

AMANDA SALVADOR BAPTISTA

Monitoramento de cultivos submersos de linhagens de  
*Streptomyces clavuligerus* para a quantificação de distribuição  
de fluxos metabólicos

Orientador: Profa. Dra. Maria Lucia Gonsales daCosta Araujo

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

Araraquara

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

B222m	<p>Baptista, Amanda Salvador</p> <p>Monitoramentode cultivos submersos de linhagens de <i>Streptomyces clavuligerus</i> para a quantificação de distribuição de fluxos metabólicos / Amanda Salvador Baptista. – Araraquara : [s.n], 2015</p> <p>93 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo</p> <p>1. Biotecnologia. 2. Compostos bioativos. 3. Metabólitos. 4. Modelos matemáticos. 5. Microbiologia industrial. I. Título</p>
-------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## AMANDA SALVADOR BAPTISTA

---

### Formação acadêmica/titulação

- 2010.2014** Mestrado em andamento em Biotecnologia.  
Instituto de Química de Araraquara. UNESP, IQAR.UNESP, Brasil  
Título: Monitoramento de cultivos submersos de linhagens de *Streptomyces clavuligerus* para a quantificação de distribuição de fluxos metabólicos  
Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo  
Bolsista da FAPESP . Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
- 2009 . 2011** Graduação em Tecnologia em Biotecnologia.  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP – Ribeirão Preto . SP
- 

### Formação Complementar

- 2014 . Introdução à Análise Proteômica. (Carga horária: 20h). Universidade Federal de Lavras.
- 2011 . Limpeza e manutenção preventiva de micropipetas Eppendorf. Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP.
- 2010 .I Curso de Biossegurança: Conduta e Riscos. Universidade de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto.
- 2009 . Mini.curso Engenharia Genética: Clonagem Molecular e Expressão Gênica. IX Workshop de Genética. Instituto de Biociência Botucatu. Distrito de Rubião Junior, S/N. Botucatu S/P
- 

### Prêmios e títulos

- 2º lugar, sob a forma de apresentação painel, na área de Ciências Extras, Naturais e Tecnológicas. In: 11º Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto – CONIC, 2010, Ribeirão Preto.
-

## Produção bibliográfica

### Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

**BAPTISTA, A. S.** ; Cavallieri, A. P. ; LEITE, C. A. ; CRUZ, A. J. G. ; Araujo, M. L. G. C. . Bioprocesso de produção do antitumoral holomicina por *Streptomyces clavuligerus*. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia química, 2014, Florianópolis. Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia química, 2014.

### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

OLIVEIRA, J. P. S.; CAVALLIERI, A. P.; LEITE, C. A.; **BAPTISTA, A. S.**; Araujo, M. L. G. C. Purificação de Holomicina produzida por uma linhagem mutante de *Streptomyces clavuligerus* In: XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2013, Araraquara. **Anais do XXV Congresso de iniciação científica da Unesp.** , 2013.

PINA, E. S.; BERTONI, B. W.; TALEB.CONTINI, S. H.; **BAPTISTA, A. S.**; BENINCASA, C. I.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Análise qualitativa do óleo essencial de *L. alba* obtidos em diferentes horários do dia. In: 12º Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto – CONIC, 2011, Ribeirão Preto, Anais do 12º Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto – CONIC, 2011, Nº Anais 319.

**BAPTISTA, A. S.**; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B.W. Conservação e manutenção de recursos genéticos da espécie *Zeyheria montana*. In: 11º Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto – CONIC, 2010, Ribeirão Preto, Anais do 11º Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto – CONIC, 2010, Nº Anais 335.

## Eventos

### Participação em eventos

XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Bioprocesso de produção do antitumoral holomicina por *Streptomyces clavuligerus*. 2014

Workshop “ ENTREPRENEURSHIP FOR GRADUATE IN CHEMISTRY: A GLANCE FOR BRAZILIAN COMPETITIVENESS INNOVATION & DEVELOPMENT. Instituto de Química de Araraquara – UNESP. 2014.

Workshop 2012 – de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia – IQ.UNESP. Instituto de Química de Araraquara, 2012.

Conic . Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da Unaerp. Análise Qualitativa e Quantitativa do Óleo Essencial de *L. alba* Obtidos em Diferentes Horários do Dia. 2011..

V Semana de Palestras de Biotecnologia. 2011. Universidade de Ribeirão Preto .  
UNAERP

Conic . Congresso de Iniciação Científica e Pesquisa da Unaerp. Conservação e  
Manutenção de Recursos Genéticos da Espécie Zeyheria montana. 2010.

IV Semana de Palestras da Biotecnologia. 2010. Universidade de Ribeirão Preto .  
UNAERP

IX Workshop de Genética. 2009. Instituto de Biociência Botucatu. Distrito de Rubião  
Junior, S/N. Botucatu S/P

III Semana de Palestras da Biotecnologia. 2009. Universidade de Ribeirão Preto .  
UNAERP

AMANDA SALVADOR BAPTISTA

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual Paulista,  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 16 de janeiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª. Drª. Daniela Alonso Bocchini Martins  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª. Drª. Rosineide Gomes da Silva Cruz  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCAR, São Carlos

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus** por sempre iluminar meus passos.

A meus queridos pais **Rubens Baptista** e **Maria Perciliana Salvador Baptista**, a minha irmã **Amália Salvador Baptista**, pelo amor incondicional, por sempre estarem presentes apoiando.me e incentivando.me em todas as minhas decisões.

A **Prof<sup>a</sup> Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo**, pela oportunidade, orientação, dedicação e paciência, além de todo o conhecimento e experiência compartilhados.

Ao meu namorado **Renan Jeferson Paneco**, pelo companheirismo, apoio, compreensão e incentivos diários.

Aos amigos de Laboratório **Thiago Augusto Nascimento, João Pedro Sacrato de Oliveira, Thaline de Matos Carbonaro, Maria Lucia Frade**. Em especial **André Pastrelo Cavallieri** e **Carla Andrea Leite** por todas as conversas, pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos **Mariana Fonseca, Suzy Sayuri Sassamoto Kurokawa, Isabelle Cavalini de Oliveira, Fernando Monteiro Borges, Lucy Elaine Sugauara, Cristiana da Silva** e **Andressa Somensi**, que acompanharam de perto minha jornada e me acolheram nos momentos difíceis.

Ao **Instituto de Química de Araraquara . UNESP** pela estrutura adequada para a execução do trabalho.

A **FAPESP** pela bolsa concedida.

"A persistência é o caminho do êxito."

Charles Chaplin

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein



## RESUMO

*Streptomyces clavuligerus* é uma espécie produtora de múltiplos metabólitos secundários de interesse terapêutico: ácido clavulânico, um potente inibidor de beta-lactamases, e outras vinte clavamas, várias delas com atividade antifúngica; cefamicina C, um antibiótico beta-lactâmico usado para produzir vários antibióticos semissintéticos com ação contra bactérias anaeróbias; tunicamicina, uma mistura de homólogos de nucleosídeos inibidores da glicosilação de proteínas em procariotos e eucariotos; holomicina, uma ditiolopirrolona com atividades bacteriostática e citotóxica em mamíferos. Neste projeto foram estudadas as linhagens de *S. clavuligerus* ATCC 27064 (selvagem) e Hol.80 (mutante) em cultivos submersos. Os dados experimentais dos cultivos foram utilizados para análise cinética, na qual foram determinados parâmetros cinéticos e coeficientes de rendimento, e para simulação de distribuição de fluxos metabólicos, empregando-se modelo metabólico previamente construído em Tese de Doutorado e com o auxílio de programa computacional designado para esta finalidade. Cultivos da linhagem selvagem em biorreator convencional operado em batelada utilizando-se a combinação de maltose e lisina resultaram em produções de cefamicina C e ácido clavulânico de, respectivamente, 90 e 100 mg·L<sup>-1</sup>, sem produção de holomicina. Sob mesmas condições, a linhagem mutante produziu 50 e 60 mg·L<sup>-1</sup> de cefamicina C e holomicina, respectivamente. Por outro lado, a combinação maltose, lisina e glutamato estimulou a produção de holomicina pela linhagem selvagem (95 a 110 mg·L<sup>-1</sup>) e reduziu a produção tanto de cefamicina C como de ácido clavulânico em cerca de 65%. O mutante cultivado neste mesmo meio produziu cerca de 120 mg·L<sup>-1</sup> de cefamicina C e 75 mg·L<sup>-1</sup> de holomicina, com produção desprezível de ácido clavulânico. Estes resultados mostraram que diferentes fontes de nitrogênio favorecem a produção de bioativos em diferentes proporções. Os dados mais relevantes obtidos nas simulações do modelo metabólico indicaram que a produção de holomicina requer grande demanda de energia de manutenção (produção de ATP) em ambas as linhagens.

**Palavras-chave:** *Streptomyces clavuligerus*. Bioativos. Cultivo submerso. Modelagem matemática. Fluxos metabólicos.

## ABSTRACT

*Streptomyces clavuligerus* is a species that produces multiple secondary metabolites of therapeutic interest: clavulanic acid, a potent inhibitor of beta-lactamases, and other twenty clavams, several of them with antifungal activity; cephamycin C, a beta-lactam antibiotic used to produce various semi synthetic antibiotics with activity against anaerobic bacteria; tunicamycin, a mixture of homologues nucleoside that inhibits protein glycosylation in prokaryotes and eukaryotes; holomycin, a dithiopyrrolone with bacteriostatic and cytotoxic activities in mammals. In this project we compared the behavior of strains ATCC 27064 of *S. clavuligerus* and Hol.80 mutant, non producer of clavulanic acid in submerged cultures. Kinetic parameters and yield coefficients were determined. The experimental data of the cultures were used to simulate the metabolic fluxes distribution for each strain. It was employed a metabolic model previously built up in a Doctoral Thesis and the simulation was carried on with the aid of a computer program designed for this purpose. Batch cultivations with the wild strain in conventional bioreactor using a combination of maltose and lysine resulted in a production of 90 mg·L<sup>-1</sup> of cephamycin C and 100 mg·L<sup>-1</sup> of clavulanic acid, without holomycin production. At same conditions, the mutant produced 50 and 60 mg·L<sup>-1</sup> of cephamycin C and holomycin, respectively. The same combination (maltose and lysine) supplemented with glutamate stimulated the production of holomycin by the wild strain (95 to 110 mg·L<sup>-1</sup>), with a production of cephamycin C and clavulanic acid 65% lower. The mutant produced in the same medium approximately 120 mg·L<sup>-1</sup> of cephamycin C and 75 mg·L<sup>-1</sup> of holomycin. These results showed that different nitrogen sources promote the production of various bioactives. The most significant data obtained from the model simulations indicated that the holomycin biosynthesis requires high demand of maintenance energy (ATP production) both.

**Key.words:** *Streptomyces clavuligerus*. Biocompounds. Submerged cultivations. Mathematical modeling. Metabolic fluxes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1:</b> Distribuição de grupos de micro-organismos produtores de antibióticos. ....	22
<b>Figura 3.2:</b> Estrutura química do ácido clavulânico. ....	24
<b>Figura 3.3:</b> Estrutura química da cefamicina C.....	25
<b>Figura 3.4:</b> Estrutura química do antibiótico semi.sintético Cefoxitina .....	25
<b>Figura 3.5:</b> Rota biossintética em <i>S. clavuligerus</i> de cefamicina C.....	26
<b>Figura 3.6:</b> Estrutura química holomicina. ....	27
<b>Figura 3.7:</b> Rota biossintética de holomicina, proposta por meio de bioinformática: Cy, A e T indicam respectivamente os domínios de ciclização, adenilação e tiolatação da enzima peptídeo sintetase não ribossomal, responsável pelos passos iniciais da rota biossintética.	28
<b>Figura 3.8:</b> Modelagem matemática do metabolismo celular a partir de representações de redes metabólicas construídas com base em (a) interações individuais; (b) restrições, incluindo a topologia da rede, estequiometria e reversibilidades das reações ou (c) mecanismos detalhados de reações. Resultados típicos obtidos com as análises esquematizados abaixo de cada estratégia: (a) "Nós" (círculos vermelhos) de interação da rede metabólica; (b) "Cone" de distribuição dos fluxos possíveis em uma rede construída a partir de rotas metabólicas; (c) Dinâmica da concentração dos componentes celulares. (Adaptado de STELLING, 2004) .....	30
<b>Figura 4.1:</b> Esquemas das etapas de cultivo de <i>S. clavuligerus</i> . ....	37
<b>Figura 4.2:</b> Curva de calibração para a quantificação de CepC totais por bioensaio. ....	39
<b>Figura 4.3:</b> Curva de calibração de holomicina obtida por HPLC. ....	41
<b>Figura 4.4:</b> Curva de calibração para quantificação de proteína extracelulares.....	42
<b>Figura 5.1:</b> Espectro de massa de holomicina purificada a partir do cultivo de Hol 80. ....	43
<b>Figura 5.2:</b> Biomassa obtida durante o processo fermentativo com meio sintético com apenas lisina como fonte de nitrogênio de ATCC 27064 e Hol 80 em frascos agitados. ....	45
<b>Figura 5.3:</b> Consumo de maltose durante o processo fermentativo de ATCC 27064 e Hol 80 em frascos agitados.....	45
<b>Figura 5.4:</b> Consumo de lisina durante o processo fermentativo de ATCC 27064 e Hol 80 em frascos agitados.....	46
<b>Figura 5.5:</b> Produção de AC por <i>S. clavuligerus</i> selvagem ATCC 27064 e mutante Hol 80, obtidos em 48 e 72 horas de processo em frascos agitados.....	46
<b>Figura 5.6:</b> Produção de CefC por Hol 80 e ATCC 27064 no período de 48 e 72 horas de processo em frascos agitados. ....	47
<b>Figura 5.7:</b> Produção de holomicina por ATCC 27064 e Hol 80 durante o processo fermentativo.....	47

<b>Figura 5.8:</b> Biomassa obtida durante processo fermentativo em meio sintético contendo lisina e glutamato como fontes de nitrogênio (L+G) utilizando-se as linhagens ATCC 27064 e Hol.80 em frascos agitados.....	49
<b>Figura 5.9:</b> Consumo de glutamato durante o processo fermentativo com meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio entre as linhagens ATCC 27064 e Hol.80 em frascos agitados.....	50
<b>Figura 5.10:</b> Consumo de lisina durante processo fermentativo em meio sintético contendo lisina e glutamato (L+G) como fontes de nitrogênio utilizando-se as linhagens ATCC 27064 e Hol.80 em frascos agitados.....	50
<b>Figura 5.11:</b> Consumo de maltose durante processo fermentativo em meio sintético contendo lisina e glutamato (L+G) como fontes de nitrogênio utilizando-se as linhagens ATCC 27064 e Hol.80 em frascos agitados. ....	50
<b>Figura 5.12:</b> Produção de AC por <i>S. clavuligerus</i> selvagem ATCC 27064 e mutante Hol 80 em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio, obtidos em 48 e 72 horas de processo. ....	51
<b>Figura 5.13:</b> Produção de CefC por <i>S. clavuligerus</i> selvagem ATCC 27064 e mutante Hol 80 em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio, obtidos em 48 e 72 horas de processo. ....	52
<b>Figura 5.14:</b> Produção de Hol por <i>S. clavuligerus</i> selvagem ATCC 27064 e mutante Hol 80 em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio, obtidos em 48 e 72 horas de processo. ....	52
<b>Figura 5.15:</b> Crescimento em frascos agitados de linhagens de <i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064 em meios contendo maltose (A), lisina (B) e glutamato (C) e Hol.80 em meios contendo maltose (D), lisina (E) e glutamato (F). ....	54
<b>Figura 5.16:</b> Biomassa obtida durante o processo fermentativo em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio em biorreator por ATCC 27064. ....	56
<b>Figura 5.17:</b> Consumo de lisina e maltose em ATCC 27064 durante o processo fermentativo com meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio em biorreator.....	56
<b>Figura 5.18:</b> Valores de secreção de proteína em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio no cultivo de ATCC 27064 em biorreator.....	57
<b>Figura 5.19:</b> Evolução da saída de CO <sub>2</sub> durante o processo fermentativo de ATCC 27064 em biorreator. ....	58
<b>Figura 5.20:</b> Produção de AC em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio por ATCC 27064 em biorreator.....	58
<b>Figura 5.21:</b> Produção de CefC em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio por ATCC 27064 em biorreator. ....	59

<b>Figura 5.22:</b> Perfis de concentração de células (Cx), maltose (Cmalt), lisina (Clis), cefamicina C (CCefC) e ácido clavulânico (CAc) de cultivo em biorreator convencional operado em batelada (× . dados experimentais; — . ajuste do Modelo 1).....	61
<b>Figura 5.23:</b> Biomassa obtida durante o processo fermentativo em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio em biorreator por ATCC 27064.....	62
<b>Figura 5.24:</b> Consumo de lisina, maltose e glutamato em ATCC 27064 durante o processo fermentativo com meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio em biorreator.....	63
<b>Figura 5.25:</b> Valores da secreção de proteína em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio no cultivo de ATCC 27064.....	63
<b>Figura 5.26:</b> Produção de AC em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio por ATCC 27064 em biorreator.....	64
<b>Figura 5.27:</b> Produção de CefC em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio por ATCC 27064 em biorreator.....	64
<b>Figura 5.28:</b> Produção de Hol em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio por ATCC 27064 em biorreator.....	64
<b>Figura 5.29:</b> Perfis de concentração de células (Cx), glutamato (Cglut), maltose (Cmalt), lisina (Clis), holomicina (CHol), cefamicina C (CCefC) e ácido clavulânico (CAc) de cultivo em biorreator convencional operado em batelada (× . dados experimentais; — . ajuste do Modelo 2).....	66
<b>Figura 5.30:</b> Biomassa obtida durante processo fermentativo com meio sintético contendo lisina como fonte de nitrogênio em biorreator por Hol.80.....	68
<b>Figura 5.31:</b> Consumo de lisina e maltose em Hol.80 durante o processo fermentativo com meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio em biorreator.....	69
<b>Figura 5.32:</b> Valores da secreção de proteína em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio no cultivo de Hol.80.....	69
<b>Figura 5.33:</b> Evolução da saída de CO <sub>2</sub> durante o processo fermentativo de Hol.80 em biorreator.....	70
<b>Figura 5.34:</b> Produção de AC em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio por Hol.80 em biorreator.....	71
<b>Figura 5.35:</b> Produção de CefC em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio por Hol.80 em biorreator.....	71
<b>Figura 5.36:</b> Produção de Hol em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio por Hol.80 em biorreator.....	71
<b>Figura 5.37:</b> Consumo de lisina, glutamato e maltose em Hol.80 durante o processo fermentativo com meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio em biorreator.....	72

<b>Figura 5.38:</b> Biomassa obtida durante processo fermentativo com meio sintético contendo lisina como fontes de nitrogênio em biorreator por Hol.80. ....	73
<b>Figura 5.39:</b> Valores da secreção de proteína em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio no cultivo de Hol.80.....	73
<b>Figura 5.40:</b> Evolução da saída de CO <sub>2</sub> durante o processo fermentativo de Hol.80 em biorreator em meio contendo lisina e glutamato como fonte de nitrogênio. ....	73
<b>Figura 5.41:</b> Produção de AC em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio por Hol.80 em biorreator.....	74
<b>Figura 5.42:</b> Produção de CefC em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio por Hol.80 em biorreator.....	74
<b>Figura 5.43:</b> Produção de Hol em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio por Hol.80 em biorreator.....	75
<b>Figura 5.44:</b> Mapa de distribuição dos principais fluxos durante a fase exponencial do cultivo de ATCC 27064 em meio contendo lisina e glutamato.....	85
<b>Figura 5.45:</b> Mapa de distribuição dos principais fluxos durante a fase exponencial do cultivo de Hol.80 em meio contendo lisina .....	86
<b>Figura 5.46:</b> Mapa de distribuição dos principais fluxos durante a fase exponencial do cultivo de Hol.80 em meio contendo lisina e glutamato.....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1:</b> Composição do meio ágar nutriente .	31
<b>Tabela 4.2:</b> Meio de esporulação <i>S. clavuligerus</i> (Sánchez e Braña; 1996).	32
<b>Tabela 4.3:</b> Composição meio de reativação (MR) ou meio de germinação (MG)	32
<b>Tabela 4.4:</b> Composição dos meios de preparo de inóculo.	33
<b>Tabela 4.5:</b> Composição do meio de produção.	33
<b>Tabela 4.6:</b> Meio de produção A.	34
<b>Tabela 4.7:</b> Meio de produção B.	34
<b>Tabela 4.8:</b> Componentes do meio de alimentação de cultivo contínuo.	35
<b>Tabela 4.9:</b> Meio para crescimento de <i>S. clavuligerus</i> , apenas com lisina como fonte de C e N.	35
<b>Tabela 4.10:</b> Meio para crescimento de <i>S. clavuligerus</i> , apenas com glutamato como fonte de C e N.	36
<b>Tabela 4.11:</b> Meio para crescimento de <i>S. clavuligerus</i> , com maltose e NH <sub>4</sub> Cl como fonte de C e N.	36
<b>Tabela 5.1:</b> Valores estimados dos parâmetros do Modelo 1	61
<b>Tabela 5.2:</b> Valores estimados dos parâmetros do Modelo 2.	67
<b>Tabela 5.3:</b> Variações globais de consumo de substratos e formações de produtos durante a fase exponencial do cultivo de ATCC 27064 em meio contendo lisina e glutamato como fontes de nitrogênio.	82
<b>Tabela 5.4:</b> Variações globais de consumo de substratos e formações de produtos durante a fase exponencial do cultivo de Hol.80 em meio contendo apenas lisina como fonte de nitrogênio.	82
<b>Tabela 5.5:</b> Variações globais de consumo de substratos e formações de produtos durante a fase exponencial do cultivo de Hol.80 em meio contendo lisina e glutamato como fontes de nitrogênio.	83

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1).....	60
Equação (2).....	60
Equação (3).....	60
Equação (4).....	60
Equação (5).....	60
Equação (6).....	60
Equação (7).....	65
Equação (8).....	65
Equação (9).....	65
Equação (10).....	66
Equação (11).....	66
Equação (12).....	66
Equação (13).....	66
Equação (14).....	66



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	21
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
3.1	Antibióticos .....	21
3.2	<i>Streptomyces clavuligerus</i> .....	22
3.3	Ácido Clavulânico.....	23
3.4	Cefamicina C .....	24
3.5	Holomicina.....	26
3.6	Modelagem Matemática.....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
4.1	Materiais .....	31
4.1.1	Micro-organismos .....	31
4.1.2	Meios de Cultura .....	31
4.2	Condições gerais do processo fermentativo.....	36
4.2.1	Alimentação dos cultivos .....	37
4.3	Métodos analíticos .....	38
4.3.1	Coleta de amostras, armazenagem do sobrenadante e determinação de biomassa.....	38
4.3.2	Quantificação de CefC.....	38
4.3.3	Quantificação de AC .....	40
4.3.4	Quantificação de Hol .....	40
4.3.5	Análise de Maltose .....	41
4.3.6	Análise de Lisina .....	41
4.3.7	Análise de Glutamato .....	41
4.3.8	Análise de proteínas extracelulares.....	42
4.3.9	Análise de CO <sub>2</sub> .....	42
4.3.10	Simulação de parâmetros cinéticos.....	43
4.3.11	Simulação dos modelos metabólicos .....	43

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	43
5.1	Extração e Purificação de Hol.....	43
5.2	Padronização de meio de cultura e condições de cultivos.....	44
5.2.1	Cultivos em frascos agitados em meios sintéticos para a produção de bioativos .....	44
5.2.1.1	Cultivo em meio sintético contendo lisina como fonte de nitrogênio .....	44
5.2.1.2	Cultivo em meio sintético contendo lisina e glutamato como fontes de nitrogênio.....	48
5.3	Crescimento das linhagens em única fonte de C: Maltose, lisina e glutamato. 53	
5.4	Cultivos realizados em biorreator .....	55
5.4.1	Cultivo contínuo da linhagem <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em biorreator em meio sintético com lisina para a produção de bioativos .....	55
5.4.2	Estimativa dos parâmetros cinéticos do processo .....	59
5.4.3	Cultivo em batelada com a linhagem <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em biorreator em meio sintético contendo lisina e glutamato para a produção de bioativos .....	61
5.4.4	Cultivo em batelada com a linhagem <i>S. clavuligerus</i> Hol.80 em biorreator em meio sintético contendo lisina para a produção de bioativos .....	68
5.4.5	Cultivo em batelada com a linhagem <i>S. clavuligerus</i> Hol.80 em biorreator em meio sintético contendo lisina e glutamato para a produção de bioativos .....	72
5.5	MODELO METABÓLICO.....	75
5.5.1	Reações do modelo metabólico .....	75
5.6	Distribuição de fluxos metabólicos .....	81
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	88
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	89

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de metabólitos secundários microbianos de interesse terapêutico como antibióticos e antitumorais, é uma das áreas mais relevantes da Biotecnologia. Bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* são tidas, ainda hoje, como as mais prolíficas produtoras destes biocompostos (CHALLIS e HOPWOOD, 2003).

