

Determinação do pH e temperatura ótimos para a produtividade do ácido clavulânico utilizando o *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064

Determination of pH and temperature optimum on the productivity of clavulanic acid using *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064

Juliana Junqueira Pinelli¹

Sandra de Cássia Dias²

Resumo: O ácido clavulânico (AC) é um metabólito secundário produzido pela bactéria Gram-Positiva *Streptomyces clavuligerus*. É um composto de suma importância, principalmente para a indústria farmacêutica, pois possui ação antibacteriana. É utilizado em associação com outros antibióticos, como a amoxicilina. Sua produção ocorre por via fermentativa. O pH e a temperatura do meio são parâmetros relevantes que podem comprometer a produção deste metabólito. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da temperatura e do pH na produção de ácido clavulânico a partir de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. Para isso, um número mínimo de experimentos foi desenhado com diferentes valores de pH e temperatura utilizando o planejamento experimental estatístico, delineamento composto central rotacional, DCCR, tendo como variáveis pH e temperatura e como resposta a produtividade do ácido clavulânico. Amostras foram retiradas a cada 12 horas e a produção de ácido clavulânico determinada por método espectrofotométrico. O cultivo realizado em pH 6,7 e temperatura 27°C apresentou maior produtividade do ácido clavulânico.

Palavras-chave: Delineamento composto central rotacional. Antibiótico. Metodologia de superfície de resposta. Bioprocessos

Abstract: Clavulanic acid (CA) is a secondary metabolite produced by the Gram-Positive bacteria *Streptomyces clavuligerus*. It is a compound of great importance, mainly for the pharmaceutical industry, because it has antibacterial activity. It is used in combination with other antibiotics such as amoxicillin. Its production occurs by fermentation. The pH and temperature of the medium are relevant parameters that can compromise the production of this metabolite. The aim of this study was to evaluate the temperature and pH influence on the clavulanic acid productivity by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. For this, a minimum number of experiments were designed with different values of pH and temperature using statistical experimental design, central composite rotational design (CCRD) having as variables pH and temperature and as response the clavulanic acid productivity. Samples were collected every 12 hours and the clavulanic acid production was determined by spectrophotometric method. The cultivation carried out at pH 6.7 and temperature 27°C showed the highest clavulanic acid productivity.

¹ Mestranda em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, jujpinelli@gmail.com.

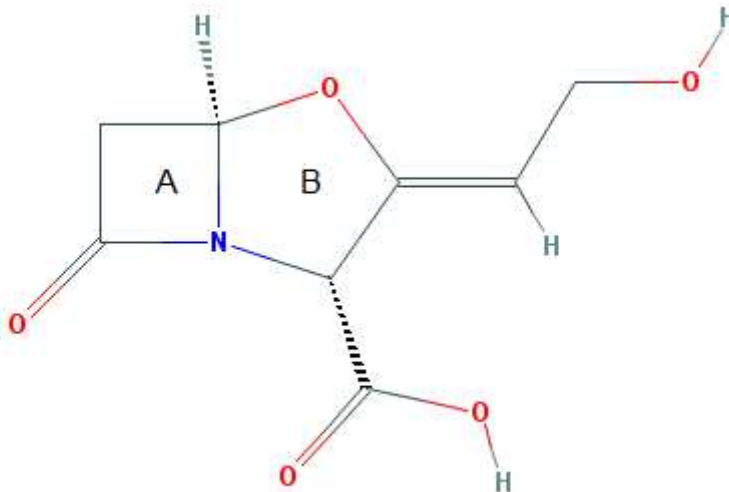
² Doutora em Biotecnologia, Universidade Federal de São João Del Rei Campus Alto Paraopeba, sandra@ufsj.edu.br

Keywords: Central composite rotatable design. Antibiótic. Response Surface Methodology. Bioprocess.

1 INTRODUÇÃO

O ácido clavulânico (AC) é um antibiótico de amplo espectro com atividade inibitória das β -lactamases; Enzimas produzidas por bactérias resistentes à ação dos antibióticos β -lactâmicos. A molécula do ácido clavulânico é formada por um anel β -lactâmico condensado a um anel oxazolidina (Fig. 1). O ácido clavulânico apresenta uma pequena atividade antibiótica, mas potente atividade inibitória das β -lactamases. Portanto, o ácido clavulânico comercializado é associado a amoxicilina (JENSEN, 2012).

Figura 1- Estrutura molecular do ácido clavulânico. A = anel oxazolidina, e B = anel β -lactâmico.



Fonte: Modificado de Pubchem (2017).

O ácido clavulânico é um metabólito secundário produzido pelo *Streptomyces clavuligerus*. O *S. clavuligerus* é uma bactéria Gram-Positiva, isolada a partir do solo, morfologicamente semelhante aos fungos filamentosos. Este micro-organismo é aeróbio estrito, cresce a temperatura ótima de 28 a 45°C, e não utiliza a glicose como fonte de carbono (SAUDAGAR et al., 2008). Temperatura de fermentação, pH do meio de cultivo, agitação, aeração, concentração do produto, fonte de carbono e outros componentes do meio de cultivo são parâmetros que influenciam a produção do ácido clavulânico e de outros antibióticos (PEREIRA e OLIVEIRA, 2016).

