarbon-utilizing yeast cells and their respiratory activities. *Agric. Biol. Chem.*, 39: 13-20, 1975
- ZABRISKIE et al. Trader's Guide to Fermentation Media Formulation. Traders Protein/Buckeye Cellulose Corporation, Memphis, TN, p. 2, 3 e 6, 1980
- ZALACAIN, M.; GONZALEZ, A.; GUERRERO, M.C.; MATTALIANO, R.J.; MALPARTIDA, F. and JIMENEZ, A. Nucleotide sequence of hygromycin B phosphotransferase gene of *Streptomyces hygroscopicus*. *Nucl. Acids Res.*, 14: 1565-1581, 1986
- ZANCA, D.M. and MARTÍN, J.F. Carbon catabolite regulation of the conversion of penicillin N into cephalosporin C. *J. Antibiot.*, 36: 700-708, 1983
- ZHANG, J.; WOLFE, S. and DEMAIN, A.L. Methionine induction of ACV synthetase in *Cephalosporim acremonium*. *J. Ind. Microbiol.*, 2: 251-255, 1987
- ZHANG, J.; WOLFE, S. and 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.; WOLFE, S. and DEMAIN, A.L. Carbon source regulation of ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium* C-10. *Curr. Microbiol.*, 18: 361-367, 1989