*Streptomyces clavuligerus* é uma das espécies industriais mais importantes e produz múltiplos metabólitos secundários, dos quais vários já foram isolados e caracterizados. Dentre esses metabólitos, dois compostos beta-lactâmicos são produzidos industrialmente, o inibidor de beta-lactamases ácido clavulânico (AC) e o antibiótico cefamicina C (CefC). Além destes compostos, *S. clavuligerus* produz outras vinte clavamas, várias delas com atividade antifúngica, e os antibióticos não-beta-lactâmicos tunicamicina (Tun) e holomicina (Hol) (FUENTE *et al*, 2002).

Normalmente *S. clavuligerus* produz seus bioativos simultaneamente e em pequenas quantidades em seu *habitat* natural, de forma compatível com um mínimo gasto energético. Para se obter um biocomposto em particular e, ainda, em altas concentrações, são necessárias alterações drásticas na distribuição de fluxos do metabolismo primário. Um exemplo da complexidade biossintética desta espécie é a produção simultânea dos compostos beta-lactâmicos AC e CefC, cujas biossínteses são reguladas pelo mesmo elemento multifuncional, codificado por um gene localizado no agrupamento de genes da biossíntese de CefC (SANTAMARTA *et al.*, 2007; BELLÃO *et al*, 2013). Progressos no sentido de se aumentar a produção de um biocomposto têm sido obtidos por meio de investimentos contínuos da indústria farmacêutica em programas de melhoramento de linhagens através de manipulações genéticas com as quais são induzidas modificações direcionadas em regiões específicas do genoma do micro-organismo.

Uma linhagem de *S. clavuligerus* melhor produtora de determinado biocomposto pode ser obtida por manipulação genética, a qual foi subdividida pela Engenharia Metabólica como: (a) aleatória, realizando-se modificações generalizadas em busca da melhor linhagem; (b) por pressão evolutiva, buscando-se a melhor linhagem em cultivos sucessivos realizados sob condições de estresse .neste caso, corre.se o risco de deleções no genoma responsáveis por esporulação, metabolismo secundário, etc; (c) realizando.se modificações direcionadas em

regiões específicas do genoma; (d) identificando-se a linhagem melhor produtora e, quando for o caso, transferindo suas características para outras linhagens (este processo, na íntegra, é denominado de engenharia metabólica reversa) (ARGUESO *et al*, 2009). No entanto, estas intervenções, muitas vezes, têm sido apenas parcialmente bem sucedidas devido a fatores como a evolução natural dos micro-organismos no sentido de criar estruturas de controle resistentes ao redirecionamento de fluxos do metabolismo primário para o secundário e, também, pela falta de conhecimento mais aprofundado do metabolismo microbiano (VILLADSEN *et al*, 2011).

Para se obter maior sucesso na manipulação de um micro-organismo é preciso ter em mãos informações sobre o seu metabolismo, fornecidas em número cada vez maior pelas *ômicas* das ciências biológicas (genômica, proteômica, metabolômica), o que permite o estudo dos sistemas biológicos em níveis crescentes de detalhamento (RODRIGO *et al*, 2010). Ainda, estas informações também possibilitam realizar estudos de modelagem matemática e simulação. A abordagem clássica, desenvolvida a partir da década de 1970 e ainda muito explorada, não requer informações detalhadas do metabolismo celular e os dados *in vivo* são utilizados para testar modelos fenomenológicos de previsão do comportamento global do sistema (KORKE *et al*, 2002). Com o desenvolvimento da Engenharia Metabólica, a partir da década de 1990, foram surgindo novas estratégias de modelagem de sistemas biológicos, integrando diversas metodologias de análise de fluxos com ferramentas de genômica, metabolômica, proteômica e, também, da biotecnologia clássica (PATNAIK, 2008; RODRIGO *et al*, 2010; GEROSA e SAUER, 2011; CHARUSANTI *et al*, 2012).

A diversidade produtiva e a complexidade de *S. clavuligerus* têm feito desta espécie um excelente modelo para o estudo das complexas relações entre mecanismos reguladores e biossínteses de múltiplos metabólitos secundários e seu comportamento tem sido investigado em níveis crescentes de detalhamento com o avanço das *ômicas* das ciências biológicas resultando em um número cada vez maior de informações do metabolismo celular (FUENTE *et al.*, 2002). Neste contexto, o presente trabalho propôs-se a investigar o metabolismo de *S. clavuligerus* e comparar a linhagem selvagem (ATCC 27064) com o mutante (Hol.80) com auxílio de ferramentas de modelagem matemática e simulação.

## 2 OBJETIVO GERAL

De acordo com o que foi apresentado na introdução, o presente projeto teve como objetivo geral contribuir para aprofundar o conhecimento do metabolismo de *S. clavuligerus* por meio do estudo de diferenças entre a linhagem selvagem (ATCC 27064) e um mutante (Hol.80), com o auxílio de ferramentas matemáticas de modelagem e simulação.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter dados *in vivo* de cultivos submersos para quantificar a distribuição dos fluxos metabólicos das linhagens;
- Determinar coeficientes de rendimento de cultivos submersos relativos a consumo de substratos e formação de biomassa, biocompostos e subprodutos;
- Quantificar a distribuição de fluxos metabólicos com auxílio do programa computacional específico Optflux (ROCHA *et al*, 2010).

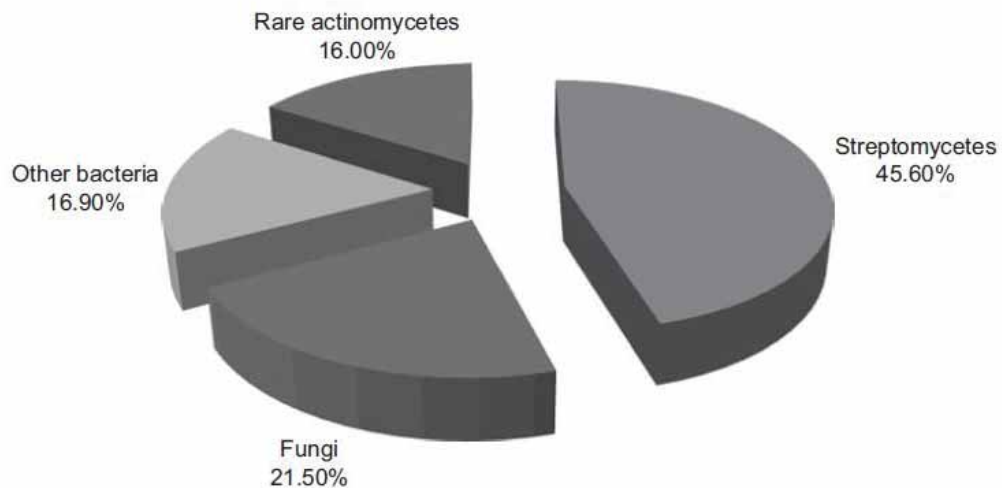
## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Antibióticos

Com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, deu-se início a uma nova era da quimioterapia. Em sequência, as descobertas de vários antibióticos produzidos por micro-organismos erradicaram quase por completo muitas doenças. Assim, criou-se o conceito de que as doenças infecciosas haviam permanecido em um passado distante. No entanto, com o surgimento de bactérias patogênicas multirresistentes, estas doenças, tornaram-se novamente um problema de responsabilidade pública, causando mais de 150 mil mortes anualmente (Zhu *et al.*, 2014). Para combater o número cada vez maior de bactérias patogênicas e mais resistentes aos antibióticos conhecidos, a busca por micro-organismos produtores de novos antimicrobianos com maior potencial terapêutico, tornou-se necessário (WIETZ *et al*, 2010). Micro-organismos filamentosos constituem a principal fonte de metabólitos secundários, produzindo cerca de 90% de todos os antibióticos conhecidos. Apenas o gênero *Streptomyces* é responsável por aproximadamente dois terços de todos os biocompostos descobertos (Figura 3.1) (DEMAIN, 2006;

TORTORA *et al.*, 2010; TIWARI e GUPTA, 2012), sendo a estreptomicina, o primeiro antibiótico descoberto pelo gênero, em 1944, por Waksman & Henrici, isolado de *S. griseus* (CHATER, 2006).

**Figura 3.1:** Distribuição de grupos de micro-organismos produtores de antibióticos.



**Fonte:** Lazzarini, 2001

Após o isolamento da estreptomicina e o seu grande sucesso, diversos antibióticos foram descobertos, como: eritromicina (*S. erythreus*), cloranfenicol (*S. Venezuela*), lincomicina (*S. lincolnensis*), vancomicina (*S. orientalis*), daptomicina (*S. roseosporus* ou *S. pristinaspiralis*), rifamicina (*S. mediterranei*), estreptograminas (*S. pristinaespiralis*) e platensimicina (*S. platensi*) (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Apesar desta gama imensa de antibióticos sintetizados pelo gênero *Streptomyces*, ainda hoje os antibióticos beta-lactâmicos, como as penicilinas e cefalosporinas, são os mais utilizados em casos de infecções (TORTORA *et al.*, 2010), devido à sua alta especificidade e toxicidade relativamente baixa (BRAKHAGE, 1998), movimentando aproximadamente 60% do mercado mundial de antibióticos (TIWARI e GUPTA, 2012).

### **3.2 *Streptomyces clavuligerus***

*Streptomyces clavuligerus* é uma bactéria filamentosa, gram.positiva pertencente do grupo dos actinomicetos, que foi descrita primeiramente por Higgens e Kastner (1971) ao isolarem de uma amostra de solo na América do sul. Seu nome

vem do latim que significa “tendo pequenas clavas”; radical clavul=pequena clava e sufixo igerus=tendo. Como os demais actinomicetos, é um micro-organismo aeróbio estrito, mesófilo e com crescimento em ambiente ao redor da neutralidade (pH 6,5 e 8,0). Uma de suas peculiaridades é a incapacidade de crescer em glicose como única fonte de carbono (C), além disso, também não utiliza outras hexoses (manose, galactose, frutose), pentoses (xilose, manitol ou sorbitol) e dissacarídeos (lactose ou sacarose). No entanto possui eficiência em metabolizar glicerol, amido e maltose. Este fato intrigante deve-se a deficiência do transporte de monossacarídeo de *Streptomyces clavuligerus* (GARCIA.DOMINGUEZ *et al.*, 1989; PÉREZ.REDONDO *et al.*, 2010). Outra característica marcante é a presença do ciclo da ureia, incomum aos procaríotos (BUSHELL *et al.*, 2006)

*S. clavuligerus* possui grande importância industrial por produzir múltiplos metabólitos secundários, dos quais vários já foram isolados e possuem atividade terapêutica. Dentre estes podemos destacar o AC, um potente inibidor de beta-lactamases, enzimas responsáveis pela inativação de compostos beta-lactâmicos (LAVARDA *et al.*, 2008; DOMINGUES *et al.*, 2010). Também uma mistura de homólogos de nucleosídeos que interferem na formação de glicoproteínas em procaríotos e eucariotos (PRICE e TSVETANOVA, 2007). E Hol um composto da classe da pirroínas, com atividades citotóxicas em mamíferos e em células cancerígenas (LI e WALSH, 2010; LIRAS, 2014).

### 3.3 Ácido Clavulânico

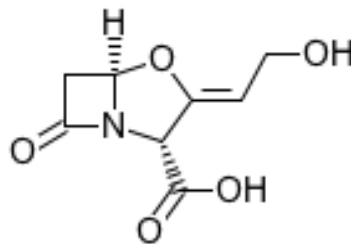
Em busca de solucionar o grande problema causado pela resistência bacteriana a maioria dos antibióticos existentes, em meados de 1960 Beecham Research Laboratories, iniciou a investigação de inibidores de beta-lactamases (BUGGALEY *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Ensaios microbiológicos com *Klebsiella aerogenes* foram desenvolvidos em virtude da sua capacidade produtiva de beta-lactamases. Uma variedade de filtrado de culturas provenientes de solo foi aplicada conjuntamente a Benzilpenicilina e, em determinado momento observou-se a inibição da bactéria teste (BUTTERWORTH, 1984; BUGGALEY *et al.*, 1997). Deste modo foi descoberto AC (Figura 3.2), que apesar de não possuir significativa atividade antibiótica, tem um alto poder de inibição de beta-lactamases (BUGGALEY *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Diferente dos demais compostos beta-

lactâmicos, AC foi o primeiro composto natural onde o anel beta-lactâmico não possui ligação com enxofre e capaz de inibir a maioria das classes de beta-lactamases (BUTTERWORTH, 1984; BUGGALEY *et al*, 1997).

AC atua em sinergismo com penicilinas e cefalosporinas, bloqueando o sítio ativo das enzimas beta-lactamases, impedindo a degradação do anel beta-lactâmico do antibiótico e protegendo a sua bioatividade. Um exemplo muito importante e conhecido desta junção é o Clavulin®, que é a associação do clavulanato de potássio e amoxicilina, bastante utilizado no tratamento de infecções resistentes (LAVARDA *et al*, 2008; DOMINGUES *et al*, 2010; TORTORA *et al*, 2010).

Glicerol e arginina são precursores diretos da molécula de AC, sua biossíntese é favorecida pela adição de ornitina e/ou glicerol no meio de cultura (SAUDAGAR *et al*, 2008; DOMINGUES *et al*, 2010; TEODORO *et al*, 2010).

**Figura 3.2:** Estrutura química do ácido clavulânico.



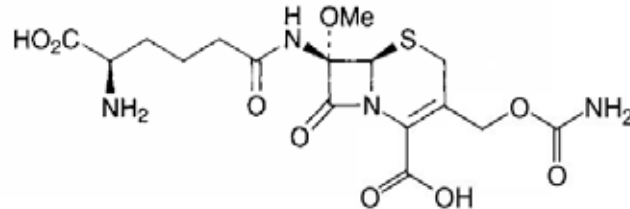
### 3.4 Cefamicina C

CefC (ácido 7-(5-amino-5-carboxivalerilamino)-3-carbamoyloximetil-7-methoxy-3-cefem-4-carboxílico) (Figura 3.3), é um antibiótico beta-lactâmico pertencente a classe das cefaloporias, sendo a primeira cefamicina a ser isolada. Geralmente é produzida por *Nocardia lactamdurans* (STAPLEY *et al*, 1972) e *S. clavuligerus* (NAGAJARIAN *et al*, 1971). Sua estrutura química semelhante à cefalosporina C, a qual é produzida somente por fungos filamentosos (ARAUJO *et al*, 1999; CRUZ *et al*, 2004), diferindo apenas pela presença de um grupo metoxi na posição 7 alfa do seu anel bicíclico, o que lhe confere uma maior resistência as beta-lactamases (OMSTEAD *et al.*, 1985; BUSSARI *et al*, 2009). No entanto, sua eficiência restringe-se a bactérias gram-positivas, deste modo várias modificações químicas em sua cadeia lateral têm sido investigadas para aumentar sua ação contra gram.negativas.

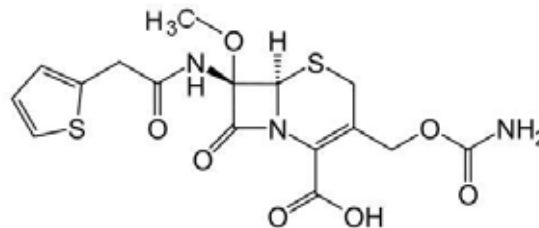


Um exemplo importante é a Cefoxitina (Figura 3.4), onde foi substituído o radical alfa-aminoadipil por um radical tienilacetil, um fármaco com ação contra bactérias gram-negativas, gram-positivas e anaeróbias (OMSTEAD *et al.*, 1985).

**Figura 3.3:** Estrutura química da cefamicina C



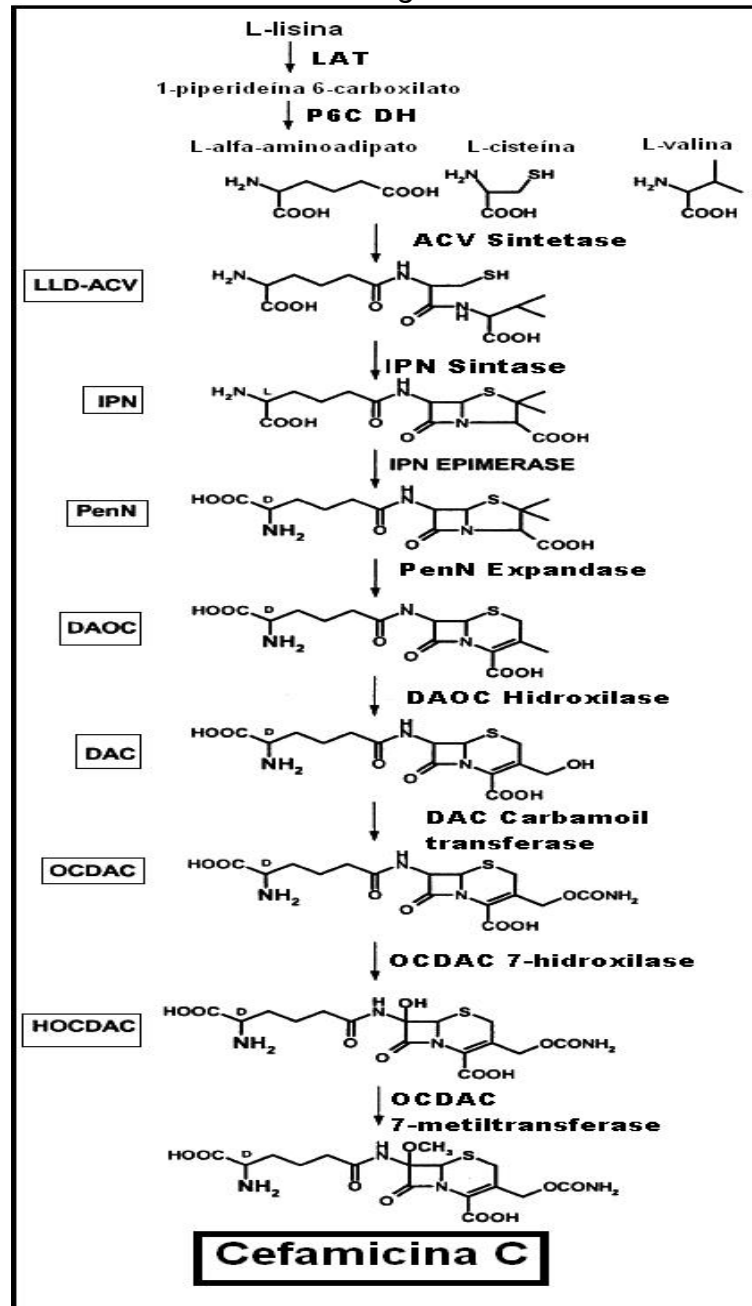
**Figura 3.4:** Estrutura química do antibiótico semi.sintético Cefoxitina



A biossíntese de CefC (Figura 3.5) inicia-se com a formação do raro aminoácido ácido  $\alpha$ -aminoadípico (AAA), a partir da desaminação da lisina, catalisada pela enzima Lisina aminotransferase (LAT). Em procariontos, AAA é um dos produtos do metabolismo de lisina e, segundo relatos da literatura, a adição de lisina em meios de cultura de *S. clavuligerus* induz o aumento da produção de CefC (LIRAS e MARTÍN, 2006; ANTONIO *et al*, 2012). A segunda reação é catalisada pela enzima ACV sintetase, consistindo na condensação não ribossomal dos aminoácidos ácido  $\alpha$ -aminoadípico, cisteína e valina para a formação do tripeptídeo L- $\alpha$ -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (ACV), precursor dos antibióticos beta-lactâmicos em bactérias ou fungos filamentosos. Depois, a enzima isopenicilina N sintetase realiza uma ciclização oxidativa do peptídeo formando a Isopenicilina N, que é isomerizada pela enzima Isopenicilina N epimerase que promovendo a mudança conformacional da forma L para D da cadeia lateral aminoadipil, tornando-se a penicilina N. A enzima deacetoxycephalosporin C sintetase promove a expansão anel tiazolidínico da penicilina N que é transformada em deacetoxycephalosporin.C, que por sua vez é hidrolisada a orto-carbamoil-deacetylcephalosporin C. Por fim acontece a acetilação de orto-carbamoil-deacetylcephalosporin C a cefalosporina C, e a metilação da posição 7 alfa que diferencia a cefamicina C das demais

cefamicinas (MALMBERG *et al.*, 1993; MARTIN, 1998; LIRAS, 1999; ALEXANDER *et al.*, 2000).

Figura 3.5: Rota biossintética em *S. clavuligerus* de cefamicina C.



Fonte: Liras (1999)

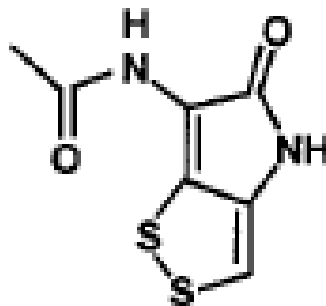
### 3.5 Holomicina

Este composto foi descoberto em *Streptomyces griseus* (ETTLINGER *et al.* 1959) e, posteriormente observado, em *Streptomyces sp.* P6621 e mutantes de

*Streptomyces clavuligerus* (OKAMURA *et al.*, 1977; KENIG e READING 1979). Hoje sabe-se que algumas bactérias gram-negativas como *Photobacterium halotolerans* S2753 (WIETZ *et al.*, 2010) e *Yersinia ruckeri* (QIN *et al.*, 2013) também são produtoras de Hol (Figura 3.6).