O ácido clavulânico pode ser produzido, a partir do *S. clavuligerus*, utilizando diferentes tipos de reatores e modos de fermentação: Lavarda et al. (2008) estudaram a

produção de ácido clavulânico utilizando biorreator tipo torre e células imobilizadas. Costa e Baldino (2015) avaliaram a produção de ácido clavulânico empregando a fermentação extrativa como alternativa para diminuir a degradação do ácido clavulânico e seu efeito inibitório sobre sua própria síntese. Saudagar e Singhal (2008) analisaram a influência de alguns nutrientes e a estratégia de alimentação na produção do ácido clavulânico. Costa e Baldino (2012) estudaram a produção de ácido clavulânico em batelada com e sem pulsos de glicerol em diferentes temperaturas. Chen et al. (2003) investigaram o efeito da adição de glicerol, arginina e ornitina, separadamente ou simultaneamente, na produção do AC. A manipulação genética também é utilizada para aumentar a síntese do ácido clavulânico (ZHIHAN e YANPING, 2006; SONG et al., 2010; QUIN et al., 2017). Entretanto, poucos estudos avaliaram a influência da temperatura e pH na produção do ácido clavulânico.

A temperatura interfere no metabolismo microbiano, na produção e estabilidade do composto de interesse. Micro-organismos psicrófilos apresentam temperatura ótima abaixo de 20°C; os mesófilos, como é o caso do *S. clavuligerus*, apresentam temperatura ótima entre 20 a 50°C; e os termófilos apresentam sua temperatura ótima acima de 50°C. Se o cultivo for realizado em uma temperatura superior a temperatura ótima de crescimento do micro-organismo, é provável que a velocidade de crescimento diminua e ocorra a morte térmica das células. Por outro lado, o emprego de temperatura inferior a temperatura ótima de crescimento do micro-organismo diminui a afinidade pelo substrato, limitando o crescimento celular e conseqüentemente a produção do produto (NEDWELL, 1999). A produção do ácido clavulânico, geralmente, utiliza temperaturas de 25 a 30°C (BAPTISTA-NETO et al., 2005; JIANG et al., 2004). Entretanto, temperaturas entre 28 a 30°C favorecem a degradação do AC. A velocidade de degradação do AC aumenta exponencialmente com o aumento da temperatura, seguindo o modelo da Equação de Arrhenius. Devido a susceptibilidade a hidrólise ácida e básica, o AC é estável em pH neutro. Os valores de pH mais utilizados para produção do AC estão entre 6,5 a 7,0, sendo 6,8 o pH mais utilizado (COSTA e BADINO, 2015).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da temperatura e pH na produção do AC pelo *S. clavuligerus*, utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

2 METODOLOGIA

2.1 Micro-organismo

Células vegetativas de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 armazenadas a -80°C foram descongeladas e transferidas para placas de Petri contendo meio de reativação (Tabela 1, Figura 2) acrescido de ágar 20 g.L⁻¹. As placas foram incubadas a 29 ± 1 °C, durante 7 dias sob condições aeróbicas.

2.2 Meio de Cultura

As Tabelas 1 e 2 apresentam a composição do meio de reativação, crescimento e produção, respectivamente (ROSA et al., 2005; TEODORO et al., 2006). O pH do meio de reativação foi ajustado para 6,8, enquanto o pH do meio de crescimento e produção foram ajustados de acordo com a Tabela 3. Os meios foram autoclavados a 121°C, durante 15 minutos.

Tabela 1- Composição química do meio de reativação.

Substância	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicerol	15,0
Peptona bacteriológica	10,0
Extrato de malte	10,0
Extrato de levedura	1,0
MOPS (3-[N-morfolino]propano-ácido sulfônico)	21,0
Solução de sais	1mL

Solução de sais: 0,75 g MgSO₄.7H₂O, 1 mg MnCl₂.4H₂O, 1 mg FeSO₄. 7H₂O, 1 mg ZnSO 4. 7H₂O, para 1 L de solução.

Fonte: Rosa et al. (2005).

Tabela 2 – Composição química do meio de crescimento e produção.

Substância	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicerol	15
Extrato de levedura	1,0
Proteína isolada de soja	20,0
MOPS	21
K ₂ HPO ₄	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,4
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4
Solução de sais	1mL

Solução de sais: 0,75 g MgSO₄.7H₂O, 1 mg MnCl₂.4H₂O, 1 mg FeSO₄. 7H₂O, 1 mg ZnSO 4. 7H₂O, para 1 L de solução.

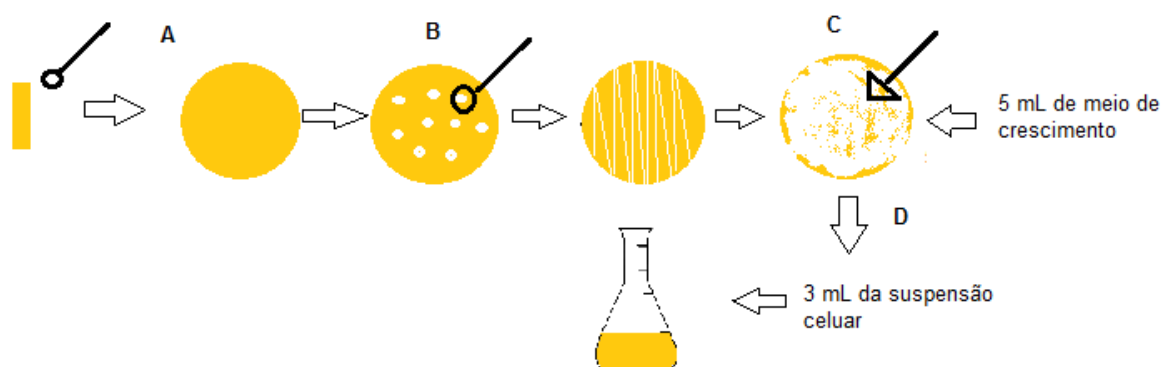
Fonte: Adaptado de Teodoro et al. (2006).

2.3 Preparo do inóculo

Uma colônia de *S. clavuligerus* foi retirada da placa de Petri, obtida conforme descrito no Item 2.1, e transferida para uma nova placa contendo meio sólido de reativação. Esta nova placa foi incubada a 29 ± 1 °C, durante 5 dias para formação de novas colônias. No quinto dia, 5 mL de meio de crescimento foram adicionados à placa contendo as colônias. A seguir, as colônias foram recuperadas com o auxílio de uma alça de Drigalski, originando uma suspensão celular 3 mg.L^{-1} de concentração celular. Três mililitros (3 mL) desta suspensão celular foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL contendo 22 mL do meio de crescimento (Tabela 2, Figura 2). Os frascos foram incubados a 29 °C, a 250 min^{-1} , durante 12 horas para obtenção do pré-inóculo.

Foram preparados 11 frascos erlenmeyers de inóculo, um para cada condição do planejamento experimental (Tabela 3). Três mL de pré-inóculo foram transferidos para frascos erlenmeyers contendo 22 mL do meio de produção (Tabela 2). O pH e a temperatura do inóculo seguiram o planejamento experimental (Tabela 3).

Figura 2- Preparo do pré-inóculo. **A-** Células vegetativas de *S. Clavuligerus* do criotubo transferidas do criotubo para uma placa de Petri contendo meio de reativação, utilizando uma alça de platina. A placa foi incubada a 29 °C durante 7 dias. **B-** Uma colônia foi retirada da placa de Petri e estriada em uma nova placa contendo o meio de reativação, a placa foi incubada, novamente, a 29 °C durante 5 dias. **C-** Após este tempo, todas as colônias foram removidas da placa de Petri com o auxílio de uma alça de Drigalski e adição de 5 mL do meio de crescimento. **D-** Três mL da suspensão celular foram retirados e transferidos para frasco erlenmeyer contendo 22 mL do meio de crescimento. Este frasco foi incubado a 29°C, 12 horas e 250 min^{-1} .



Fonte: Autores (2017)

2.4 Planejamento experimental

A produção do ácido clavulânico foi investigada utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR), com duas variáveis independentes, pH e temperatura, em 5 níveis diferentes (Tabela 3). Onze experimentos foram realizados utilizando o DCCR: fatorial $2^2 + 4$ experimentos nos pontos axiais e 3 experimentos no ponto central (repetição).

O programa *Statistical Stat software* 13 foi utilizado para realizar o tratamento estatístico dos dados.

2.5 Produção de ácido Clavulânico

A etapa de produção teve início transferindo 5 mL do inóculo para frascos erlenmeyers de 500 mL contendo 45 mL do meio de produção. Estes frascos foram agitados a 250 min^{-1} , durante 108 horas. O pH e a temperatura do meio de produção seguiram o planejamento experimental (Tabela 3). Para cada cultivo foi utilizado um frasco contendo 50 mL de meio de fermentação. As amostras foram retiradas em cabina de segurança biológica, e após cada retirada o frasco retornava para a incubadora.

Alíquotas de 2 mL foram retiradas a cada 12 horas dos cultivos durante 108 horas. Imediatamente após a retirada, as amostras foram centrifugadas a $12000 \times g$, 4°C durante 15 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado para dosagem de ácido clavulânico e glicerol.