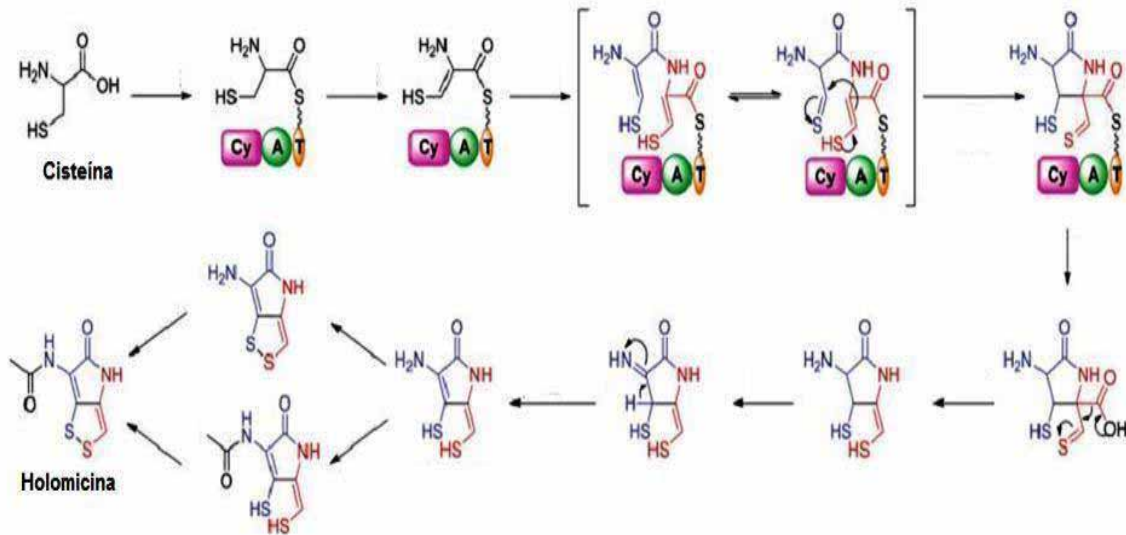
Hol é um antibiótico da classe da pirroínas (ditiolopirrolona), conhecido por inibir a síntese de RNA polimerase em bactéria que adquiriram resistência a rifamicina, e por apresentar propriedades citotóxicas em células de mamíferos (LI e WALSH, 2010; LIRAS, 2014). A linhagem selvagem de *S. clavuligerus* produz concentrações insignificantes deste composto, no entanto mutantes com danos genéticos na rota de biossíntese de AC, geralmente são considerados superprodutores de Hol (FUENTE *et al.*, 2002; LORENZANA *et al.*, 2004; ROBLES.REGLERO, *et al.*, 2013; LIRAS, 2014). Geralmente cepas produtoras de antibiótico possuem genes de resistência ao antibiótico produzido (CUNDLIFFE e DEMAIN 2010).

**Figura 3.6:** Estrutura química holomicina.



Apesar de ser um biocomposto descoberto a mais de 50 anos, pouco se sabe sobre sua rota biossintética, apenas recentemente, o agrupamento de genes responsáveis pela sua biossíntese foi identificado e uma rota biossintética foi proposta (LI e WALSH, 2010; LIRAS, 2014). Uma coenzima acetil (acetil-CoA) e duas cisteínas são condensadas a um dipeptídeo intermediário (L-Cis-L-Cis) que é descarboxilado pela enzima HImF descarboxilase e reduzido pela HImD oxidoreductase, finalizando a síntese com a acetilação de holotina a Hol (Figura 3.7) (LI e WALSH, 2010; LIRAS, 2014).

**Figura 3.7:** Rota biossintética de holomicina, proposta por meio de bioinformática: Cy, A e T indicam respectivamente os domínios de ciclização, adenilação e tiolatação da enzima peptídeo sintetase não ribossomal, responsáveis pelos passos iniciais da rota biossintética.



**Fonte:** Adaptado de Li e Walsh, 2010.

### 3.6 Modelagem Matemática

A modelagem matemática é uma ferramenta muito poderosa na Física, Química e Engenharia, permitindo a interpretação e previsão dos fenômenos naturais (GOMBERT e NIELSEN, 2000). É a arte de descrever os elementos essenciais de um sistema em termos matemáticos (GIERSCH, 2000). É uma forma representativa do modelo fenomenológico verdadeiro. Portanto, é possível estabelecer diferentes modelos matemáticos para um mesmo fenômeno, dependendo dos objetivos e dados disponíveis (GOMBERT e NIELSEN, 2000).

Desde a década de 1970 esta ferramenta vem sendo aprimorada, no sentido de prever o comportamento microbiano com mais detalhadamente e, assim, propor estratégias adequadas de otimização do processo de produção de um biocomposto de interesse (STEPHANOPOULOS, 1999). Neste contexto, os modelos matemáticos desempenham um papel crucial em testes de hipóteses, servindo como guia para identificar gargalos que afetam a biossíntese de um composto de interesse e propor mudanças direcionadas no processo. Dentre os modelos matemáticos disponíveis temos os modelos estequiométricos e os modelos cinéticos que conseguem descrever o metabolismo celular (GOMBERT e NIELSEN, 2000).

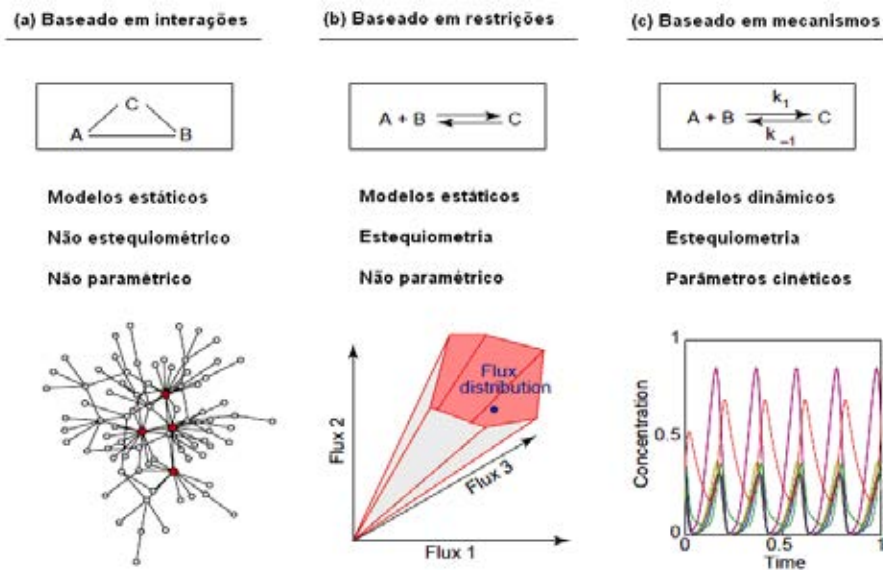
Modelos estequiométricos são extremamente poderosos, mas são limitados devido à falta de informações na formulação do modelo (GOMBERT e NIELSEN, 2000). Apesar das limitações uma análise que tem se mostrado adequada é a distribuição de fluxos metabólicos, uma metodologia baseada em modelos estequiométricos. Além de serem aplicados à investigação do comportamento celular em diferentes condições ambientais, estes modelos também possuem finalidade de prever a relação genótipo-fenótipo, preenchendo lacunas existentes entre informações funcionais e de sequência de DNA (STEPHANOPOULOS, 1999; GOMBERT e NIELSEN, 2000). Esta metodologia pode ser agrupada em três classes conforme os objetivos das análises, Análise de Fluxos Metabólicos (AFM), Análises de Equilíbrio de Fluxos (AEF) e Análise das Vias Metabólicas (AVM).

AFM possibilita análises mais rigorosas, sendo capaz de restringir o espaço solução em apenas uma resposta. No entanto, esta categoria de distribuição de fluxos exige informações detalhadas do sistema biológico a ser estudado, acarretando uma coleta de dados experimentais extensiva. A AVM explora de maneira ampla as redes metabólicas, gerando número elevado de resposta, o que por sua vez dificulta a interpretação dos dados. Já AEF permite estudos do metabolismo utilizando-se de uma função objetivo, sujeita a restrições que possibilitam obter dados de maximização ou minimização de uma variável de interesse.

Também é possível descrever a dinâmica de processos combinando cinética com a estequiometria conhecida de vias metabólicas. Deste modo modelos matemáticos são grandes aliados para investigar sistemas biológicos de forma global com maior rigor e detalhamento.

A Figura 3.8 ilustra estratégias recentes de modelagem de sistemas biológicos e seus critérios de análise (STELLING, 2004). Estas ferramentas são utilizadas para aprofundar o conhecimento do metabolismo celular, detectar gargalos que afetam a síntese de biocompostos de interesse para possibilitar, assim, a proposição de estratégias, auxiliadas por ferramentas da Biologia Molecular, para aumentar os rendimentos dos compostos (STEPHANOPOULOS, 1999).

**Figura 3.8:** Modelagem matemática do metabolismo celular a partir de representações de redes metabólicas construídas com base em (a) interações individuais; (b) restrições, incluindo a topologia da rede, estequiometria e reversibilidades das reações ou (c) mecanismos detalhados de reações. Resultados típicos obtidos com as análises esquematizados abaixo de cada estratégia: (a) "Nós" (círculos vermelhos) de interação da rede metabólica; (b) "Cone" de distribuição dos fluxos possíveis em uma rede construída a partir de rotas metabólicas; (c) Dinâmica da concentração dos componentes celulares. (Adaptado de STELLING, 2004)



Estudos de fluxos metabólicos em *S. clavuligerus* foram realizados por Bushell e colaboradores (2006), para investigar a biossíntese de AC. Propuseram um esquema com os principais fluxos de C e observaram que certos aminoácidos favoreciam a produção do bioativo quando adicionados ao meio de cultivo. Van Gulik *et al.* (2000) analisou a produção de penicilina G por *Penicillium chrysogenum* utilizando AFM e constataram que a baixa disponibilidade de NADPH afeta a produção do antibiótico. Já Schilling *et al.* (1999), construíram um modelo estequiométrico descrevendo todas as reações conhecidas de *Escherichia coli* e investigaram os fenótipos de diferentes mutantes.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Micro-organismos

Para o presente trabalho foi utilizado a linhagem ATCC 27064 de *S. clavuligerus*, proveniente da *American Type Culture Collection* produtor de AC (BUTTERWORTH, 1984), o mutante Hol.80 e *Escherichia coli* ESS 2235 bactéria, sensível a antibióticos beta-lactâmicos, gentilmente cedida pela Dra. Paloma Liras, da Faculdade de Biologia da Universidade de Leon, Espanha (LIRAS; MARTIN; 2005).

Os micro-organismos foram estocados de duas formas: suspensão de esporos, em solução crioprotetora (glicerol 20% v/v), a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  e em forma de células vegetativas liofilizadas, armazenadas em ampolas à temperatura ambiente.

#### 4.1.2 Meios de Cultura

##### 4.1.2.1 Meio sólido de cultivo de bactéria.teste

Para o cultivo de *E. coli* ESS 2235 foi utilizado o meio ágar nutriente, indicado pela ATCC (*American Type Culture Collection*), descrito na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1:** Composição do meio ágar nutriente .

Componentes	Concentração (g. L <sup>-1</sup> )
Peptona	5,0
Extrato de Carne	3,0
Agar bacteriológico	15,0
pH	6,8 ± 0,1
Água destilada em q.s.p	1000 mL

##### 4.1.2.2 Meio de esporulação de *S. clavuligerus*

Foi utilizado o meio descrito por Sánchez e Braña (1996) para obtenção de esporos do micro-organismo (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2:** Meio de esporulação *S. clavuligerus* (Sánchez e Braña; 1996).

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Extrato de levedura	0,5
Extrato de carne	0,5
Caseína hidrolisada ácida	1,0
Glicose	5,0
MOPS	21,0
Ágar	20,0
pH 7,0± 0,1	

#### 4.1.2.3 Meio de reativação ou germinação de micélios e de esporos

Para a germinação dos esporos de *S. clavuligerus* foi utilizado o mesmo meio formulado em trabalhos anteriores para este micro-organismo, indicado pela ATCC (meio ISP1), adicionado de extrato de malte (KIESER *et al.*, 2000) (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3:** Composição meio de reativação (MR) ou meio de germinação (MG)

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Triptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	10,0
MOPS	21,0
pH 6,8 ± 0,1	

#### 4.1.2.4 Meio de preparo de inóculo

A composição do meio sintético de preparo de inóculo propostas no presente projeto está apresentada na Tabela 4.4, juntamente com as composições dos meios complexos formulados anteriormente em nossos laboratórios (ANTONIO *et al.*, 2012; BELLÃO *et al.*, 2013; LEITE *et al.*, 2013).

Para a formulação dos meios quimicamente definidos (Tabelas 4.4 e 4.5), as fontes complexas de nitrogênio dos meios complexos foram substituídas por aminoácidos (lisina e glutamato) para minimizar interferentes nos processos de análises. Acrescentaram-se elementos traços ao meio para suprir a ausência de minerais. Os demais componentes foram mantidos, nas mesmas concentrações.



**Tabela 4.4:** Composição dos meios de preparo de inóculo.

Componentes	Concentração (g. L <sup>-1</sup> )	SINTÉTICO	COMPLEXO
Maltose	10,0	X	X
Lisina	4,0	X	
Glutamato de Na	5,5	X	
Extrato de Levedura	1,0	X	X
Proflo® bruto	8,5		X
Proflo® filtrado	8,5		X
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8	X	X
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75	X	X
MOPS	21,0	X	X
	pH 7,2 ± 0,1		
Solução de sais <sup>(a)</sup>	10,0 mL	X	X
Elementos traços <sup>(b)</sup>	1,0 mL	X	

(a) solução de sais (g.L<sup>-1</sup>): MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,0), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0)

(b) solução de elementos traços (g.L<sup>-1</sup>): CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,49), CoCl<sub>2</sub> (0,28), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>(0,15)

#### 4.1.2.5 Meio para produção de biativos por *S. calavuligerus*

A composição do meio de produção sintético está apresentada abaixo (Tabela 4.5), juntamente com a composição do meio complexo utilizado em trabalhos anteriores que tinham como objetivo a produção de CefC (ANTONIO *et al.*, 2012; BELLÃO *et al.*, 2013; LEITE *et al.*, 2013).

**Tabela 4.5:** Composição do meio de produção.

Componente	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	SINTÉTICO	COMPLEXO
Maltose	10,0	X	X
Lisina*	18,3	X	X
Extrato de Levedura	0,5		X
Proflo® filtrado	8,5		X
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,75	X	X
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75	X	X
CaCl <sub>2</sub>	0,2	X	X
NaCl	2,0	X	X
MOPS	21,0	X	X
	pH 7,2 ± 0,1		
Solução de sais <sup>(a)</sup>	5,0 mL	X	X
Elementos traços <sup>(b)</sup>	1,0 mL	X	

(a) solução de sais (g.L<sup>-1</sup>): MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,0), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0)

(b) solução de elementos traços (g.L<sup>-1</sup>): CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,49), CoCl<sub>2</sub> (0,28), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>(0,15)

A partir dos meios formulados anteriormente em nossos laboratórios, foram propostos dois meios contendo lisina e glutamato como fontes de nitrogênio (Tabela 4.6 e 4.7).

**Tabela 4.6:** Meio de produção A

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
MOPS	21,0
Maltose	10,0
Lisina	18,3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,75
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75
CaCl <sub>2</sub>	0,2
NaCl	2,0
Solução de sais <sup>(a)</sup>	5,0 mL
Elementos traços <sup>(b)</sup>	1,0 mL

**(a)** solução de sais (g.L<sup>-1</sup>): MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,0), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0)

**(b)** solução de elementos traços (g.L<sup>-1</sup>): CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,49), CoCl<sub>2</sub> (0,28), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>(0,15)

**Tabela 4.7:** Meio de produção B

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
MOPS	21,0
Maltose	10,0
Lisina	9,2
Glutamato	9,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,75
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75
CaCl <sub>2</sub>	0,2
NaCl	2,0
Solução de sais <sup>(a)</sup>	5,0 mL
Elementos traços <sup>(b)</sup>	1,0 mL

**(a)** solução de sais (g.L<sup>-1</sup>): MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,0), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0)

**(b)** solução de elementos traços (g.L<sup>-1</sup>): CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,49), CoCl<sub>2</sub> (0,28), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>(0,15)

#### 4.1.2.6 Meio de alimentação de cultivo contínuo

A composição do meio suplementar do cultivo contínuo foi a mesma do meio de produção, modificado pelas concentrações de maltose e lisina conforme apresentado na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8:** Componentes do meio de alimentação de cultivo contínuo.

Componentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Maltose	43,0
Lisina	11,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,75
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75
CaCl <sub>2</sub>	0,2
NaCl	2,0
Solução de sais <sup>(a)</sup>	5,0 mL
Elementos traços <sup>(b)</sup>	1,0 mL

**(a)** solução de sais (g.L<sup>-1</sup>): MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,0), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0)

**(b)** solução de elementos traços (g.L<sup>-1</sup>): CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,49), CoCl<sub>2</sub> (0,28), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>(0,15)

#### 4.1.2.7 Meios contendo uma única fonte de C

Foram propostos meios de cultura compostos por uma única fonte de C para estimar os parâmetros cinéticos e estequiométricos de crescimento de *S. clavuligerus* (Tabela 4.9, 4.10 e 4.11).

**Tabela 4.9:** Meio para crescimento de *S. clavuligerus*, apenas com lisina como fonte de C e N.

Componentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
MOPS	21,0
Lisina	15,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,75
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75
CaCl <sub>2</sub>	0,2
NaCl	2
	pH 7,2 ± 0,1
Solução de sais <sup>(a)</sup>	5,0 mL
Elementos traços <sup>(b)</sup>	1,0 mL

**(a)** solução de sais (g.L<sup>-1</sup>): MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,0), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0)

**(b)** solução de elementos traços (g.L<sup>-1</sup>): CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,49), CoCl<sub>2</sub> (0,28), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>(0,15)

**Tabela 4.10:** Meio para crescimento de *S. clavuligerus*, apenas com glutamato como fonte de C e N.

Componentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
MOPS	21,0
Glutamato	13,17
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,75
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75
CaCl <sub>2</sub>	0,2
NaCl	2,0
pH 6,8 ± 0,1	
Solução de sais <sup>(a)</sup>	5,0 mL
Elementos traços <sup>(b)</sup>	1,0 mL

**(a)** solução de sais (g.L<sup>-1</sup>): MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,0), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0)

**(b)** solução de elementos traços (g.L<sup>-1</sup>): CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,49), CoCl<sub>2</sub> (0,28), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>(0,15)

**Tabela 4.11:** Meio para crescimento de *S. clavuligerus*, com maltose e NH<sub>4</sub>Cl como fonte de C e N.

Componentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
MOPS	21,0
Maltose	10,0
NH <sub>4</sub> Cl	6,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,75
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,75
CaCl <sub>2</sub>	0,2
NaCl	2,0
pH 7,2 ± 0,1	
Solução de sais <sup>(a)</sup>	5,0 mL
Elementos traços <sup>(b)</sup>	1,0 mL

**(a)** solução de sais (g.L<sup>-1</sup>): MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,0), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,0)

**(b)** solução de elementos traços (g.L<sup>-1</sup>): CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,49), CoCl<sub>2</sub> (0,28), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>(0,15)

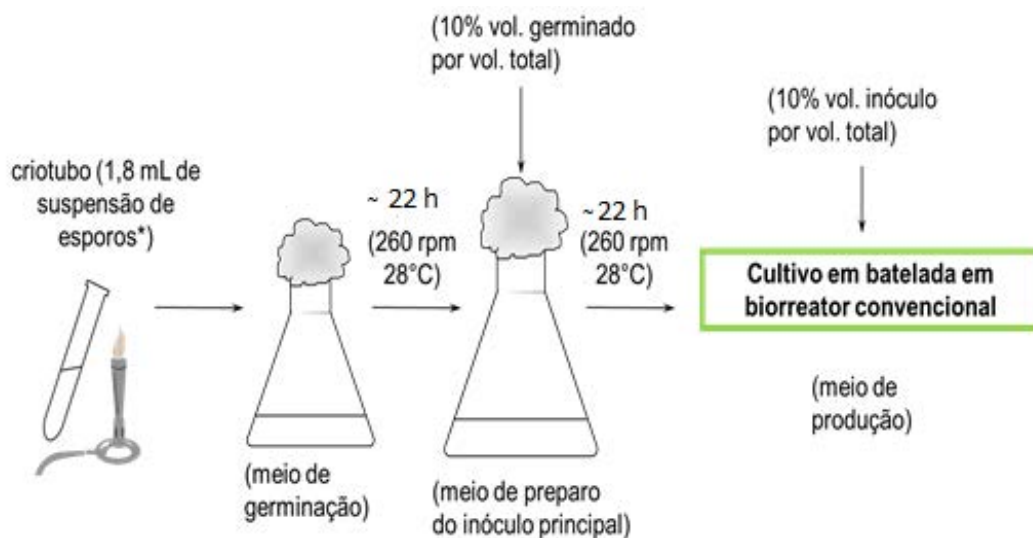
## 4.2 Condições gerais do processo fermentativo

Foram realizados cultivos submersos com a linhagem selvagem (ATCC 27064) e com a linhagem mutante (Hol.80) em regime de batelada (duração de até 72 horas) e cultivo contínuo (120 horas). Cultivos em mesa incubadora rotatória foram realizados em frascos agitados com temperatura controlada em 28°C e frequência de rotação de 260 rpm. O experimento foi desenvolvido em frascos tipo Erlenmeyer com volume útil de 500 mL, utilizando-se 45 mL de meio, para evitar problemas com relação à transferência de O<sub>2</sub> e amostras foram coletadas a cada 24 horas (ca. 6 mL).

Já em biorreator, a temperatura foi controlada em 28°C, o pH em 6,8 (pela adição de HCl 2 mol.L<sup>-1</sup> e NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>) e o O<sub>2</sub> dissolvido em 50% com relação à saturação mantido por uma vazão de ar ajustada em 1 vvm e pela variação automática da velocidade de agitação. O volume reacional foi constante (ca. 1,54 L), e volume de amostragem foi de 10 mL.

Inicialmente os micro-organismos foram transferidos para o meio de reativação descrito na Tabela 4.3, por um período de 22 horas. Após esta etapa de reativação, as bactérias foram transferidas para o meio de preparo de inóculo (Tabela 5.4), onde permaneceram por mais 22 horas. Depois deste período 10% do volume do meio de produção (Tabela 4.5) foi inoculado como representado na Figura 4.1.

**Figura 4.1:** Esquemas das etapas de cultivo de *S. clavuligerus*.



#### 4.2.1 Alimentação dos cultivos

No cultivo contínuo iniciou a alimentação no período de 44 horas, conforme resultados de análise de açúcares. Após este período iniciou-se a etapa contínua com alimentação de meio a 17 mL.h<sup>-1</sup> ( $D = 0,011 \text{ h}^{-1}$ ) e retirada de amostra a cada três horas, ou seja a cada intervalo estabelecido retirava-se uma alíquota de caldo de cultivo e adicionava-se meio fresco. A composição de meio de alimentação encontra-se na Tabela 4.8.

### 4.3 Métodos analíticos

#### 4.3.1 Coleta de amostras, armazenagem do sobrenadante e determinação de biomassa.

Após a coleta de amostra, o caldo cultivo foi centrifugado por 10 minutos, a  $15500 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi armazenado em *ultrafreezer* ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) para as análises de consumo das fontes de C e N, quantificação de CepC totais, AC, Hol e proteínas totais secretadas. O decantado contendo a massa celular foi lavado duas vezes com água destilada para a remoção de impurezas, a massa celular resultante foi seca em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$ , por 18 a 24 horas, em recipiente adequado e previamente pesado. Passado este período, o recipiente contendo a biomassa seca seguiu para um dessecador e, após atingir a temperatura ambiente, foi pesado, sendo sua concentração expressa em  $\text{g.L}^{-1}$ .

#### 4.3.2 Quantificação de CefC

##### 4.3.2.1 Construção da curva de calibração

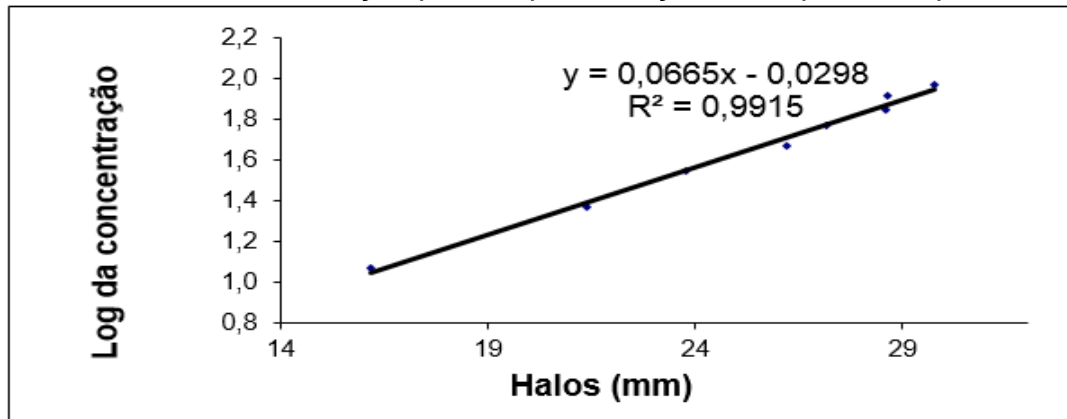
O antibiótico CefC foi quantificado por bioensaio de difusão em ágar de acordo com o método descrito por LIRAS e MARTÍN (2005). Em virtude da indisponibilidade do padrão de CefC, a dosagem deste composto foi realizada utilizando como padrão CepC, devido à semelhança de halos de inibição produzidos por estes dois bioativos. Desta forma, o antibiótico produzido foi quantificado de forma indireta e expresso em termos de concentração de Cefalosporinas totais (CepC totais, em  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Para aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos por meio de bioensaio construiu-se uma curva de calibração. Foram utilizados cefalosporina C como antibiótico padrão e *E. coli* ESS 2235 (super sensível a antibióticos  $\beta$ .lactâmicos) como micro-organismo teste (LIRAS e MARTÍN, 2005)

Oito concentrações de cefalosporina C (10, 20, 30, 40, 50, 70, 80 e  $90 \text{ mg.L}^{-1}$ ) com dezesseis replicatas para cada concentração foram utilizadas para construir a curva de calibração e para quantificação do antibiótico, que correlacionavam o diâmetro do halo de inibição com o log da concentração de antibióticos.

O bom ajuste da curva (Figura 4.2) obtida, evidenciado pelo seu coeficiente de determinação ( $r^2 = 0,99$ ) aliado ao número de concentrações testadas,

proporcionou confiabilidade a curva validando seu uso para quantificar o antibiótico produzido por *S. clavuligerus*.

**Figura 4.2:** Curva de calibração para a quantificação de CepC totais por bioensaio.



#### 4.3.2.2 Preparo das placas para o bioensaio

Uma suspensão bacteriana foi preparada com solução salina 0,9 massa/volume, com absorbância igual a 1,000 em leitura a 600 nm. A cada 100 mL de ágar nutriente foram adicionado 1 mL desta suspensão e, após a adição, o meio foi vertido em placas de Petri. Com o ágar sólido, este foi perfurado formando poços com 5 mm de diâmetro.

#### 4.3.2.3 Preparo das amostras

Para o preparo das amostras, ainda, adicionou-se uma proporção de 20  $\mu$ L de enzima BD Difco™ Penase® por mL de amostra, com reação durante 20 minutos, para eliminar penicilina N que possivelmente existisse na amostra e pudesse interferir nos resultados de bioensaio. A solução enzimática foi adicionada às amostras diluídas para que fosse minimizado o efeito de inibição de AC sobre a enzima.

#### 4.3.2.4 Aplicação das amostras, incubação e leitura de halos

Foram adicionados 20  $\mu$ L das soluções preparadas de amostras e de padrão de antibiótico em cada poço perfurado. Após a aplicação as placas foram incubadas a 30°C, durante 18 horas, então, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e a concentração de CefC totais foi calculada por meio de curva de calibração.

### 4.3.3 Quantificação de AC

AC foi quantificado por meio do método espectrofotométrico proposto por Bird *et al.* (1982). As amostras foram previamente derivatizadas com imidazol (60 g.L<sup>-1</sup>) por 12 minutos a 30°C e após a reação, as soluções foram resfriadas em banho termostático a 20°C. O produto da reação (1-(4-aza-8-hydroxy-6-oxo) oct-2-em-1-oylimidazol) foi determinado por meio de leitura em espectrofotômetro a 312 nm. Com o auxílio de uma curva de calibração foi determinada a concentração de AC em mg.L<sup>-1</sup>.

### 4.3.4 Quantificação de Hol

#### 4.3.4.1 Extração e purificação de Hol presente no caldo de cultivo

Hol produzida por Hol.80 foi purificada partindo-se de 2 L de meio de cultivo. Um indicativo da produção deste biocomposto é a coloração amarelo-ouro do caldo de cultivo ao longo do processo.

Para separar Hol do meio de cultura realizou-se uma extração líquido-líquido com butanol (KENIG e READING, 1979). O biocomposto contido na fração butanólica foi, então, analisado em HPLC acoplado a um detector UV (SPD.20A Shimadzu), utilizando-se uma coluna C18 (300 x 4.9 mm, com tamanho de partícula 10 µm), com leitura a 360 nm. Os picos foram coletados com tempo de retenção de 4 minutos e fase móvel metanol: água.

A mistura em metanol e água foi evaporada em rotaevaporador, sendo que a fração sólida já seca foi solubilizada somente em água e depois liofilizada. Depois a amostra foi ressuspensa em acetato de etila gerando duas frações, uma solúvel e outra insolúvel. Ambas as frações foram submetidas à espectrometria de massa (Bruker Amazon SL).

#### 4.3.4.2 Curva de calibração de Hol

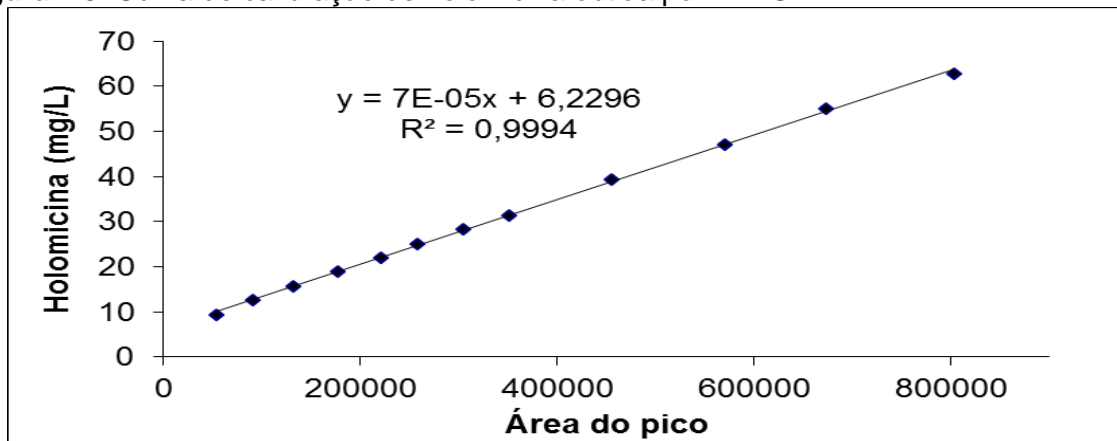
Com Hol purificada foi necessário construir uma curva de calibração para permitir a quantificação deste biocomposto por HPLC.

A curva foi construída com sete concentrações (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 mg.L<sup>-1</sup>) e injeções realizadas em duplicata. O número de concentrações testadas juntamente com o coeficiente de determinação do ajuste ( $r^2 = 0,99$ ) proporcionou



confiabilidade à curva de calibração, validando seu uso para quantificar do biocomposto (Figura 4.3).

**Figura 4.3:** Curva de calibração de holomicina obtida por HPLC.



#### 4.3.5 Análise de Maltose

A análise de maltose foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu LC.20AT), utilizando-se um detector de índice de refração (Modelo RID.10A/ Shimadzu). O método foi isocrático, tendo como fase móvel 100% de água, utilizando-se uma coluna Shim.Pack SCR.101P (7,9 mm x 30 cm), forno a 80°C e fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. O tempo de retenção médio foi de 11,8 minutos.

#### 4.3.6 Análise de Lisina

A lisina foi analisada em HPLC acoplado a detector de índice de refração, utilizando-se uma coluna Shim.Pack AnimoNa, a 60°C. A programação da fase móvel consistiu de: borato de sódio 0,05 mol.L<sup>-1</sup> (solvente A), NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (solvente B), com fluxo constante de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. Foi utilizada a seguinte condição de eluição para a quantificação do aminoácido: 0 - 25 min 100% A, 25 - 30 min 100% B, 30 - 35 min 100% B, 35 - 40 min 0-100% A e 40 - 55 min 100% A. Neste método, o tempo de retenção para a lisina gira em torno de 20,3 minutos.

#### 4.3.7 Análise de Glutamato

O consumo de glutamato foi determinado por um método adaptado em nossos laboratórios. Utilizou-se HPLC acoplado a detector de índice de refração, uma coluna Shim.Pack AnimoNa, a 60°C. A programação da fase móvel consistiu

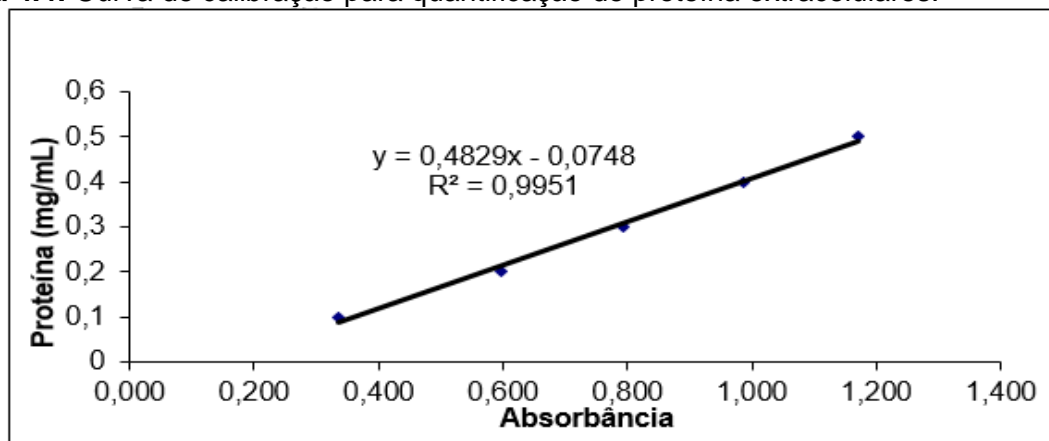
de: citrato de sódio  $0,07 \text{ mol.L}^{-1}$  (solvente A), NaOH  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (solvente B), com fluxo constante de  $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ . Foi utilizada a seguinte condição de eluição para a quantificação do aminoácido: 0 - 10 min 100% A, 10 – 15 min 100% B, 15 – 25 min 100% B, 25 – 30 min 0–100% A e 30 – 50 min 100% A. O tempo de retenção neste método gira em torno de 7,5 minutos.

#### 4.3.8 Análise de proteínas extracelulares

Para a dosagem de proteína extracelular das amostras, padronizou-se o método de Lowry *et al.* (1951) modificado por Hartree (1972). Utilizou-se como padrão soroalbumina bovina em cinco concentrações ( $0,1$  a  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), em triplicata para construção de uma curva de calibração. As proteínas totais lidas neste método foram expressas sob a terminologia Proteína externa, tendo como unidade  $\text{g.L}^{-1}$ .

A Figura 4.4 mostra a curva de calibração para quantificação de proteínas extracelulares. A regressão linear resultou em um coeficiente de determinação de  $r^2 = 0,99$ , conferindo à curva de calibração confiabilidade para uso na determinação da concentração de proteína extracelular das amostras.

**Figura 4.4:** Curva de calibração para quantificação de proteína extracelulares.



#### 4.3.9 Análise de CO<sub>2</sub>

A análise de CO<sub>2</sub> na saída de gases do biorreator foi realizada com Analisador de gases (O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) modelo BlueInOne da BlueSens. A concentração de CO<sub>2</sub> emitido foi medido em % de CO<sub>2</sub>, e o acúmulo do gás (em  $\text{mmol CO}_2.\text{gcél}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) no biorreator durante o intervalo de tempo escolhido para a simulação foi determinado utilizando-se a equação de gás ideal ( $P \cdot V = n \cdot R \cdot T$ ).

#### 4.3.10 Simulação de parâmetros cinéticos

As Equações Diferenciais Ordinárias (EDOs) dos modelos foram integradas utilizando-se o *software* livre Scilab (versão 5.4.1) e os parâmetros cinéticos e estequiométricos foram estimados utilizando-se o algoritmo de Marquardt de regressão não linear (MARQUARDT, 1963), a 95% de grau de confiança, implementado em linguagem Fortran.

#### 4.3.11 Simulação dos modelos metabólicos

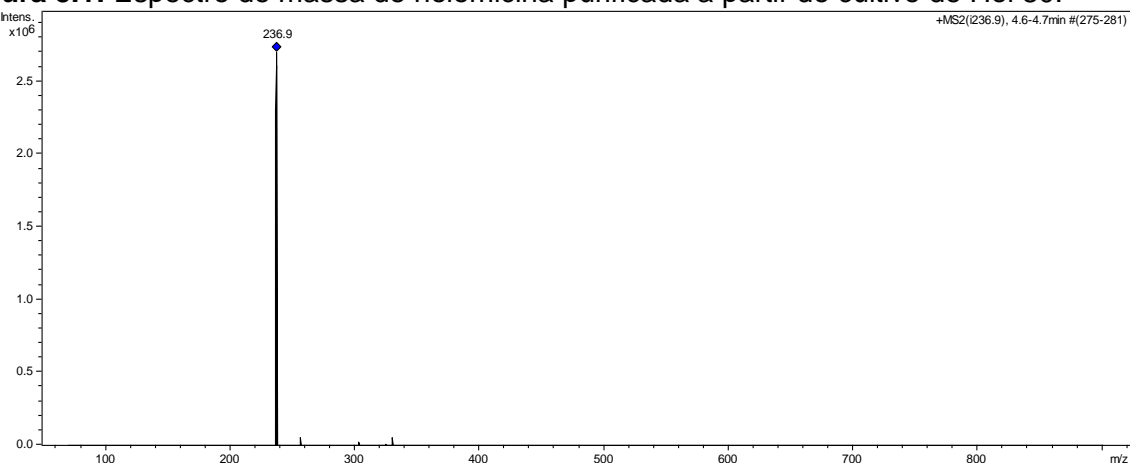
Utilizou-se o programa computacional específico Optflux, versão 3, disponível em: [www.optflux.org](http://www.optflux.org). Para simulação dos dados a técnica AEF foi escolhida, estabelecendo como função objetivo a maximização de energia.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Extração e Purificação de Hol

Após o processo de purificação, a fração solúvel foi submetida à injeção no espectro de massa, onde foi obtido apenas um pico (Figura 5.1), com massa molecular correspondente a 236,9, indicando que junto à holomicina (massa molecular = 214) haveria um átomo de sódio (massa molecular = 22,99). Este resultado demonstrou a eficiência do método de purificação desenvolvido e utilizado.

**Figura 5.1:** Espectro de massa de holomicina purificada a partir do cultivo de Hol 80.



## 5.2 Padronização de meio de cultura e condições de cultivos

A produção de um determinado metabólito secundário por um micro-organismo depende de inúmeros fatores, dentre os quais a composição apropriada de um meio de cultura é um dos mais importantes. Desde o início dos estudos com *S. clavuligerus* por nosso Grupo de Pesquisa, já foram investigados meios complexos direcionados para a produção de AC e/ou CefC (DOMINGUES *et al.*, 2010; ANTONIO *et al.*, 2012; BELLÃO *et al.*, 2013). O meio complexo para a produção de CefC serviu como base para a proposição de um meio totalmente sintético a ser utilizado no presente projeto. Meios sintéticos permitem análises mais precisas porque, sendo quimicamente definidos, seus componentes estão livres das variações que normalmente ocorrem em meios complexos que contêm certas fontes complexas de nitrogênio, como farinha de soja ou água de maceração de milho devido, sujeitas à sazonalidade. Por isto, o uso de meios sintéticos neste trabalho permitiu obter dados adequados de concentrações dos componentes durante os cultivos para a determinação de rendimentos estequiométricos que serão utilizados no estudo de distribuição de fluxos.

A seguir, são apresentados resultados de concentração celular, consumo das principais fontes de carbono e energia (maltose) e de nitrogênio (lisina e/ou glutamato), e de formação de compostos bioativos (AC, CefC e Hol) obtidos em cultivos realizados em frascos agitados.

### 5.2.1 Cultivos em frascos agitados em meios sintéticos para a produção de bioativos

Foram realizados cultivos submersos em frascos agitados visando monitorar a formação de biomassa, consumo de substratos e os bioativos produzidos pela linhagem selvagem (ATCC 27064) e pela linhagem mutante (Hol.80).

#### 5.2.1.1 Cultivo em meio sintético contendo lisina como fonte de nitrogênio

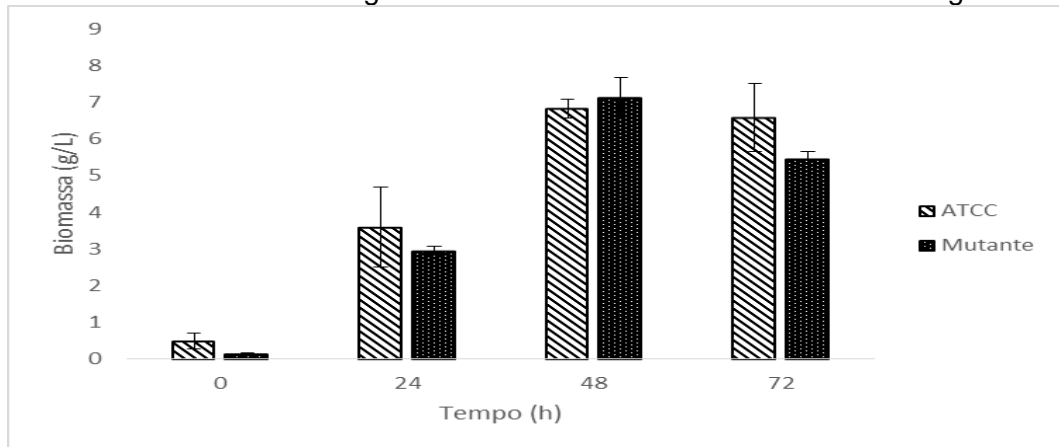
O efeito positivo da lisina no meio para produção de antibióticos  $\beta$  – lactâmicos em *S. clavuligerus* tem sido amplamente divulgado na literatura (DEMAIN e VAISHNAV, 2006). A seguir estão apresentados os dados de cultivo do micro-organismo em meio contendo este aminoácido como fonte de nitrogênio.

Pela Figura 5.2 pode-se observar que o crescimento celular foi semelhante no período de 48 horas nas duas linhagens, atingindo em torno de  $7 \text{ g.L}^{-1}$  de células.

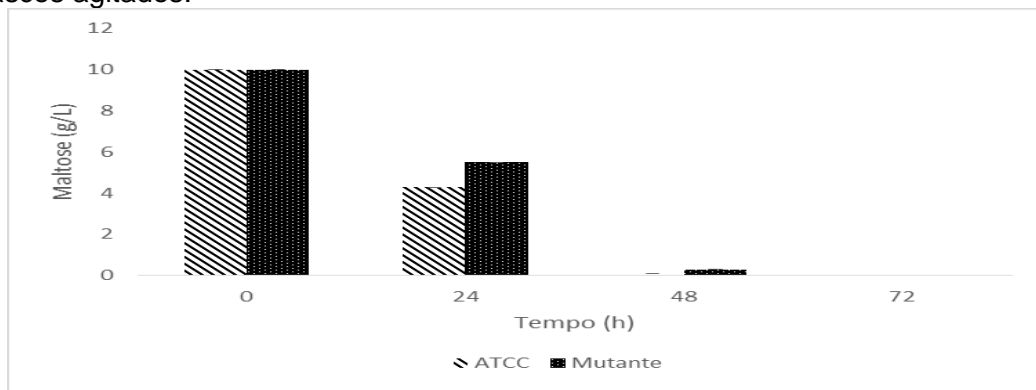
Em 72 horas a massa celular do ATCC apresentou-se entre 6,5 e 7 g.L<sup>-1</sup>, enquanto a biomassa de Hol.80 caiu para 5,5 g.L<sup>-1</sup> evidenciando a morte celular do microorganismo. A queda no crescimento celular coincide com a exaustão da maltose em 48 horas utilizada como fonte de carbono em ambas as linhagens como observado na Figura 5.3.

Já a fonte de nitrogênio lisina foi consumida lentamente pelas duas linhagens utilizadas, terminando o cultivo com uma concentração residual de 7 g.L<sup>-1</sup> (Figura 5.4).

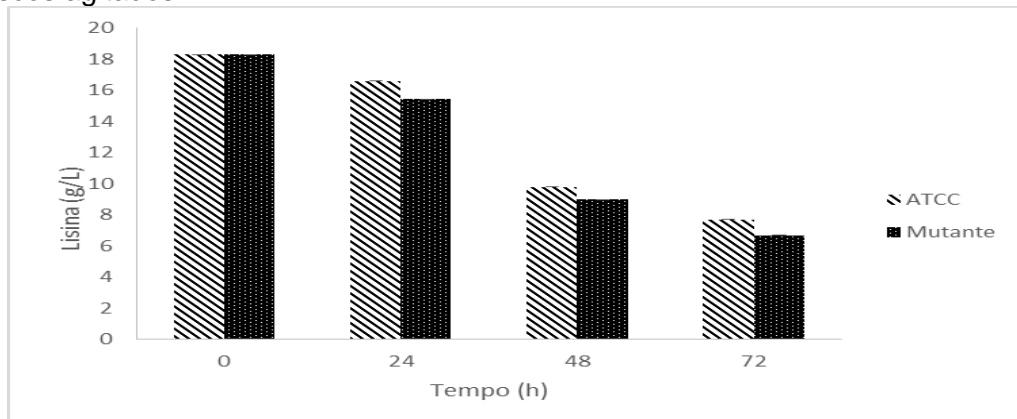
**Figura 5.2:** Biomassa obtida durante o processo fermentativo com meio sintético com apenas lisina como fonte de nitrogênio de ATCC 27064 e Hol 80 em frascos agitados.