2.6 Dosagem de ácido clavulânico

O ácido clavulânico foi quantificado utilizando o método espectrofotométrico proposto por BIRD et al. (1982). Brevemente, 2 ml de solução de imidazol (60 g L^{-1} pH 6,8) foram adicionados a $400 \mu\text{L}$ do sobrenadante. A mistura foi agitada e incubada a 30°C durante 15 minutos, em banho-maria. O produto da derivatização de AC com imidazol foi detectado a 311 nm utilizando o espectrofotômetro. A concentração de ácido clavulânico nas amostras foi determinada utilizando a curva padrão. A curva padrão foi construída utilizando o ácido clavulânico comercial (Amoxicilina + Clavulanato de potássio $500\text{mg} + 125 \text{ mg}$, EMS). A análise foi realizada em duplicada.

2.7 Dosagem de glicerol

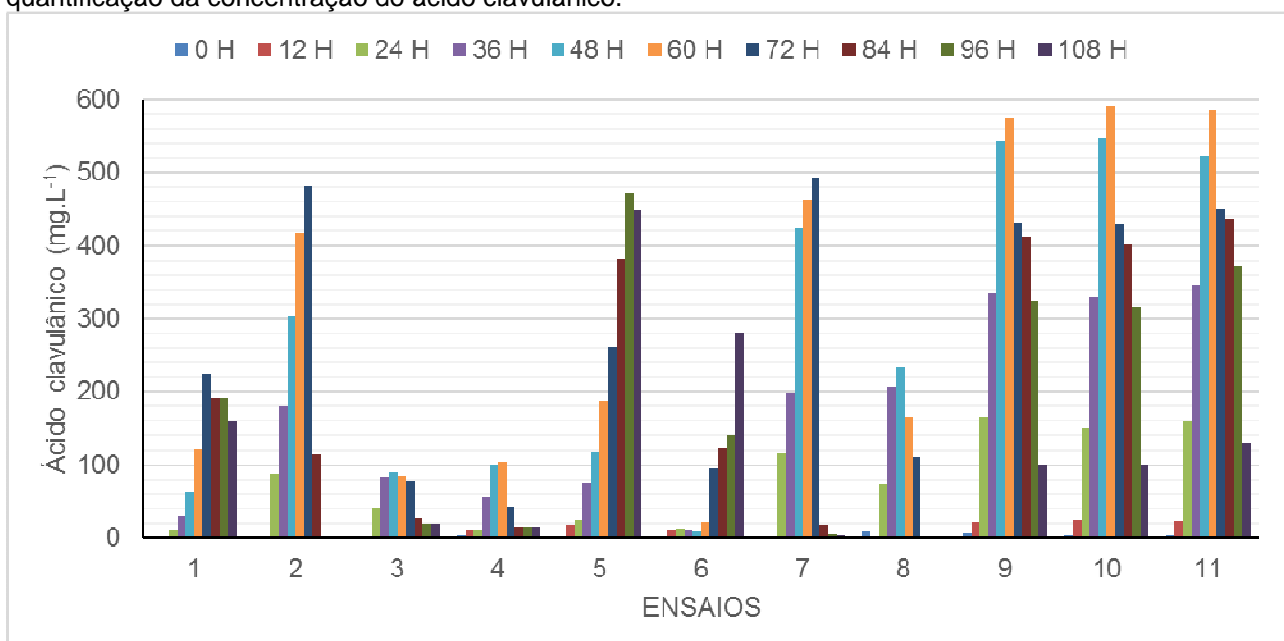
O consumo de glicerol foi determinado utilizando um Kit colorimétrico de GPO-PAP triglicérides (Doles), as amostras foram analisadas em duplicada. Em um tubo de ensaio foram adicionados 10 μL do reagente enzimático e 1,0 ml do sobrenadante. A seguir, a mistura foi agitada e incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos. Decorrido este período, a absorbância das amostras foi medida a 505 nm. Glicerol (Synth) foi utilizado para construir curva padrão. A concentração de glicerol nas amostras foi obtida a partir da curva padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Onze experimentos foram realizados utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR), fatorial $2^2 + 4$ experimentos nos pontos axiais e 3 experimentos no ponto central (repetição). As Figuras 3 e 4 apresentam a cinética de produção e a produtividade do AC, respectivamente.

O Figura 3 apresenta a produção de ácido clavulânico dos 11 ensaios durante o cultivo. A menor produção de AC, inferior a 100 mg.L^{-1} , foi detectada nos ensaios 3 (32°C e pH 6,4) e 4 (32°C e pH 6,9). Já a maior produção de AC foi observada nos ensaios 9,10 e 11 (27°C e pH 6,7) em 60 horas, aproximadamente 580 mg.L^{-1} .

Figura 3- Produção de ácido clavulânico determinada nos 11 ensaios do delineamento composto central rotacional variando a temperatura e pH. Os ensaios foram realizados de acordo com o planejamento experimental, DCCR. Amostras dos cultivos foram retiradas a cada 12 horas durante 108 horas para quantificação da concentração do ácido clavulânico.