**Figura 5.3:** Consumo de maltose durante o processo fermentativo de ATCC 27064 e Hol 80 em frascos agitados.



**Figura 5.4:** Consumo de lisina durante o processo fermentativo de ATCC 27064 e Hol 80 em frascos agitados.



Nas Figuras 5.5, 5.6 e 5.7 (AC, CefC e Hol) estão apresentados os perfis de produção por Hol.80 e ATCC. Pelos dados apresentados na Figura 5.5 pode-se observar que Hol.80 produziu baixas concentrações de AC, aproximadamente 20 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto o ATCC produziu seis vezes mais (cerca de 126 mg.L<sup>-1</sup>). Logo, concluiu-se que a linhagem mutante obtida em nossos laboratórios não é um expressivo produtor de AC comparada à linhagem selvagem. Esta baixa produção é normalmente característica de linhagens melhores produtoras de Hol, que apresentam bloqueios na segunda metade da rota biossintética de AC (pós. formação de ácido clavamínico) (FUENTE *et al.*, 2002; LIRAS e MARTÍN, 2006; LI e WALSH, 2010).

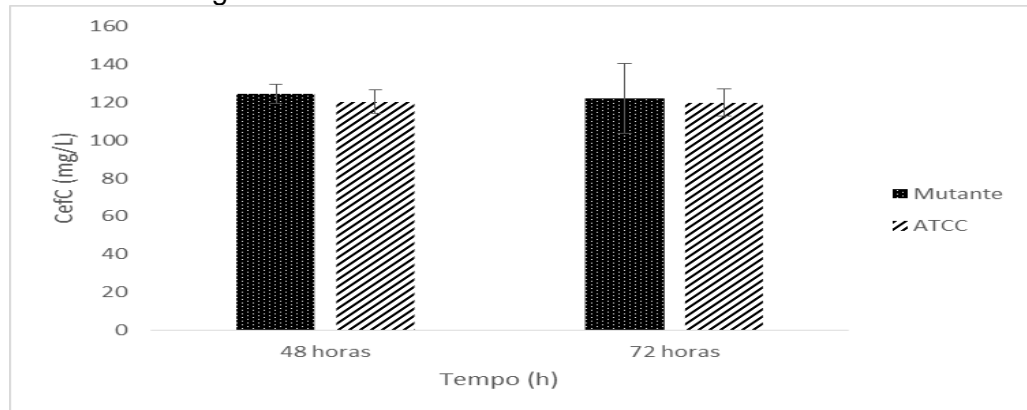
**Figura 5.5:** Produção de AC por *S. clavuligerus* selvagem ATCC 27064 e mutante Hol 80, obtidos em 48 e 72 horas de processo em frascos agitados.



Para auxiliar na determinação das concentrações do antibiótico dos cultivos em frascos agitados realizados com a linhagem selvagem (ATCC 27064) e com a linhagem mutante (Hol.80) utilizou-se uma curva de calibração. A linhagem mutante produziu aproximadamente 125 mg.L<sup>-1</sup> de CepC totais em 48 horas de cultivo,

enquanto o ATCC produziu cerca de  $120 \text{ mg.L}^{-1}$  no mesmo período (Figura 5.6). No período de 72 horas Hol.80 apresentou uma pequena queda na produção enquanto ATCC manteve a produção de  $120 \text{ mg.L}^{-1}$ . Com estes resultados, pode-se concluir que a produção de CepC totais foi da mesma ordem de grandeza entre as estirpes.

**Figura 5.6:** Produção de CefC por Hol 80 e ATCC 27064 no período de 48 e 72 horas de processo em frascos agitados.

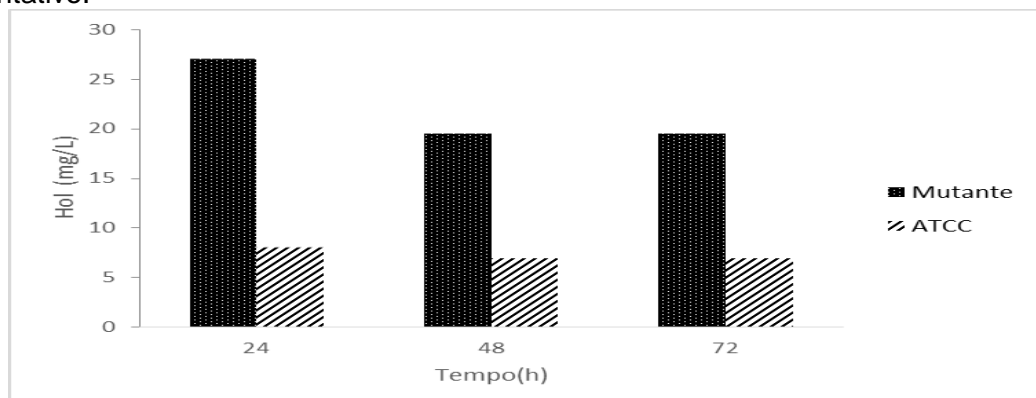


A produção de Hol foi monitorada entre as duas linhagens. Os micro-organismos foram cultivados por 72 horas, com amostras retiradas a cada 24 horas.

Como apresentado na Figura 5.7 o mutante destacou-se na produção de Hol produzindo aproximadamente  $27 \text{ mg.L}^{-1}$ , enquanto a linhagem selvagem produziu três vezes menos (ca.  $8 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Estes resultados são indicativos de que a linhagem Hol.80 deve ter em seu genoma danos relacionados à biossíntese de AC.

Também, é perceptível que o ápice da produção aconteceu em 24 horas, já que após este período a produção foi um pouco menor e se manteve constante até o fim do processo.

**Figura 5.7:** Produção de holomicina por ATCC 27064 e Hol 80 durante o processo fermentativo.



Fang *et al* (1996) utilizaram concentrações de 10 a 20 mmol.L<sup>-1</sup> de lisina em meio quimicamente definido, obtendo aumentos de 50 a 100% na produção de antibióticos. Com 100 mmol.L<sup>-1</sup> do aminoácido, estes pesquisadores observaram um aumento de 500% na produção de CefC (120 mg.L<sup>-1</sup>) com relação ao meio sem lisina (10 mg.L<sup>-1</sup> de CefC). Estudos em nossos laboratórios também têm demonstrado este efeito positivo na produção do antibiótico CefC. Foram obtidos máximos de produção em torno de 150 mg.L<sup>-1</sup> de CefC utilizando-se 100 mmol.L<sup>-1</sup> de lisina (18,3 g.L<sup>-1</sup>) em cultivos da linhagem selvagem (ANTONIO *et al.*, 2012).

De maneira geral, nos presentes cultivos, observou-se que a combinação maltose e lisina (meio de cultura A) favoreceu a produção de maiores concentrações de AC e CefC em torno de 48 horas de processo na linhagem selvagem, enquanto na linhagem mutante esta combinação favoreceu concentrações satisfatórias apenas para CefC e Hol, em 48 horas e 24 horas de cultivo respectivamente.

#### **5.2.1.2 Cultivo em meio sintético contendo lisina e glutamato como fontes de nitrogênio**

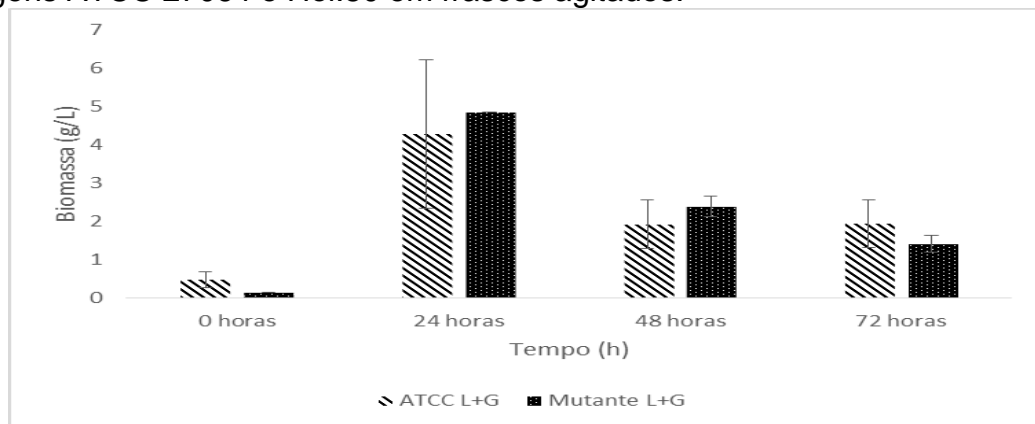
Análises de fluxos metabólicos simulados em projeto de Doutorado, e também referentes ao presente trabalho, indicaram que a produção de maiores concentrações de CefC requer modificações no metabolismo de nitrogênio. Propôs-se, assim, um meio de cultivo composto por lisina e glutamato, o qual é um dos produtos do catabolismo da lisina. A adição de glutamato juntamente com lisina visou disponibilizar um maior suprimento deste último para a produção de CefC. A composição proposta foi de 50 mmol.L<sup>-1</sup> de lisina e 50 mmol.L<sup>-1</sup> de glutamato.

Foram realizados cultivos submersos em frascos agitados com a linhagem ATCC 27064 e com a linhagem mutante Hol.80, sendo monitoradas a formação de biomassa, o consumo de maltose, lisina e glutamato, e a produção dos bioativos produzidos.

A Figura 5.8 mostra a biomassa obtida durante o processo fermentativo. O crescimento celular da linhagem ATCC 27064 e da linhagem Hol.80 foram semelhantes. As linhagens atingiram sua biomassa máxima em 24 horas de cultivo (4,28 g.L<sup>-1</sup> ATCC 27064 e 4,86 g.L<sup>-1</sup> Hol.80). Após este período houve um declínio de células no caldo fermentativo, onde a concentração celular apresentou valores de 1,94 g.L<sup>-1</sup> para a linhagem selvagem e 1,42 g.L<sup>-1</sup> para a linhagem mutante.



**Figura 5.8:** Biomassa obtida durante processo fermentativo em meio sintético contendo lisina e glutamato como fontes de nitrogênio (L+G) utilizando-se as linhagens ATCC 27064 e Hol.80 em frascos agitados.

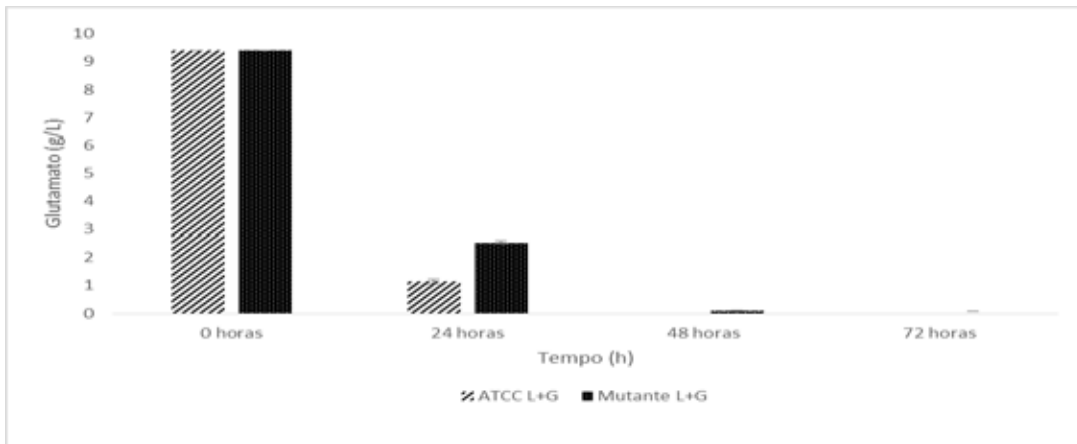


QIN *et al.* (2013) realizaram estudos em nível molecular em um patógeno de peixe também produtor de holomicina, *Yersinia ruckeri*, e identificaram um gene que codifica uma enzima RNA metiltransferase que confere resistência ao antibiótico produzido. Esta resistência permite que o micro-organismo continue a produzir o biocomposto sem afetar o crescimento celular. Estes experimentos também foram realizados com *S. clavuligerus*, no qual não se observou a presença deste gene de resistência à Hol. Desta forma, o decréscimo de biomassa observado está diretamente relacionado às altas concentrações de Hol obtidas em meio contendo glutamato e lisina como fontes de nitrogênio, como será apresentado adiante. Este comportamento na evolução da biomassa não foi observado em meio contendo apenas lisina como fonte de nitrogênio, uma vez que não houve produção de Hol. Outro fator que pode estar relacionado com a queda brusca da biomassa é a exaustão de uma das fontes de nitrogênio. A Figura 5.9 representa o consumo do glutamato pelas linhagens selvagem e mutante ao longo do processo. Observou-se que o aminoácido foi praticamente consumido até 48 horas de cultivo.

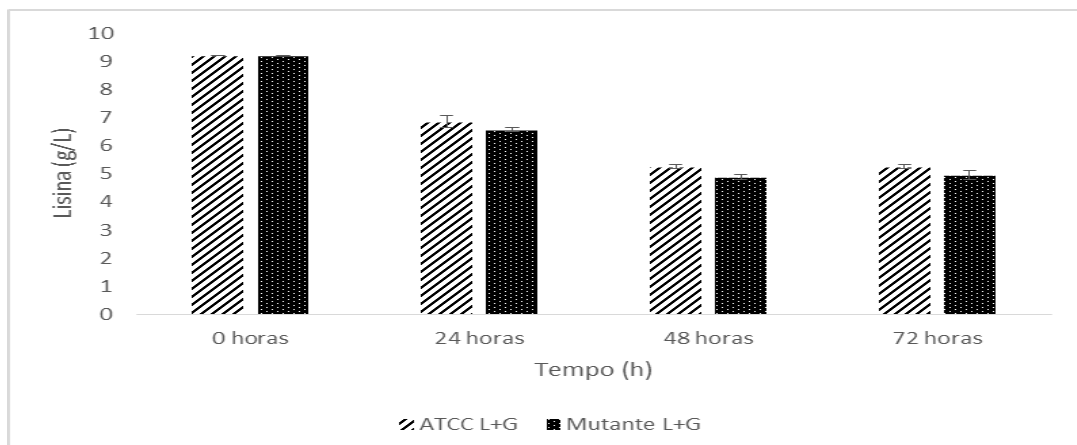
Quanto a lisina, de acordo com a Figura 5.10 observou-se que seu consumo foi lento em ambas as linhagens (ATCC 27064 e Hol.80), verificando-se um residual de aproximadamente  $5 \text{ g.L}^{-1}$  ao final das 72 horas de processo fermentativo.

A maltose foi consumida lentamente até o fim do cultivo por ambas as linhagens. Ao final do processo, observou-se um residual deste açúcar de aproximadamente  $3 \text{ g.L}^{-1}$  (Figura 5.11).

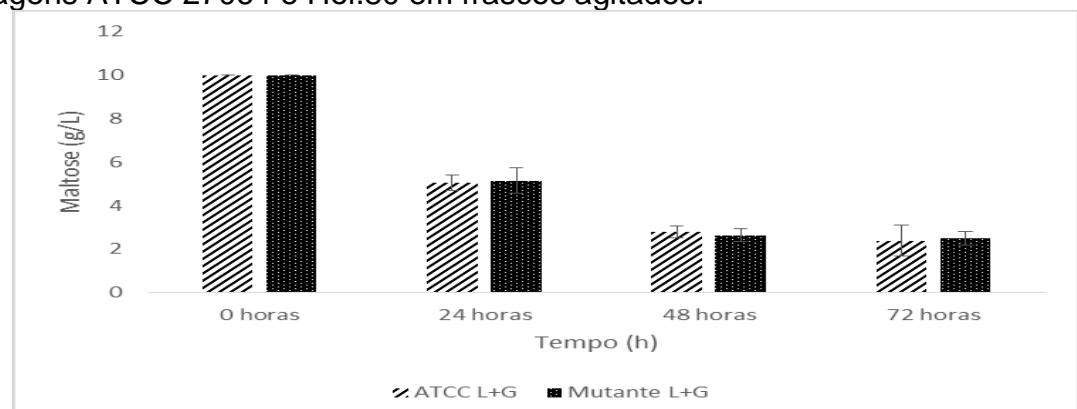
**Figura 5.9:** Consumo de glutamato durante o processo fermentativo com meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio entre as linhagens ATCC 27064 e Hol.80 em frascos agitados.



**Figura 5.10:** Consumo de lisina durante processo fermentativo em meio sintético contendo lisina e glutamato (L+G) como fontes de nitrogênio utilizando-se as linhagens ATCC 27064 e Hol.80 em frascos agitados.



**Figura 5.11:** Consumo de maltose durante processo fermentativo em meio sintético contendo lisina e glutamato (L+G) como fontes de nitrogênio utilizando-se as linhagens ATCC 27064 e Hol.80 em frascos agitados.

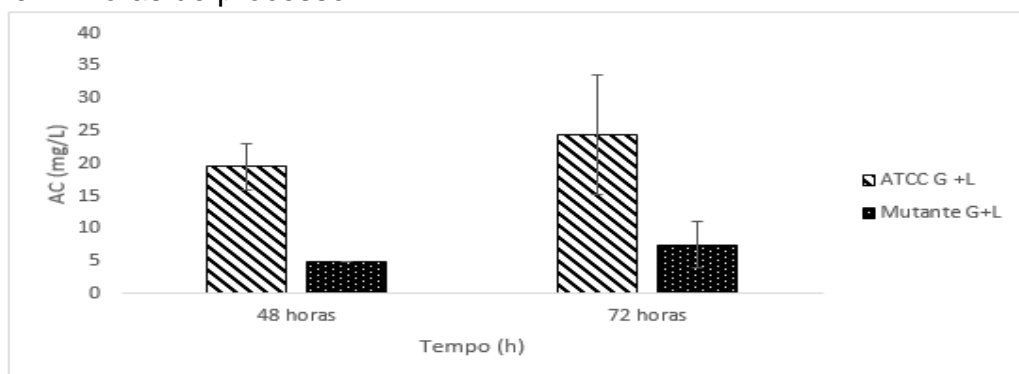


Comparando-se o consumo de maltose nos meios sintéticos contendo como fonte(s) de nitrogênio apenas lisina (meio A) e lisina e glutamato (meio B), observou-se que o consumo do açúcar foi mais lento no meio B. Como mencionado, neste meio o residual foi de aproximadamente de  $3 \text{ g.L}^{-1}$  ao término do processo, enquanto que no meio A, a maltose foi totalmente consumida em 48 horas de processo. Já o comportamento das linhagens com relação ao consumo de lisina foi o mesmo em ambos os meios. Porém, devido ao decréscimo da concentração celular em meio B, as concentrações residuais tanto de maltose quanto de lisina foram bem maiores do que no meio A. O total consumo de glutamato sugere que este aminoácido exerça papel importante como fonte de energia e/ou manutenção, apesar do drástico decréscimo da concentração celular.

Os dados de produção de biocompostos estão apresentados a seguir nas Figuras 5.12, 5.13 e 5.14 respectivamente para AC, CefC e Hol. Pela Figura 5.12 pode-se observar que ambas as linhagens produziram baixas concentrações de AC. No entanto o ATCC 27064 produziu concentrações maiores, cerca de  $25 \text{ mg.L}^{-1}$  em 72 horas de cultivo, enquanto Hol.80 produziu apenas  $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$  no mesmo período.

Estes resultados mostraram que este meio não favorece a produção de AC e que a linhagem mutante, em qualquer meio de cultura, não é produtora de concentrações significativas deste biocomposto, evidenciando as características genéticas do mutante desfavoráveis à biossíntese de AC.

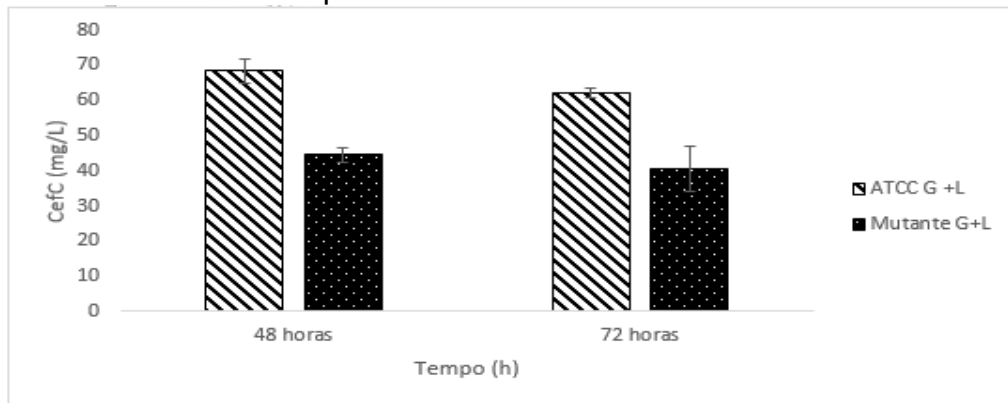
**Figura 5.12:** Produção de AC por *S. clavuligerus* selvagem ATCC 27064 e mutante Hol 80 em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio, obtidos em 48 e 72 horas de processo.



Na Figura 5.13 estão apresentados os dados obtidos da produção de CefC pelas linhagens selvagem e mutante. Observou-se que o ATCC 27064 produziu

cerca de  $70 \text{ mg.L}^{-1}$  em 48 horas de processo fermentativo e Hol.80 produziu cerca de  $45 \text{ mg.L}^{-1}$  no mesmo período. No período de 72 horas observou-se uma pequena queda na produção de ambos os micro-organismos ( $62 \text{ mg.L}^{-1}$  por ATCC 27064 e  $40,5 \text{ mg.L}^{-1}$  por Hol.80).

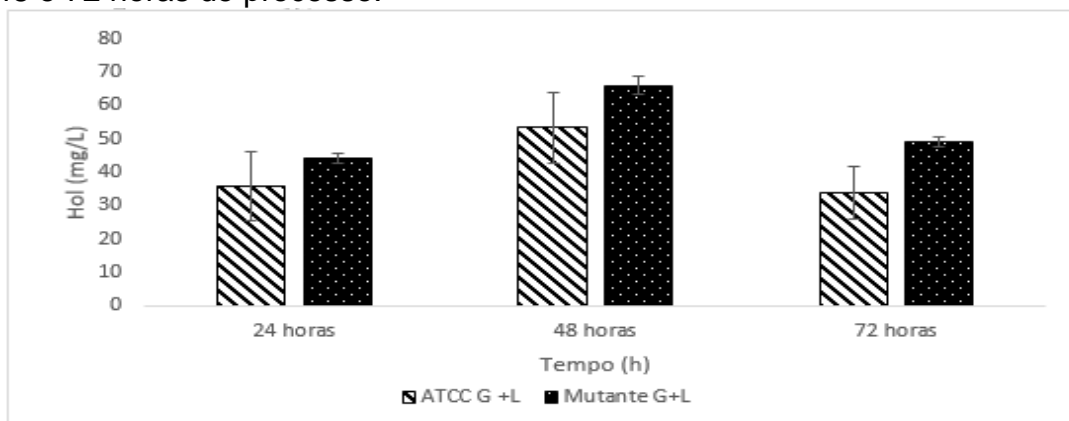
**Figura 5.13:** Produção de CefC por *S. clavuligerus* selvagem ATCC 27064 e mutante Hol 80 em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio, obtidos em 48 e 72 horas de processo.



Neste meio, a linhagem selvagem mostrou-se um melhor produtor comparando-se ao Hol.80, apesar das baixas concentrações de CefC produzidas.

Comparando-se os resultados obtidos de Hol (Figura 5.14) verificou-se que o patamar máximo de produção de deste bioativo foi obtido em 48 horas de processo fermentativo. Observaram-se valores médios de  $66 \text{ mg.L}^{-1}$  por Hol.80 e de  $53 \text{ mg.L}^{-1}$  por ATCC 27064 neste período.

**Figura 5.14:** Produção de Hol por *S. clavuligerus* selvagem ATCC 27064 e mutante Hol 80 em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio, obtidos em 48 e 72 horas de processo.



Com relação aos biocompostos obtidos em cultivos utilizando o meio de cultura B, notou-se que as concentrações de AC e CefC não foram satisfatórias, porém a produção de Hol foi favorecida para ambas as linhagens, atingindo a produção máxima em 48 horas de cultivo.

### 5.3 Crescimento das linhagens em única fonte de C: Maltose, lisina e glutamato.

Foram realizados cultivos para levantar dados cinéticos de crescimento de *S. clavuligerus* em meios contendo uma única fonte de C. Utilizaram-se para germinação e preparo de inóculo os mesmos meios de cultura descritos nas Tabelas 4.3 e 4.4. Para o cultivo em maltose foi utilizada uma fonte inorgânica de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), considerando-se uma proporção C:N compatível com a dos dois aminoácidos (lisina e glutamato).

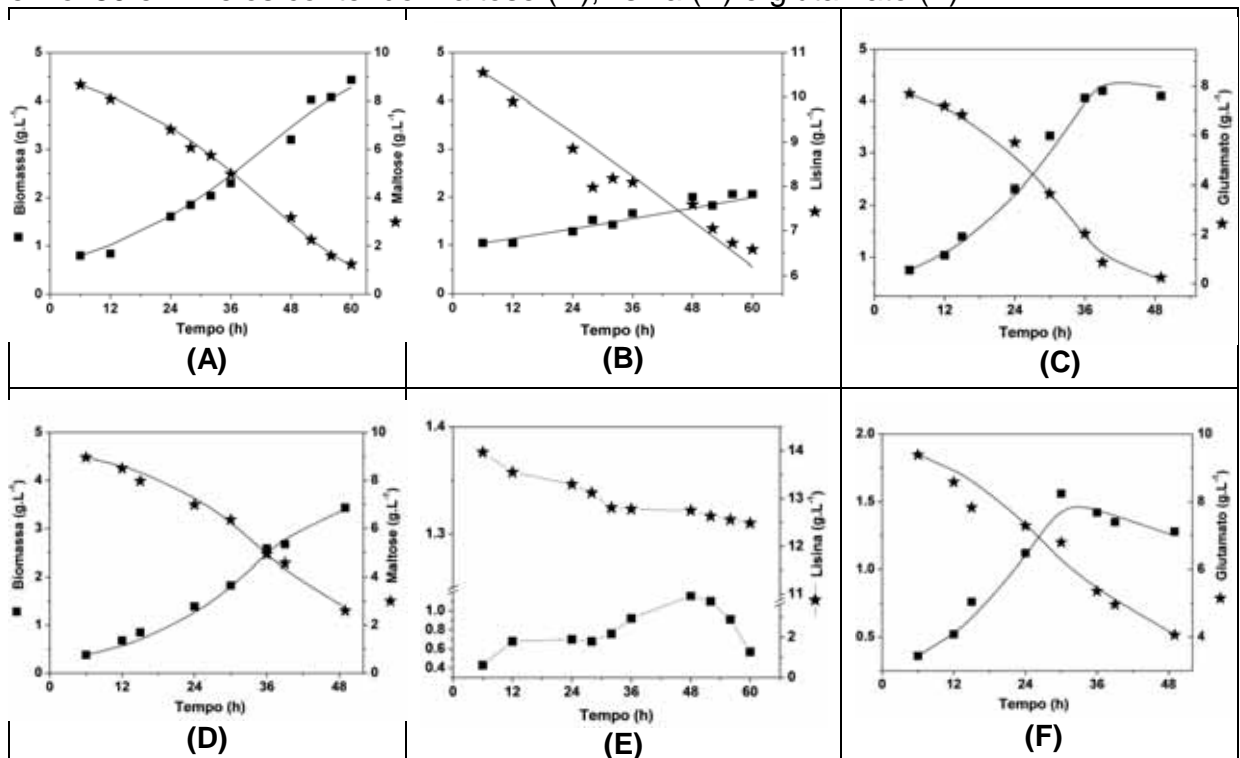
Para a simulação e modelagem matemática dos cultivos, os dados de biomassa e de substratos obtidos até 6 horas foram descartados, uma vez que análises mostraram um residual de lisina e glutamato provenientes do meio do inóculo. Após este período, dados de biomassa, maltose, lisina e glutamato possibilitaram ajustes de modelos cinéticos de crescimento segundo o modelo clássico de Monod (1949). Desta forma, foram estimados os valores de velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e da constante de saturação ( $k_s$ ). Também, foram determinados coeficientes de rendimento de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ).

O ajuste do modelo de Monod aos dados experimentais de crescimento de *S. clavuligerus* ATCC 27064 e do mutante Hol 80 estão apresentados na Figura 5.15. Para a linhagem selvagem, o modelo ajustou-se bem em todos os substratos (Figs. 6.18A a 6.18C). Os valores estimados de velocidade específica máxima de crescimento e a constante de Monod para maltose, lisina e glutamato foram  $\mu_{\text{máxMalt}} = (0,065 \pm 0,005) \text{ h}^{-1}$  e  $k_{\text{Malt}} = (5,3 \pm 0,8) \text{ g}_{\text{Malt}} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\mu_{\text{máxLis}} = (0,075 \pm 0,004) \text{ h}^{-1}$  e  $k_{\text{Lis}} = (49,2 \pm 6,5) \text{ g}_{\text{Lis}} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $\mu_{\text{máxGlut}} = (0,072 \pm 0,004) \text{ h}^{-1}$  e  $k_{\text{Glut}} = (1,27 \pm 0,37) \text{ g}_{\text{Glut}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Os valores estimados de coeficiente de rendimento de substrato a células foram (em  $\text{g}_{\text{cél}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ )  $Y_{X/\text{Malt}} = 0,46 \pm 0,01$ ,  $Y_{X/\text{Lis}} = 0,23 \pm 0,03$  e  $Y_{X/\text{Glut}} = 0,58 \pm 0,01$ . Com base nos resultados, pode-se verificar que a utilização de lisina, maltose ou glutamato como fonte de C promoveu o crescimento de *S. clavuligerus* ATCC 27064, embora o rendimento a células em lisina tenha sido claramente menor.

Para a linhagem Hol 80 (Figs 5.15D a F), os valores estimados de velocidade específica máxima de crescimento e da constante de Monod foram, respectivamente para maltose e glutamato,  $\mu_{\text{máxMalt}} = (0,104 \pm 0,009) \text{ h}^{-1}$  e  $k_{\text{Malt}} = (4,83 \pm 1,05) \text{ g}_{\text{Malt}} \cdot \text{L}^{-1}$ .  $\mu_{\text{máxGlut}} = (0,102 \pm 0,004) \text{ h}^{-1}$  e  $k_{\text{Glut}} = (3,13 \pm 1,98) \text{ g}_{\text{Glut}} \cdot \text{L}^{-1}$ . Os valores estimados de coeficiente de rendimento destes substratos a células foram (em  $\text{g}_{\text{cél}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$ )  $Y_{X/\text{Malt}} = 0,52 \pm 0,01$  e  $Y_{X/\text{Glut}} = 0,59 \pm 0,03$ . O crescimento do mutante foi desprezível em meio contendo apenas lisina, não sendo possível ajustar nenhum modelo cinético de crescimento neste meio (Figura 5.15E).

Embora a velocidade de consumo de glutamato pelas duas linhagens tenha sido maior que a observada nos meios contendo os outros dois substratos, a velocidade de crescimento foi afetada pela morte celular, mesmo em concentrações do aminoácido ainda em torno de 3,0 a 4,0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Os valores resultantes da simulação para a constante de morte celular,  $k_d$ , foram de  $0,002 \text{ h}^{-1}$  e  $0,0052 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente para linhagem selvagem e o mutante.

**Figura 5.15:** Crescimento em frascos agitados de linhagens de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 em meios contendo maltose (A), lisina (B) e glutamato (C) e Hol.80 em meios contendo maltose (D), lisina (E) e glutamato (F).



Comparando-se com a linhagem selvagem, o mutante Hol.80 apresentou o mesmo comportamento em maltose e, proporcionalmente à concentração do inóculo

no meio de produção, também em glutamato. Por outro lado, o mutante mostrou um crescimento desprezível em lisina, observando-se que este aminoácido serviu apenas para manter íntegra a pouca biomassa formada durante o cultivo.

De uma maneira geral, açúcares são melhores metabolizados como fonte de C e energia, o que é condizente com os resultados obtidos. Todavia, em meios contendo outros substratos, lisina pode atuar como uma fonte secundária de C como fonte de energia para manutenção celular em *S. clavuligerus*, como será apresentado em cultivos em biorreator.

#### **5.4 Cultivos realizados em biorreator**

Após a padronização de meios e condições gerais dos cultivos por frascos agitados, foram realizados experimentos em biorreator utilizando os meios A e B para monitorar, além das variáveis anteriores, a concentração de proteínas no meio e a evolução de CO<sub>2</sub> nos gases de saída do biorreator. Foi também investigada a reprodutibilidade dos métodos anteriormente definidos e adaptados.

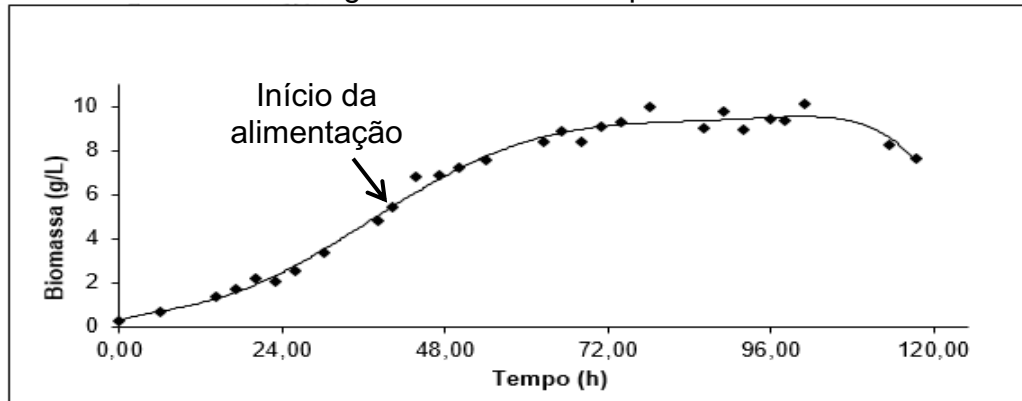
##### **5.4.1 Cultivo contínuo da linhagem *S. clavuligerus* ATCC 27064 em biorreator em meio sintético com lisina para a produção de bioativos**

Com base nos resultados obtidos em frascos agitados, o meio quimicamente definido contendo maltose e lisina como fontes de carbono e energia e de nitrogênio (Tabela 4.6) foi empregado em cultivo em biorreator de bancada (News Brunswick Bioflo 2000 5 L de volume para trabalho).

O cultivo durou 120 horas sendo as primeiras 44 horas em batelada. E além das variáveis monitoradas em cultivos em frascos agitados, foram monitoradas a secreção de proteínas extracelulares e a evolução de CO<sub>2</sub>, dados importantes para realizar as simulações de distribuição de fluxos metabólicos. Os resultados estão apresentados nas Figuras 5.16 a 5.21. As linhas de tendência nos gráficos referem-se às equações polinomiais resultantes dos alisamentos dos dados experimentais do método de Leduy e Zajic (1973) para o estudo de fluxos que será apresentado adiante.

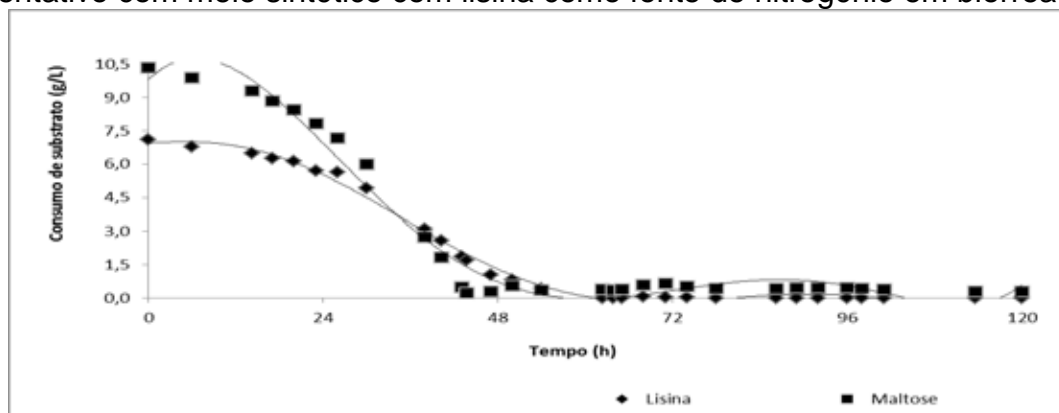
A Figura 5.16 apresenta o crescimento celular ao longo do processo, sendo a biomassa determinada como nos experimentos realizados em frascos agitados.

**Figura 5.16:** Biomassa obtida durante o processo fermentativo em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio em biorreator por ATCC 27064.



A formação de biomassa e os consumos de lisina e maltose da etapa em batelada foram semelhantes aos observados em frascos agitados. Em 44 horas de processo, a maltose já havia sido totalmente consumida e havia um residual de lisina de  $1,7 \text{ g.L}^{-1}$  (Figura 5.17). Neste momento, iniciou-se a alimentação de meio a uma taxa de diluição  $D = 0,011 \text{ h}^{-1}$ . Sob esta condição, houve um acréscimo na biomassa até cerca de 68 horas, passando de  $7 \text{ g.L}^{-1}$  para cerca de  $9 \text{ g.L}^{-1}$ . Esta concentração manteve-se aproximadamente constante até 96 horas, momento em que foi cessada a alimentação. Foi possível estabelecer uma fase estacionária de 68 a 96 horas, na qual as concentrações de maltose e lisina mantiveram-se próximas à zero, sem decréscimo da biomassa.

**Figura 5.17:** Consumo de lisina e maltose em ATCC 27064 durante o processo fermentativo com meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio em biorreator.

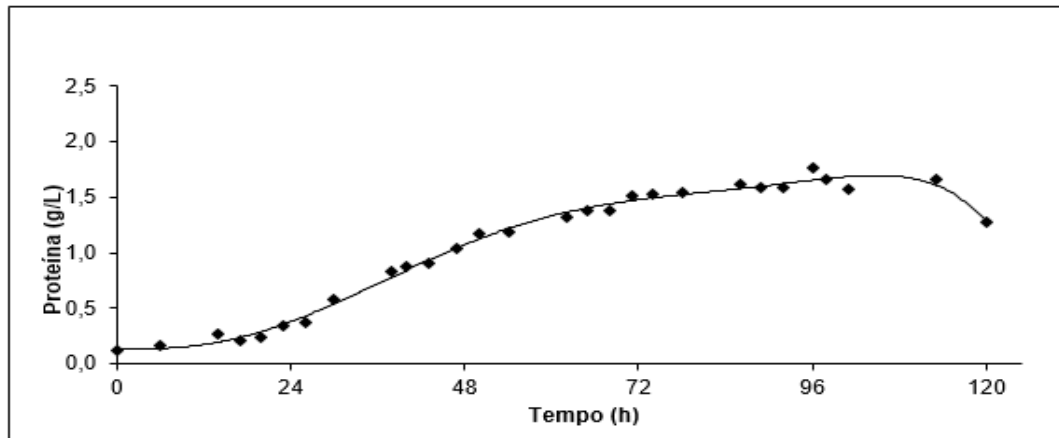


Observa-se pela Figura 5.18 que a concentração de proteína extracelular aumentou durante a etapa em batelada (44 horas de cultivo). Durante a etapa de



cultivo contínuo, iniciada após a batelada, a concentração proteica do meio não sofreu grande oscilação, mantendo-se em torno  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  de meio e decaindo ligeiramente ao final do processo.

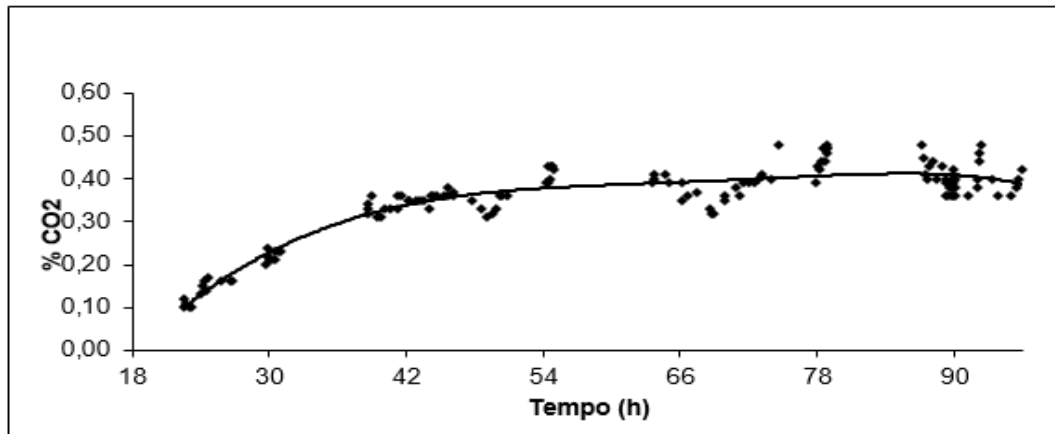
**Figura 5.18:** Valores de secreção de proteína em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio no cultivo de ATCC 27064 em biorreator.



Outro aspecto muito importante é o monitoramento da formação de  $\text{CO}_2$  na saída de gases do biorreator. Esta análise é fundamental para a obtenção de dados do balanço de carbono durante o cultivo, os quais serão utilizados posteriormente para realizar a distribuição de fluxos metabólicos, um dos objetivos deste projeto.

Para esta análise foi utilizado um analisador de  $\text{CO}_2$  (BlueInOne-BlueSens) e o fluxo de saída de gases foi monitorado de hora em hora, a partir de 18 horas após o início do cultivo, como mostrado na Figura 5.19. Observa-se que a liberação de  $\text{CO}_2$  manteve-se crescente até o fim da fase exponencial do micro-organismo e depois se tornou praticamente constante (0,40 %) até o fim do processo.

**Figura 5.19:** Evolução da saída de CO<sub>2</sub> durante o processo fermentativo de ATCC 27064 em biorreator.

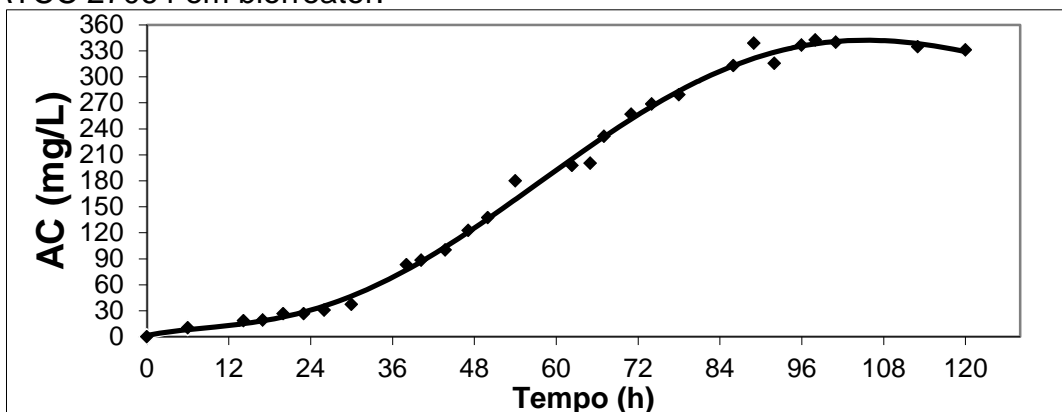


As análises de AC e CefC produzidos durante o cultivo em biorreator foram as mesmas utilizadas para monitorar estes biocompostos no processo em frascos agitado.

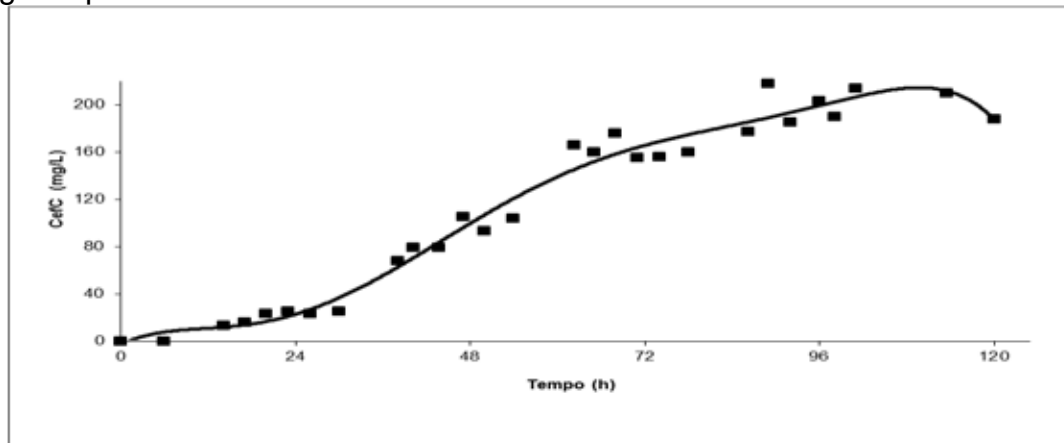
Neste experimento Hol foi produzida em concentrações muito baixas em comparação com as de AC e CefC, uma vez que o meio utilizado não favoreceu a produção de Hol pela linhagem selvagem.

As Figuras 5.20 e 5.21 mostram a produção de AC e CefC ao longo do período de 120 horas de cultivo. Observa-se uma crescente produção de AC, cerca de 340 mg.L<sup>-1</sup> em 102 horas de processo, a qual se manteve constante até o fim do processo. Já a produção de CefC atingiu seu patamar máximo em 111 horas, com uma concentração de 214 mg.L<sup>-1</sup>, que manteve-se praticamente constante até o fim do cultivo.

**Figura 5.20:** Produção de AC em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio por ATCC 27064 em biorreator.



**Figura 5.21:** Produção de CefC em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio por ATCC 27064 em biorreator.



Durante o processo em batelada as concentrações de AC, CefC e de células apresentaram valores da mesma ordem de grandeza tanto em biorreator (até 44 horas) quanto em frascos agitados (até 72 horas). Sabe-se que as rotas biossintéticas destes biocompostos são totalmente independentes, todavia a produção de ambos ocorre de forma concomitante. Isto se deve ao fato de que as biossínteses de ambos são reguladas pelo mesmo elemento multifuncional *ccaR* (*cephamycin and clavulanic acid Regulator*), codificado pelo gene *ccaR*. Desta forma, a presença e a concentração de determinados nutrientes no meio de cultivo podem favorecer a produção de um ou outro composto, todavia obter altos níveis de um destes bioativos em detrimento do outro é muito difícil.

Comparando-se os máximos valores obtidos no processo contínuo em biorreator e na batelada em frascos agitados observam-se diferenças importantes. Em biorreator foram obtidas, ao final de 96 horas, produções próximas a três vezes maior de AC, duas vezes maior de CefC e  $2 \text{ g.L}^{-1}$  a mais de biomassa. Na etapa contínua em biorreator, a alimentação de meio permitiu o prolongamento da viabilidade celular microbiana e a manutenção da produção de bioativos em altas concentrações.