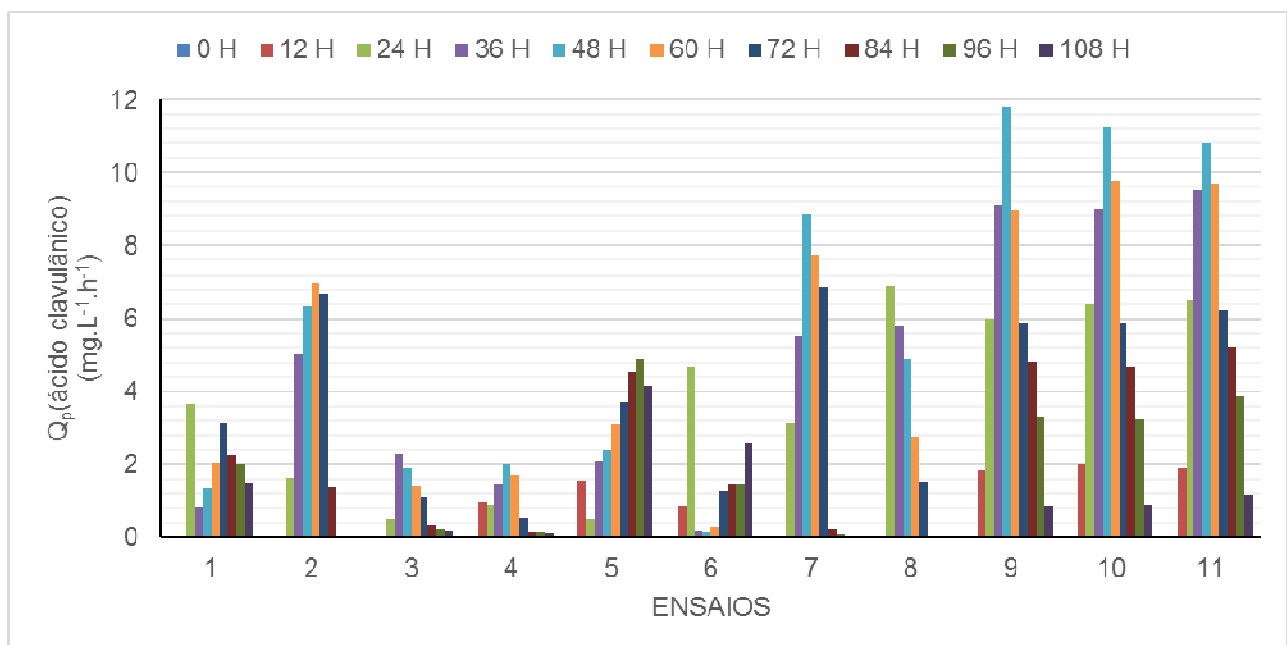
Fonte: Autores (2017)

A produtividade volumétrica é um parâmetro cinético que analisa a concentração de produto pelo tempo de fermentação. A produtividade volumétrica do ácido clavulânico (Q_p) foi calculada utilizando a Equação 1. Os resultados obtidos estão apresentados no Figura 4.

$$Q_p = \frac{\text{concentração do produto recuperado (mg.L}^{-1}\text{)}}{\text{tempo do processo (h)}} \quad (1)$$

A maior produtividade volumétrica do ácido clavulânico, $11 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, foi apresentada pelos ensaios 9, 10 e 11 (27°C e pH 6,7). Os ensaios 3 e 4 apresentaram a menor produtividade volumétrica, aproximadamente $2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Como estes ensaios apresentaram a menor produção do ácido clavulânico durante todo o cultivo, este resultado já era previsto.

Figura 4- Produtividade volumétrica do ácido clavulânico (Q_p) apresentada pelos 11 ensaios do delineamento composto central rotacional variando a temperatura e pH. Os ensaios foram realizados de acordo com o planejamento experimental, DCCR.



Fonte: Autores (2017)

A influência das variáveis independentes, temperatura e pH, sobre a variável dependente Q_{pAC} (produtividade volumétrica do ácido clavulânico $\text{mg.L}^{-1}.\text{H}^{-1}$) foi avaliada utilizando o DCCR (Tabela 3).

Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental DCCR. Valores das variáveis independentes temperatura (T) e pH (codificadas e reais) e respostas, produção AC (mg.L⁻¹) e produtividade do AC (Q_p mg.L⁻¹.h⁻¹) para cada ensaio realizado. A resposta utilizada foi obtida em 48 horas de cultivo.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Respostas	
	T (°C)	pH	T (°C)	pH	AC mg.L ⁻¹	Q _p mg.L ⁻¹ .h ⁻¹
1	-1	-1	22	6,4	62,85	1,31
2	-1	1	22	6,9	303,33	6,32
3	1	-1	32	6,4	90,00	1,88
4	1	1	32	6,9	99,70	2,00
5	-1,41	0	20	6,7	117,38	2,40
6	1,41	0	34	6,7	9,05	0,11
7	0	-1,41	27	6,3	424,17	8,84
8	0	1,41	27	7,0	233,93	4,88
9	0	0	27	6,7	543,81	11,82
10	0	0	27	6,7	546,19	11,26
11	0	0	27	6,7	523,33	10,82

Fonte: Autores (2017)

A Tabela 4 apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão e limites de confiança para a Q_{pAC} obtida em 48 horas. Estes dados foram utilizados para construir o modelo matemático de segunda ordem a partir das variáveis estudadas, Equação 2.

$$Q_p \text{ (mgL}^{-1}\text{H}^{-1}\text{)} = 11,30 - (T^2 \times 5,32) - (pH^2 \times 2,51) \quad (2)$$

Tabela 4- Resultados do coeficiente de regressão, erro padrão e limites de confiança no estudo do efeito da temperatura e pH na produtividade do ácido clavulânico.