#### 5.4.2 Estimativa dos parâmetros cinéticos do processo

Os dados apresentados no item 5.3 mostraram que a utilização de maltose ou lisina como fonte de carbono sustenta o crescimento de *S. clavuligerus*. A utilização conjunta de maltose e lisina, porém, resultou em perfis bem diferentes de crescimento e consumo dos substratos. Desta forma, no modelo matemático para

este processo (Modelo 1) foi considerada a influência de ambos os compostos na velocidade de crescimento, os quais, porém, exercendo diferentes funções celulares, conforme cinética proposta por Megee (FREDRICKSON *et al.*, 1970). Assim, maltose participa essencialmente como substrato para a formação de biomassa e lisina atua majoritariamente como fonte de manutenção celular. Esta proposta fundamentou-se no fato de que o catabolismo de lisina gera duas moléculas de acetil-coenzima A, geralmente metabolizadas através do ciclo de Krebs, a principal via de fornecimento de energia para as células em condições de aerobiose. Ainda, foi assumido que o consumo de lisina é dependente de sua concentração de acordo com uma cinética de saturação. Para a produção dos compostos bioativos (CefC e AC), adotou-se uma cinética totalmente associada ao crescimento, conforme evidenciado pelos dados experimentais. As EDOs do Modelo 1 são apresentadas a seguir:

$$\mu_l = \mu_{maxl} \cdot \frac{C_{Malt}}{k_{Maltl} + C_{Malt}} \cdot \frac{C_{Lis}}{k_{Lisl} + C_{Lis}} \quad (1)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = (\mu_l - k_{dl}) \cdot C_x \quad (2)$$

$$\frac{dC_{malt}}{dt} = -\frac{\mu_l}{Y_{Xmaltl}} \cdot C_x \quad (3)$$

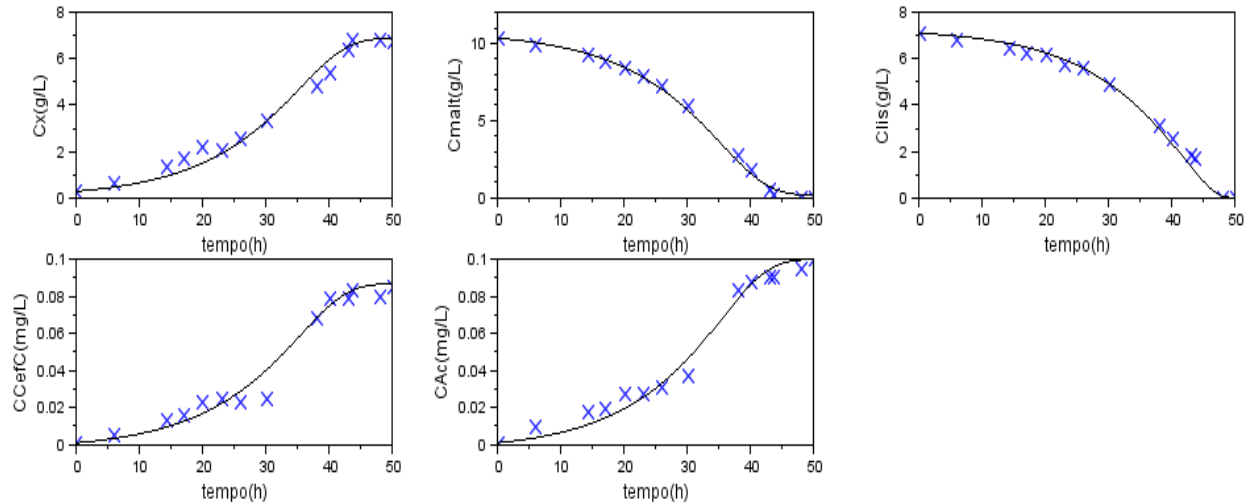
$$\frac{dC_{Lis}}{dt} = -m_{Lisl} \cdot \frac{C_{Lis}}{k_{Lisl} + C_{Lis}} \cdot C_x \quad (4)$$

$$\frac{dC_{CefC}}{dt} = \alpha_{CefCl} \cdot \mu_l \cdot C_x \quad (5)$$

$$\frac{dC_{AC}}{dt} = \alpha_{ACl} \cdot \mu_l \cdot C_x \quad (6)$$

Pode-se constatar pela Figura 5.22 o bom ajuste do Modelo 1 aos dados experimentais. Os parâmetros deste modelo estão apresentados na Tabela 5.1. O parâmetro estimado para a manutenção celular,  $m_{Lisl} = 0,058 \text{ g}_{Lis} \cdot \text{g}_{cél}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , corresponde a  $0,01 \text{ mols}_{ATP} \cdot \text{g}_{cél}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , considerando-se que a oxidação completa da lisina produz 32 ATPs ( $\equiv 0,175 \text{ mols}_{ATP} \cdot \text{g}_{Lis}^{-1}$ ). Stephanopoulos *et al.* (1999) coletaram dados de energia de manutenção para vários micro-organismos em diferentes condições do cultivo e observaram uma ampla faixa de valores, de  $10^{-3}$  a  $1,9 \cdot 10^{-2} \text{ mols}_{ATP} \cdot \text{g}_{cél}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , suportando, assim, o valor estimado no presente estudo.

**Figura 5.22:** Perfis de concentração de células (Cx), maltose (Cmalt), lisina (Clis), cefamicina C (CCefC) e ácido clavulânico (CAc) de cultivo em biorreator convencional operado em batelada (× . dados experimentais; — . ajuste do Modelo 1).



**Tabela 5.1:** Valores estimados dos parâmetros do Modelo 1

Parâmetros	Valores Estimados
<b>Velocidade específica máxima de crescimento</b>	$\mu_{\max 1}$ 0,101 ± 0,003 (h <sup>-1</sup> )
<b>Constante do modelo de Megee</b>	
• para maltose	$k_{\text{Malt}1}$ 2,06 ± 0,28 (g <sub>Malt</sub> ·L <sup>-1</sup> )
• para lisina	$k_{\text{Lis}1}$ 0,15 ± 0,11 (g <sub>Lis</sub> ·L <sup>-1</sup> )
<b>Constante de morte celular</b>	$k_{d1}$ 0,0 (h <sup>-1</sup> )
<b>Coef. de rendimento de maltose a células</b>	$Y_{\text{Xmalt}1}$ 0,630 ± 0,005 (g <sub>Malt</sub> ·g <sub>cél</sub> <sup>-1</sup> )
<b>Coef. de manutenção celular pela lisina</b>	$m_{\text{Lis}1}$ 0,058 ± 0,002 (g <sub>Lis</sub> ·g <sub>cél</sub> <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
<b>Coef. do modelo de Leudeking.Piret</b>	
• CefC, associada ao crescimento	$\alpha_{\text{CefC}1}$ 0,013 (g <sub>CefC</sub> ·g <sub>cél</sub> <sup>-1</sup> )
• AC, associada ao crescimento	$\alpha_{\text{AC}1}$ 0,015 (g <sub>AC</sub> ·g <sub>cél</sub> <sup>-1</sup> )

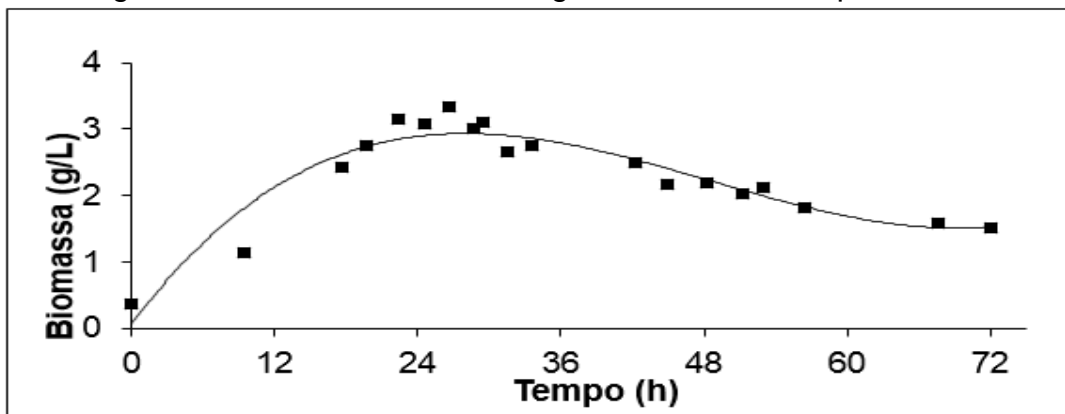
### 5.4.3 Cultivo em batelada com a linhagem *S. clavuligerus* ATCC 27064 em biorreator em meio sintético contendo lisina e glutamato para a produção de bioativos

O catabolismo da lisina ocorre via cadaverina, através da qual todo o nitrogênio do aminoácido é transaminado para alfa-cetoglutarato resultando em duas moléculas de glutamato (MADDURI *et al.*, 1989). Assim, a adição de glutamato ao meio contendo lisina poderia suprir a demanda por nitrogênio do metabolismo primário, promovendo a diminuição do consumo de lisina via cadaverina e

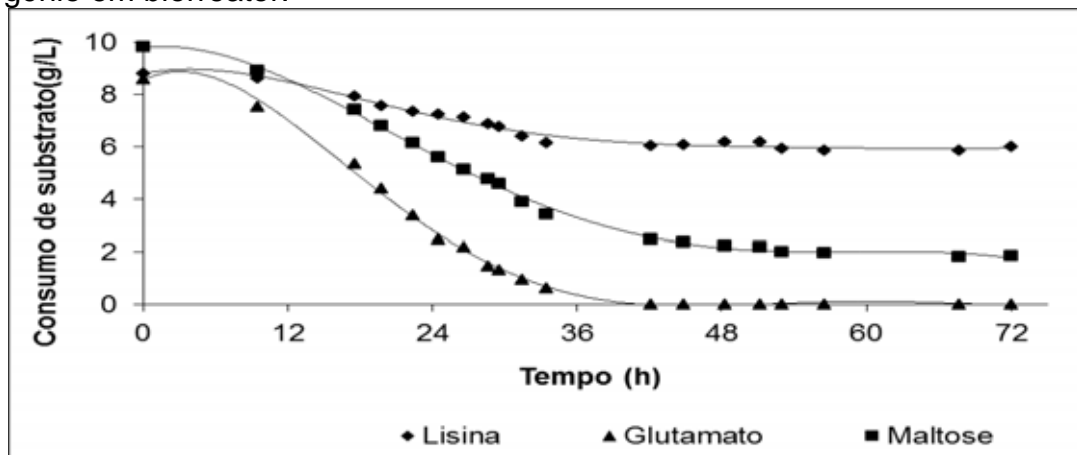
aumentando a disponibilidade do aminoácido para a biossíntese de CefC. Com base nesta suposição, utilizou-se um meio quimicamente definido contendo maltose, lisina e glutamato como fontes de carbono e energia e de nitrogênio visando um aumento da produção de CefC. Desta forma, realizou-se um experimento utilizando-se lisina e glutamato como fontes de nitrogênio em biorreator de bancada (News Brunswick Bioflo 2000 5 L de volume para trabalho), sob mesmas condições operacionais do processo anterior, com a diferença de ser uma batelada com duração de 72 horas. Formação de biomassa e consumos de lisina, maltose e glutamato foram monitoradas da mesma forma que nos experimentos anteriores. Os resultados experimentais estão apresentados nas Figuras 5.23 a 5.28.

O comportamento da linhagem foi semelhante ao observado em frascos agitados utilizando o mesmo meio. Em 42 horas de processo, o glutamato já havia sido totalmente consumido e havia um residual de lisina de  $6,0 \text{ g.L}^{-1}$  e  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  de maltose (Figura 5.24). Já o crescimento celular atingiu o seu valor máximo em torno de 30 horas ( $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ). Após este período, a concentração de biomassa foi reduzindo até  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  (Figura 5.23), evidenciando a inibição do crescimento microbiano pelo produto além dos outros fatores que comumente influenciam o declínio celular.

**Figura 5.23:** Biomassa obtida durante o processo fermentativo em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio em biorreator por ATCC 27064.

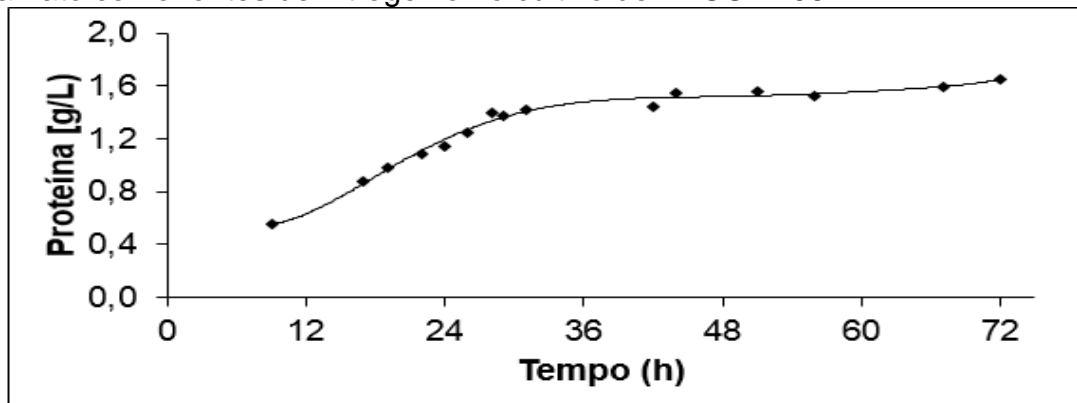


**Figura 5.24:** Consumo de lisina, maltose e glutamato em ATCC 27064 durante o processo fermentativo com meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio em biorreator.



A proteína secretada para o meio foi determinada do mesmo modo que no experimento realizado anteriormente para ser utilizada para o balanço de C para distribuição de fluxos metabólicos. A concentração proteica aumentou durante a fase exponencial. Após este período manteve-se constante em um valor médio de  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  até o fim do processo (Figura 5.25).

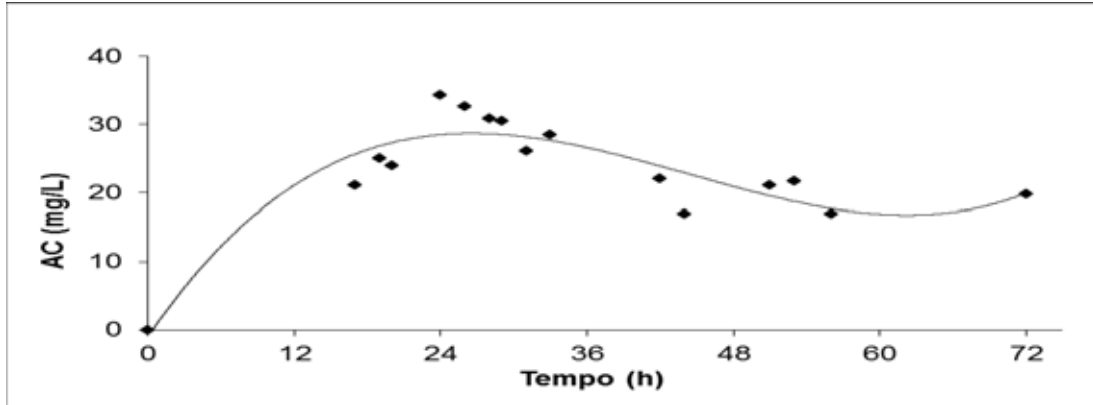
**Figura 5.25:** Valores da secreção de proteína em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio no cultivo de ATCC 27064.



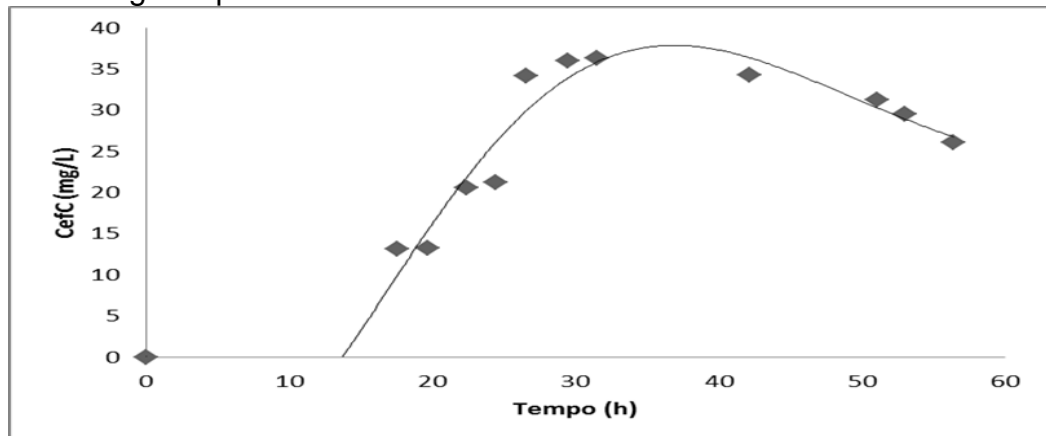
Os resultados obtidos referentes a produção de biocompostos estão apresentados nas Figuras 5.26, 5.27 e 5.28. Observou-se uma concentração máxima de AC em torno de  $35 \text{ mg.L}^{-1}$  obtida em 24 horas. Após este período, houve um declínio na produção até  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  observada em 72 horas de processo. A produção máxima de CefC foi observada em torno de 30 horas de processo, cerca

de  $35 \text{ mg.L}^{-1}$ . O patamar máximo de Hol foi de  $111 \text{ mg.L}^{-1}$  em 30 horas, mantendo-se praticamente constante em torno de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  até o término do cultivo.

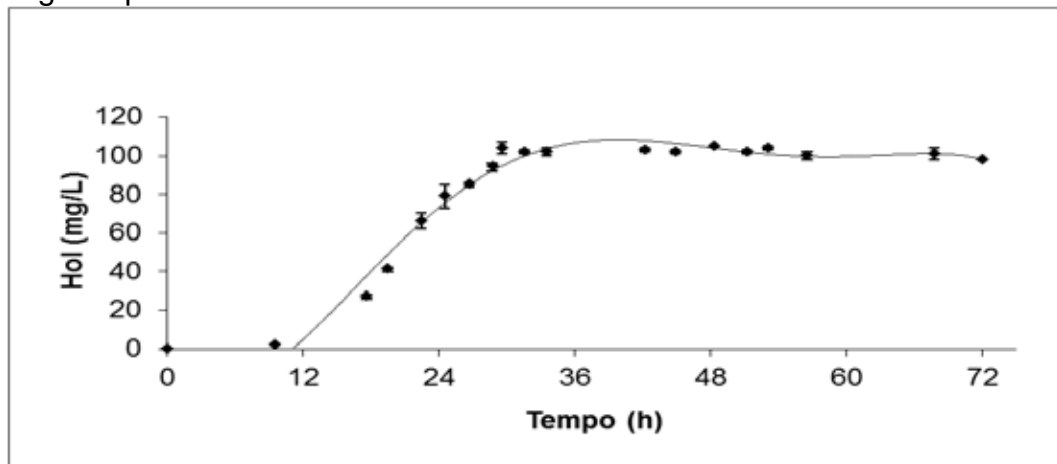
**Figura 5.26:** Produção de AC em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio por ATCC 27064 em biorreator.



**Figura 5.27:** Produção de CefC em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio por ATCC 27064 em biorreator.



**Figura 5.28:** Produção de Hol em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio por ATCC 27064 em biorreator.





Pelos resultados obtidos, tanto em frascos agitados como em biorreator, pode-se concluir que este meio de cultura favorece sobremaneira a produção de Hol e não é adequado à produção dos outros biocompostos investigados (AC e CefC). Assim, a estratégia de se adicionar glutamato ao meio não surtiu o efeito esperado, obtendo-se, no biorreator, cerca de 65% menos CefC ou AC com relação ao que foi obtido destes compostos em meio contendo apenas maltose e lisina. Possivelmente a adição de glutamato alterou a regulação do metabolismo do nitrogênio diminuindo a produção destes bioativos. Um comportamento semelhante também foi observado por Romero *et al.* (1984) em meios sem lisina. Todavia, a combinação de maltose, glutamato e lisina resultou em uma alta concentração de Hol,  $110 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , uma produção nunca relatada para a linhagem selvagem.

Fuente *et al.* (2002) mostraram que mutantes de *S. clavuligerus* bloqueados em determinadas etapas da rota biossintética de AC produzem quantidades significativas de Hol. Os autores sugeriram que o acúmulo de intermediários da rota de AC direciona o metabolismo secundário para a produção de Hol. A alta produção de Hol pela linhagem selvagem obtida no presente estudo pode estar associada à inibição da produção de AC ocasionada pelo acúmulo de espécies nitrogenadas no meio de cultivo.

O comportamento do processo permitiu propor um modelo (Modelo 2) no qual lisina, devido ao seu baixo consumo, não influencia diretamente no crescimento, atuando apenas na manutenção celular. O glutamato e a maltose, por sua vez, foram considerados determinantes da velocidade de crescimento assumindo-se a cinética de Megee e para a produção dos biocompostos foram assumidos o modelo totalmente associado ao crescimento para CefC ou AC e o modelo parcialmente associado ao crescimento de Leudeking e Piret para Hol (FREDRICKSON *et al.*, 1970). As EDOs do Modelo 2 são apresentadas a seguir:

$$\mu_2 = \mu_{max2} \cdot \frac{C_{Malt}}{k_{Malt2} + C_{Malt}} \cdot \frac{C_{Glut}}{k_{Glut2} + C_{Glut}} \quad (7)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = (\mu_2 - k_{d2}) \cdot C_x \quad (8)$$

$$\frac{dC_{Glut}}{dt} = \frac{-\mu_2}{Y_{XGlut2}} \cdot C_x \quad (9)$$

$$\frac{dC_{Malt}}{dt} = \frac{-\mu_2}{Y_{XMalt2}} \cdot C_x \quad (10)$$

$$\frac{dC_{Lis}}{dt} = -m_{Lis2} \cdot \frac{C_{Lis}}{k_{Lis2} + C_{Lis}} \cdot C_x \quad (11)$$

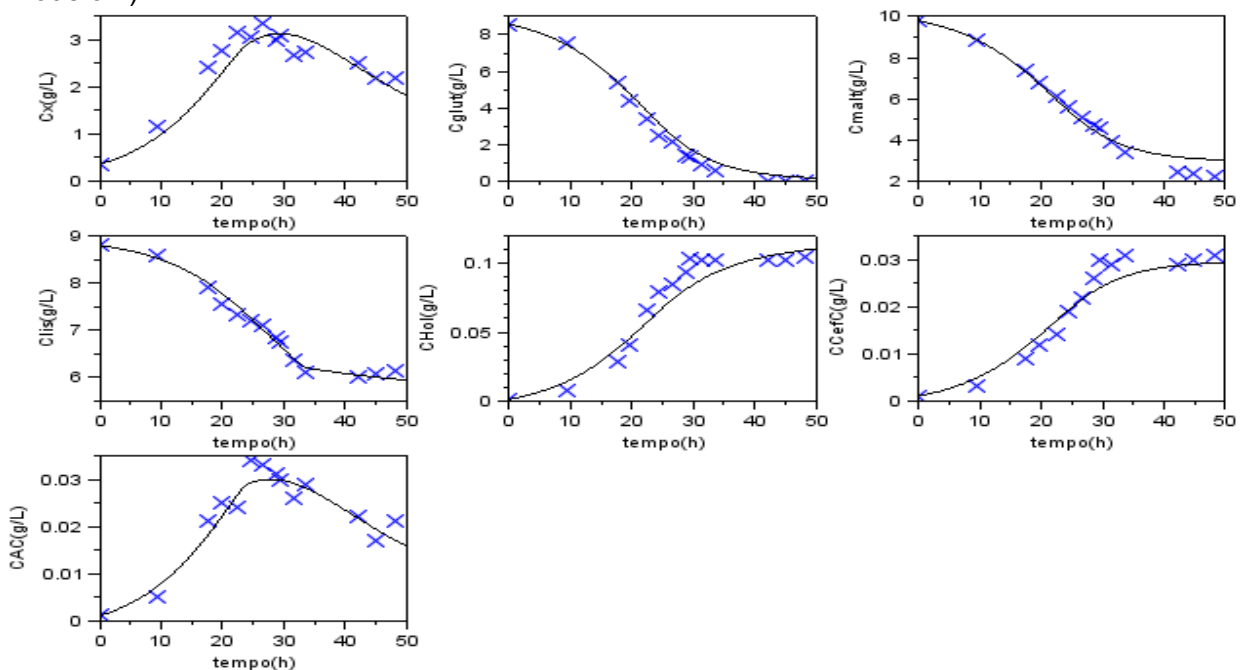
$$\frac{dC_{Hol}}{dt} = \alpha_{Hol2} \cdot \mu_2 \cdot C_x + \beta_{Hol2} \cdot C_x \quad (12)$$

$$\frac{dC_{CefC}}{dt} = \alpha_{CefC2} \cdot \mu_2 \cdot C_x \quad (13)$$

$$\frac{dC_{AC}}{dt} = \alpha_{AC2} \cdot \mu_2 \cdot C_x - k_{dAC2} \cdot C_{AC} \quad (14)$$

De acordo com a Figura 5.29, o Modelo 2 ajustou-se de maneira bem satisfatória aos dados experimentais. Os parâmetros do modelo estão listados na Tabela 5.2.