Parâmetros	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Limite de confiança (-95%)	Limite de confiança (+95%)
Média*	11,30	1,086655	8,50667	14,0933
T (°C) (L)	-0,875	0,665437	-2,58413	0,83699
T (°C) (Q)*	-5,317	0,7920	-7,35348	-3,28152
pH (L)	-0,05879	0,665437	-1,76935	1,65178
pH (Q)*	-2,515	0,792029	-4,55098	0,47902
T (°C) x pH	-1,222	0,941071	-3,64160	1,1966

*parâmetros estatisticamente significativos. L= parâmetro linear e Q= parâmetro quadrático.

Fonte: Autores (2017)

A Tabela 5 apresenta os resultados da ANOVA para a resposta Q_{pAC}. A porcentagem de variância explicada 90,9 % é aceitável para experimentos biológicos (SHIVHARE e MCCREATH, 2010). O valor de F_{calculado}=10,02 é maior que o valor de

$F_{\text{tabelado}} = 5,05$, com 95% de confiança. Desta forma o modelo foi bem ajustado para esta variável, sendo estatisticamente significativo.

Tabela 5 – Análise de variância (ANOVA) no estudo do efeito das variáveis independentes (pH e temperatura) na produtividade do AC.

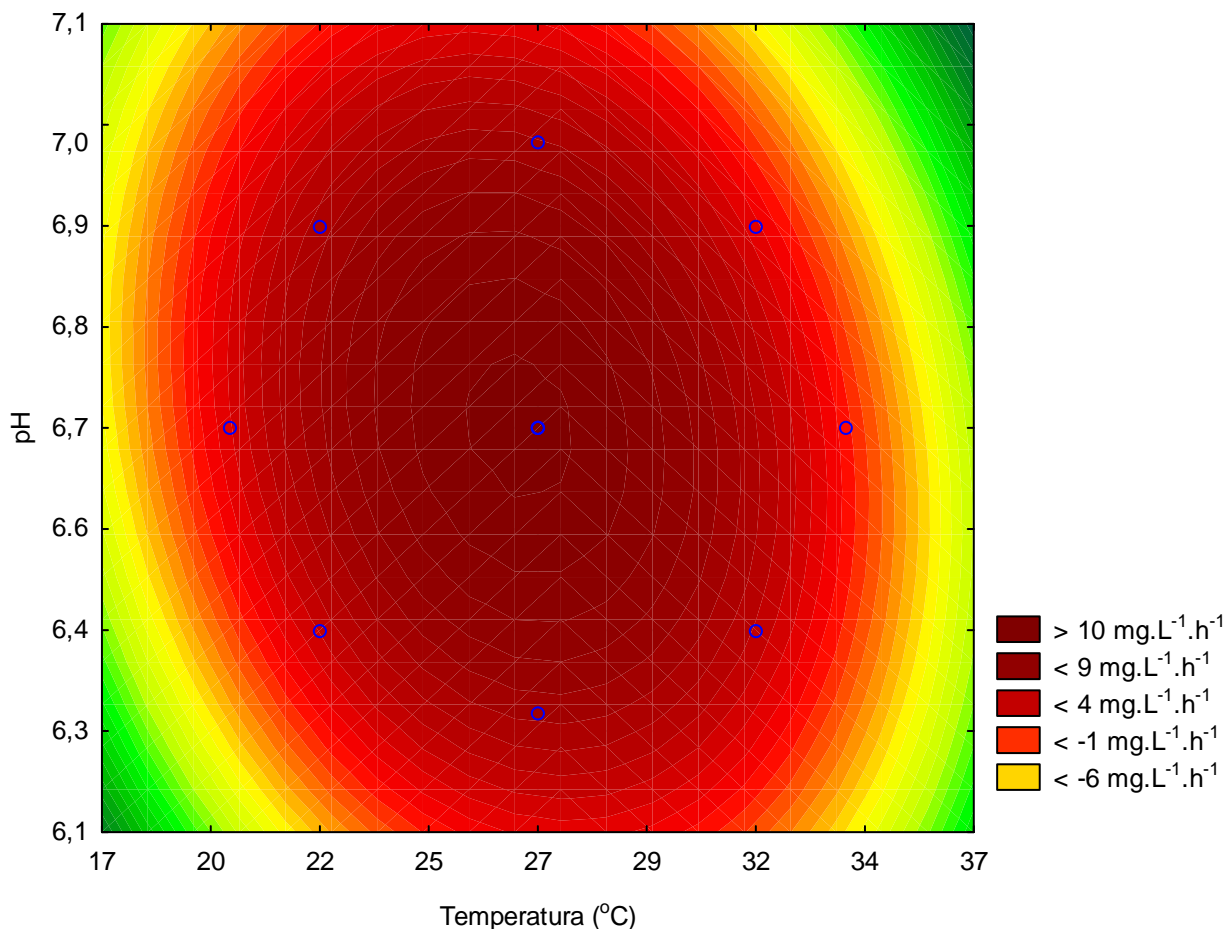
Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste $F_{\text{calculado}}$
Regressão	177,377	5	35,475	
Resíduos	17,7123	5	3,54	10,02
Total	195,089	10		

Coeficiente de determinação: $R^2:0,91$; $F_{\text{tab}}(0,95;5;5) = 5,05$ e $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}=1,98$.

Fonte: Autores (2017)

Considerando que o modelo quadrático foi validado para a variável produtividade, as superfícies de resposta foram geradas (Figura 5).

Figura 5 – Curva de contorno obtida no planejamento experimental DCCR para a produtividade do ácido clavulânico utilizando o *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 como resposta para a variação do pH e Temperatura



Fonte: Autores (2017)

A Figura 5 indica que a maior produtividade do ácido clavulânico é obtida no ponto central utilizando a temperatura de 27 °C e pH 6,7. A temperatura acima ou abaixo de 27 °C com o pH inferior ou superior a 6,7 provoca uma queda na produtividade do AC.

O tipo de fonte de carbono, suplementação com proteínas e/ou aminoácidos, adição de fosfato no meio de cultivo, pH, temperatura, velocidade de agitação e/ou aeração são variáveis importantes para a produção do ácido clavulânico. A maioria dos trabalhos descritos na literatura utilizaram pH 6,8 e temperatura de 28 °C para produção do ácido clavulânico a partir do *S. clavuligerus* (HENAO et al. 2012; NETO et al. 2005; BELLÃO et al. 2013). A produção do AC descrita na literatura é extremamente variável devido à diferença na composição do meio de cultivo, aeração, suplementação do cultivo, pH e temperatura de cultivo (SER et al. 2016).

O pH do meio de cultivo e a temperatura do processo fermentativo influenciam a atividade catalítica de enzimas envolvidas nas diferentes vias metabólicas do micro-organismo, favorecendo ou não a síntese do produto de interesse (BASU et al. 2015). Para produto extracelular, o pH e a temperatura interferem na estabilidade do produto durante o processo fermentativo. Segundo Bersanetti et al. (2005), o ácido clavulânico no meio de cultivo é mais estável em pH 6,0 que em pH 7,0. Este estudo foi conduzido em meio de cultivo durante 10 horas. O ácido clavulânico puro em solução aquosa é mais estável no pH de 6,5 a 7,0 (BERSANETTI et al. 2005).

Costa e Badino (2012) avaliaram a produção do ácido clavulânico a 30, 25 e 20 °C utilizaram o *S. clavuligerus* 27064. A composição do meio de cultivo foi semelhante ao descrito na Tabela 2 e o pH foi 6,8. As maiores produção e produtividade do AC, 1266,2 mg.L⁻¹ e 7,5 mg.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente, foram obtidas a 20°C. A produção e a produtividade do AC obtidas por Costa e Badino (2012), quando comparada a condição 5 (20°C, pH 6,7 em 96 horas) foi 268 e 150 % superior (472,5 mg.L⁻¹ e 4,95 mg.L⁻¹.h⁻¹). A produtividade das condições 9-11 (27°C e pH 6,7) foi 150% superior a obtida por Costa e Badino (2012), entretanto a produção foi 237% inferior. É interessante observar que as

condições de cultivo, composição do meio de fermentação, agitação e pH dos dois trabalhos foram semelhantes. Um fator que pode explicar os diferentes resultados obtidos é a concentração de inóculo. Na maioria dos trabalhos, devido à morfologia da bactéria, a quantidade de células utilizadas no inóculo não é determinada.

Viana et al. (2010) investigaram a influência do pH, temperatura, agitação, concentração do glicerol e da farinha de soja na produção do AC utilizando o *Streptomyces clavuligerus* DAUFPE 3060. Para esta cepa de *S. clavuligerus*, a temperatura e a concentração da farinha de soja exerceram maior influência na produção do AC. A maior produção do ácido clavulânico foi obtida a 48 horas, 150 rpm, 32 °C, pH 6,0, glicerol 5.0 g.L⁻¹ e farinha de soja 20 g.L⁻¹. Este resultado mostra que cada cepa de *S. clavuligerus* pode ter uma temperatura ótima para produção do ácido clavulânico.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A temperatura e pH ótimos para produção do AC a partir do *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 é 27 °C e 6,7, respectivamente. Na literatura existe vários estudos relacionados a composição do meio de cultivo e a produção do ácido clavulânico a partir do *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, entretanto este é o primeiro estudo que avaliou a influência da temperatura e pH simultaneamente na produção do ácido clavulânico.

A discrepância dos valores de produção e produtividade do ácido clavulânico utilizando condições de cultivo semelhantes e o mesmo micro-organismo podem ser explicadas pela ausência de padronização do número de células utilizadas como inóculo (Hiratta et al., 2005; Costa e Baldino., 2012; Bellão et al., 2013).

5 AGRADECIMENTOS

A UFSJ e FAPEMIG pela Bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

BAPTISTA-NETO, A.B.; HIRATA, D.B.; CASSIANO FILHO, L.C.M.; BELLÃO, C.; BADINO JÚNIOR, A.C.; HOKKA, C.O. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous processes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.22, p.557-563, 2005.

BASU, S.; BOSE, C.; OJHA, N.; DAS, N.; DAS, J.; PAL, M.; KHURANA, S. Evolution of bacterial and fungal growth media. **Bioinformation**, v. 11, n.4, p. 182-184, 2015.

BELLÃO, C.; ANTTÔNIO, T.; ARAÚJO, M. L. G. C.; BADINO, A.C. Production of clavulanic acid and chephamicin C by *Streptomyces clavuligerus* under different fed-batch conditions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, V. 30, N. 02, p. 257 - 266, 2013.

BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; ARAÚJO, ML. G. C.; HOKKA, O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 21-36, 2005.

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

CHEN, K-C.; LIN, Y-H.; WU, J-YII.; HWANG, SZ-C. J. Enhancement of clavulanic aci production in *Streptomyces clavuligerus* with ornithine feeding. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 1, p. 152-156, 2003.

COSTA, C. L. L.; BADINO, A. C. Overproduction of clavulanic acid by extractive fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 154-160, 2015.

COSTA, C. L.L.; BADINO, A. C. Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures without and with glycerol pulses under different temperature conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p.1-7, 2012.

HENAO, C.P.S.; GRIMALDOS, N.A.G.; DIAZ, J.C.Q. Production of clavulanic acid by fermentation of *Streptomyces clavuligerus*: evaluation of different culture media and mathematical modeling. **Dyna**, v.79, n.175, p.158-165, 2012.

JENSEN, S. E. Biosynthesis of clavam metabolites. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnolpgy**, v. 39, p.1407-1419, 2012.

JIANG, S.J.; YANG, Y.Y.; WANG, H.Q. Optimization of clavulanic acid fermentation. **Chinese Journal of Antibiotics**, v.29, p.335-338, 2004.

LAVARDA, S.C.S.; HOKKA, C. O.; ARAUJO, M. L. G.C. Clavulanic acid production processes in a tower bioreactor with immobilised cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.39, n.1, p. 131-136, 2008.

NEDWELL, D.B. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. **FEMS Microbiology ecology**, v. 30, p. 101-111, 1999.

NETO, A. B.; HIRATA, D. B.; CASSIANO FILHO, L. C. M.; BELLÃO C.; BADINO JÚNIOR, A. C.; HOKKA, C. O. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous processes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 04, p. 557 - 563, 2005.

PEREIRA, E. L.; OLIVEIRA, A. F. A. A produção de antibióticos por processos fermentativos aeróbios. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três corações, v.14, n.2, p. 1058-1078, 2016.

PubChem- Open Chemistry DataBase. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clavulanate#section=2D-Structure>> Acesso em: 13 novembro 2017.

QIN, R.; ZHONG, C.; ZONG, G.; FU, J.; CAO, G. Improvement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* F613-1 by using a *claR-neo* reporter strategy. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 41-46, 2017.

ROSA, J.C.; BAPTISTA NETO, A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 27, p. 99-104, 2005.

SAUDAGAR, P. S.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Clavulanic acid: A review. **Biotechnology Advances**, v.26, pp.335-351, 2008.

SER, H-L.; LAW, J. W-F.; CHAIYAKUNAPRUK, N.; JACOB, S. A.; PALANISAMY, U. D.; CHAN, K-G.; GOH, B-H.; LEE, L-H. Fermentation conditions that affect clavulanic acid production in *streptomyces clavuligerus*: A Systematic Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00522

SHIVHARE, M.; MCCREATH, G. Practical considerations for DOE implementation in quality by Design. **Bioprocess International**, 2010.

SONG, Y.Y.; JENSEN, S.E.; LEE, K.J. Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v.88, p.659-670, 2010.

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

VIANA, D. A.; CARNEIRO-CUNHA, M. N.; ARAÚJO, J. M.; BARROS-NETO, B.; LIMA-FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; PESSOA-JÚNIOR, A.; PORTO, A. L. Screening of variables influencing the clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 strain. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.160, p.1797-1807, 2010.

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

Enviado em: 18 set. 2017

Aceito em: 01 dez. 2017

Editor responsável: Mateus das Neves Gomes