**Figura 5.29:** Perfis de concentração de células ( $C_x$ ), glutamato ( $C_{glut}$ ), maltose ( $C_{malt}$ ), lisina ( $C_{lis}$ ), holomicina ( $C_{Hol}$ ), cefamicina C ( $C_{CefC}$ ) e ácido clavulânico ( $C_{AC}$ ) de cultivo em biorreator convencional operado em batelada ( $\times$  . dados experimentais; — . ajuste do Modelo 2).



**Tabela 5.2:** Valores estimados dos parâmetros do Modelo 2.

Parâmetros		Valores
<b>Velocidade específica máxima de crescimento</b>	$\mu_{\max 2}$	$0,244 \pm 0,044 \text{ (h}^{-1}\text{)}$
<b>Constantes do modelo de Megee:</b>		
• para maltose	$k_{\text{Malt}2}$	$4,45 \pm 4,12 \text{ (g}_{\text{Malt}}\cdot\text{L}^{-1}\text{)}$
• para glutamato	$k_{\text{Glut}2}$	$2,52 \pm 1,31 \text{ (g}_{\text{Glut}}\cdot\text{L}^{-1}\text{)}$
<b>Constante de morte celular</b>	$k_{d2}$	$0,022 \pm 0,001 \text{ (h}^{-1}\text{)}$
<b>Coefficientes de rendimento:</b>		
• de glutamato a células	$Y_{\text{XGlut}2}$	$0,63 \pm 0,01 \text{ (g}_{\text{Glut}}\cdot\text{g}_{\text{cél}}^{-1}\text{)}$
• de maltose a células	$Y_{\text{XMalt}2}$	$0,78 \pm 0,02 \text{ (g}_{\text{Malt}}\cdot\text{g}_{\text{cél}}^{-1}\text{)}$
<b>Coefficiente de manutenção celular pela lisina</b>	$m_{\text{Lis}2}$	$0,184 \pm 0,082 \text{ (g}_{\text{Lis}}\cdot\text{g}_{\text{cél}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$
<b>Coef. de saturação da velocidade de manutenção</b>	$k_{\text{Lis}2}$	$25,0 \pm 13,07 \text{ (g}_{\text{Lis}}\cdot\text{L}^{-1}\text{)}$
<b>Coefficientes do modelo de Leudeking.Piret:</b>		
• Hol, associado ao crescimento	$\alpha_{\text{Hol}2}$	$0,017 \text{ (g}_{\text{Hol}}\cdot\text{g}_{\text{cél}}^{-1}\text{)}$
• Hol, não associado ao crescimento	$\beta_{\text{Hol}2}$	$0,0002 \text{ (g}_{\text{Hol}}\cdot\text{g}_{\text{cél}}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$
• CefC, associada ao crescimento	$\alpha_{\text{CefC}2}$	$0,0054 \text{ (g}_{\text{CefC}}\cdot\text{g}_{\text{cél}}^{-1}\text{)}$
• AC, associada ao crescimento	$\alpha_{\text{AC}2}$	$0,009 \text{ (g}_{\text{AC}}\cdot\text{g}_{\text{cél}}^{-1}\text{)}$
<b>Constante de degradação de AC</b>	$k_{d\text{AC}2}$	$0,004 \text{ (h}^{-1}\text{)}$

Com relação ao cultivo em meio contendo apenas maltose e lisina, a velocidade específica máxima de crescimento estimada foi cerca de 2,5 vezes maior, justificada pela ambientação prévia do micro-organismo em glutamato durante a preparação do inóculo principal. Entretanto, o acúmulo de biomassa foi 50% menor. Isto pode ser explicado pela baixa resistência de *S. clavuligerus* a Hol, mais evidente em concentrações do biocomposto acima de  $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , observando-se o dobro da taxa de morte celular e velocidade de manutenção por lisina cerca de 85% menor. Também, acredita-se que esta toxicidade exercida por Hol acarretou uma maior demanda energética do micro-organismo, de forma que o coeficiente de lisina para a manutenção celular estimado no Modelo 2 foi cerca de 3 vezes maior que o ajustado para o Modelo 1.

Os dois modelos cinéticos propostos (Modelos 1 e 2), fundamentados em informações bioquímicas e metabólicas, refletiram muito bem o comportamento dos processos investigados.

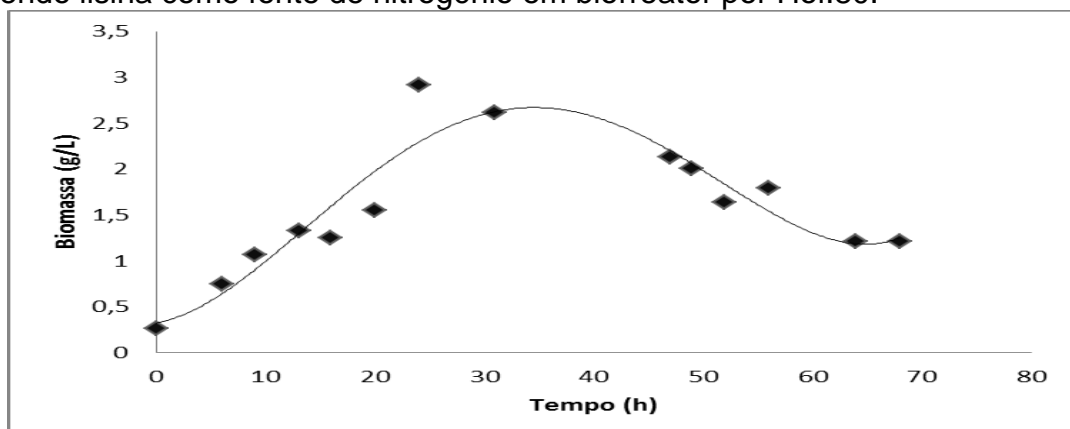
#### 5.4.4 Cultivo em batelada com a linhagem *S. clavuligerus* Hol.80 em biorreator em meio sintético contendo lisina para produção de bioativos

Realizou-se um experimento com a linhagem mutante utilizando-se lisina como fontes de nitrogênio (meio A) em biorreator convencional, sob as mesmas condições do realizado com a linhagem selvagem.

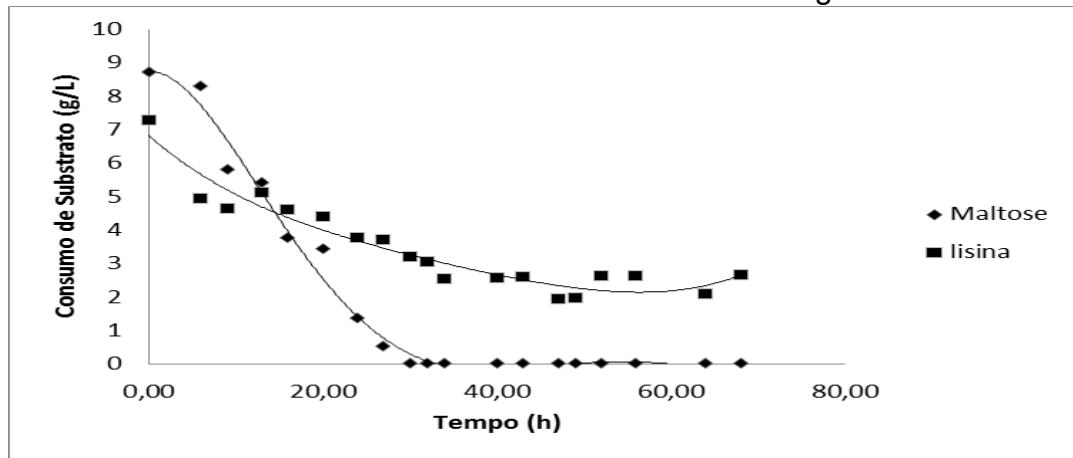
Neste cultivo o reator foi operado no modo batelada, com duração de 68 horas e amostras coletadas a cada três horas de cultivo. Foi monitorado o crescimento celular, consumo de maltose e lisina, produção de proteína extracelular, concentração de CO<sub>2</sub> e de biocompostos.

O comportamento da linhagem Hol.80 perante o consumo de substrato foi semelhante ao observado em frascos agitados utilizando o mesmo meio. Em 27 horas de processo, a maltose já havia sido totalmente consumida e havia um residual de lisina de aproximadamente 4,0 g.L<sup>-1</sup> (Figura 5.31). Já o crescimento celular atingiu o seu valor máximo em torno de 30 horas (3,0 g.L<sup>-1</sup>). Após este período, a concentração de biomassa foi reduzindo até 1,2 g.L<sup>-1</sup> (Figura 5.30), evidenciando a morte microbiana pela exaustão da principal fonte de carbono (maltose). Este comportamento foi semelhante ao da linhagem selvagem, porém o mutante consumiu menos lisina, uma vez que este micro-organismo apresenta menor rendimento celular em meio contendo apenas este aminoácido.

**Figura 5.30:** Biomassa obtida durante processo fermentativo com meio sintético contendo lisina como fonte de nitrogênio em biorreator por Hol.80.

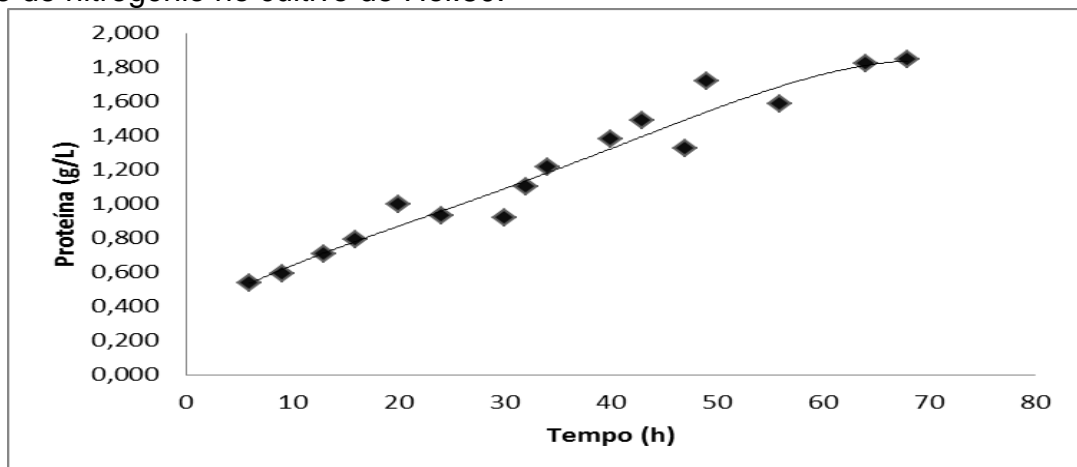


**Figura 5.31:** Consumo de lisina e maltose em Hol.80 durante o processo fermentativo com meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio em biorreator

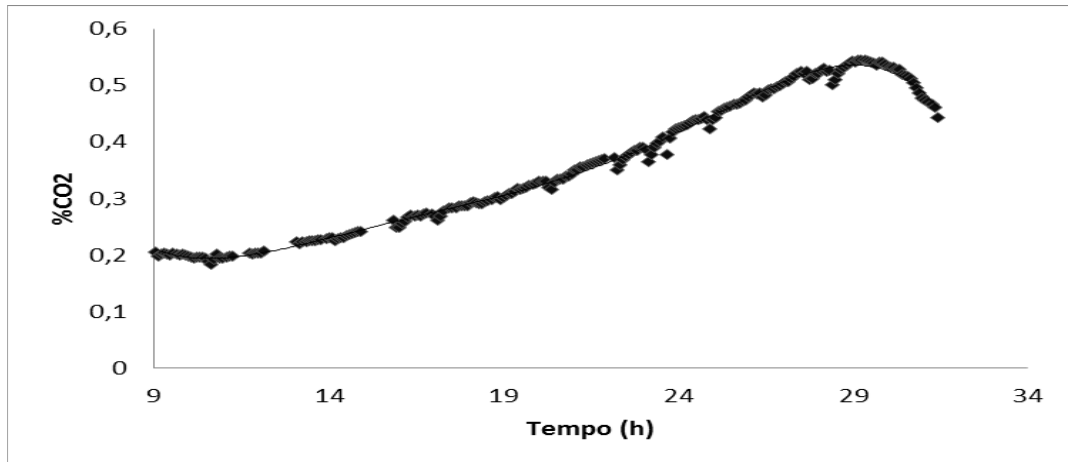


A secreção de proteína manteve-se crescente até o fim do processo, atingindo concentrações de  $1,8 \text{ g.L}^{-1}$  (Figura 5.32), da mesma ordem de grandeza dos demais cultivos com linhagem selvagem. Também foi analisada neste cultivo a concentração de  $\text{CO}_2$ , esta permaneceu crescente até 30 horas, atingindo 0,5 % de concentração (Figura 5.33). Após este período a formação de  $\text{CO}_2$  entrou em declínio indicando a morte microbiana.

**Figura 5.32:** Valores da secreção de proteína em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio no cultivo de Hol.80.

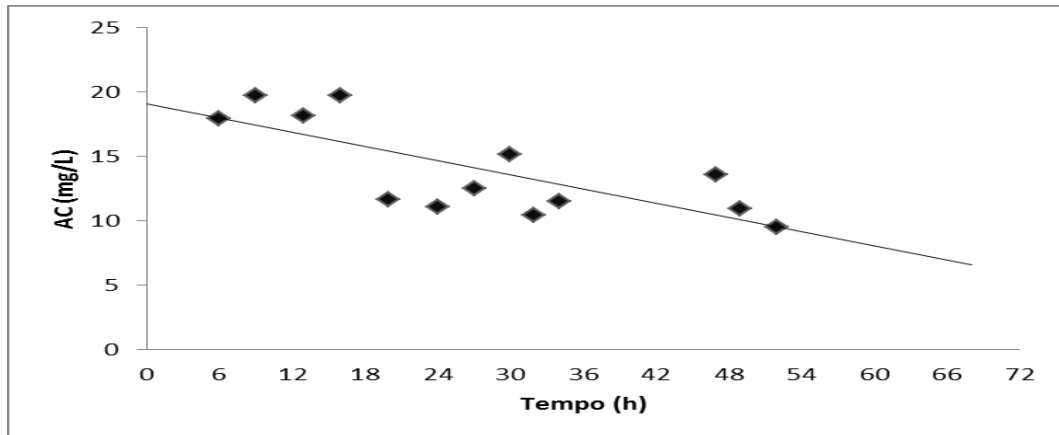


**Figura 5.33:** Evolução da saída de CO<sub>2</sub> durante o processo fermentativo de Hol.80 em biorreator

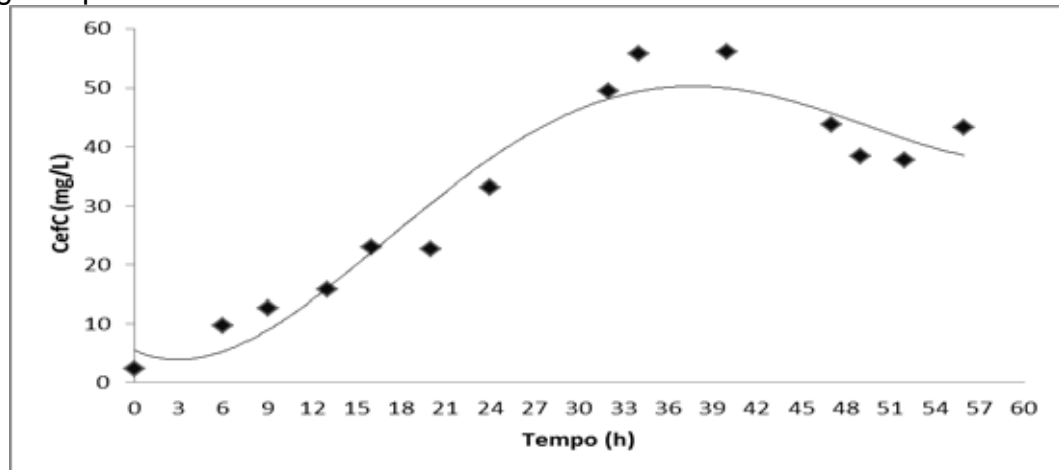


Abaixo estão apresentados os dados de concentração dos biocompostos, produzidos durante o processo fermentativo (Figura 5.34, 5.35 e 5.36). Diferentemente do cultivo com ATCC utilizando o mesmo meio (meio A), a produção de AC foi praticamente insignificante, já que a concentração máxima produzida foi de 20 mg.L<sup>-1</sup> próximo a 12 horas de cultivo e após este período este biocomposto foi quase que totalmente degradado. Isto, como mencionado em outros cultivos, está relacionado à característica de linhagens melhores produtoras de Hol, que apresentam bloqueios na segunda metade da rota biossintética de AC (FUENTE *et al*, 2002; LIRAS e MARTÍN, 2006; LI e WALSH, 2010). CefC também teve concentrações baixas de produção, atingindo o máximo em torno de 40 horas (56 mg.L<sup>-1</sup>). Quanto ao biocomposto Hol atingiu em 32 horas 55 mg.L<sup>-1</sup>, um comportamento diferente de ATCC que neste meio (A) produziu concentrações praticamente indetectáveis.

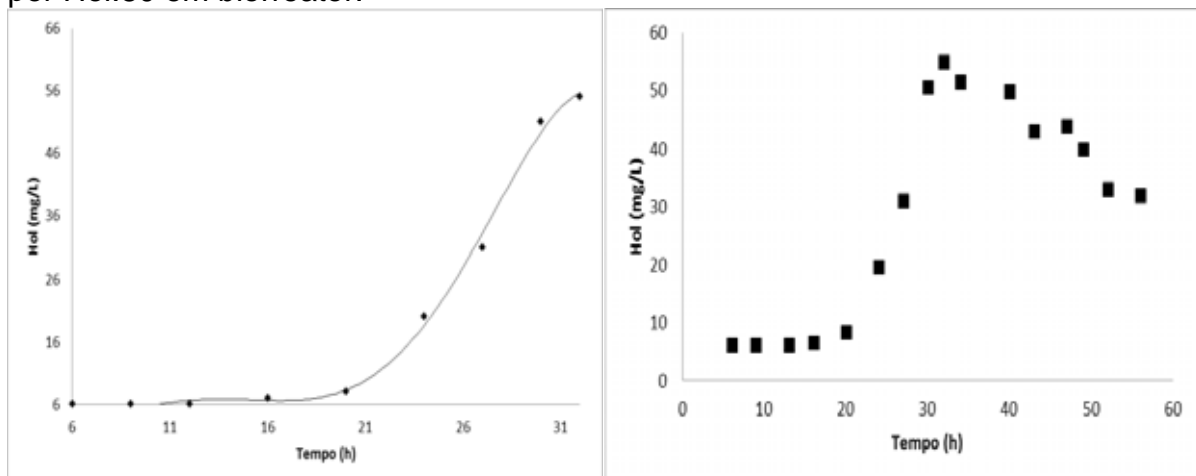
**Figura 5.34:** Produção de AC em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio por Hol.80 em biorreator.



**Figura 5.35:** Produção de CefC em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio por Hol.80 em biorreator.



**Figura 5.36:** Produção de Hol em meio sintético com lisina como fonte de nitrogênio por Hol.80 em biorreator.



#### 5.4.5 Cultivo em batelada com a linhagem *S. clavuligerus* Hol.80 em biorreator em meio sintético contendo lisina e glutamato para a produção de bioativos

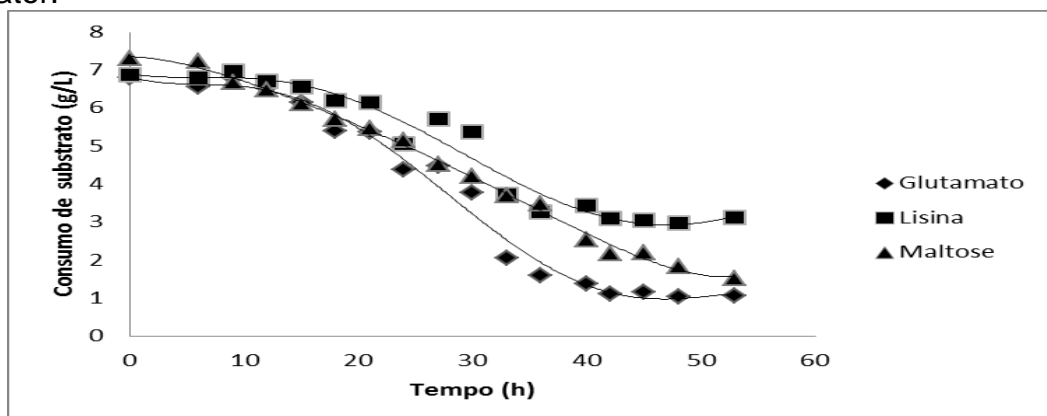
Também foi realizado um cultivo com a linhagem Hol.80 utilizando lisina e glutamato como fontes de nitrogênio (meio B da Tabela 4.7) sob as mesmas condições operações dos experimentos anteriores.

O cultivo foi realizado no modo batelada, tendo duração de 53 horas e amostras coletadas a cada três horas de cultivo. Neste experimento foi monitorado o crescimento celular, consumo de maltose, lisina e glutamato, e produção de proteína extracelular, concentração de CO<sub>2</sub> e de biocompostos.

Hol.80 comportou-se de maneira semelhantes ao mesmo experimento realizado em frascos agitados utilizando o meio B. Glutamato e maltose foram consumidos rapidamente terminando o processo fermentativo com um residual de aproximadamente 1,5 g.L<sup>-1</sup>, enquanto de lisina foi consumida lentamente pelo micro-organismo restando 3,0 g.L<sup>-1</sup> no fim do cultivo (Figura 5.37).

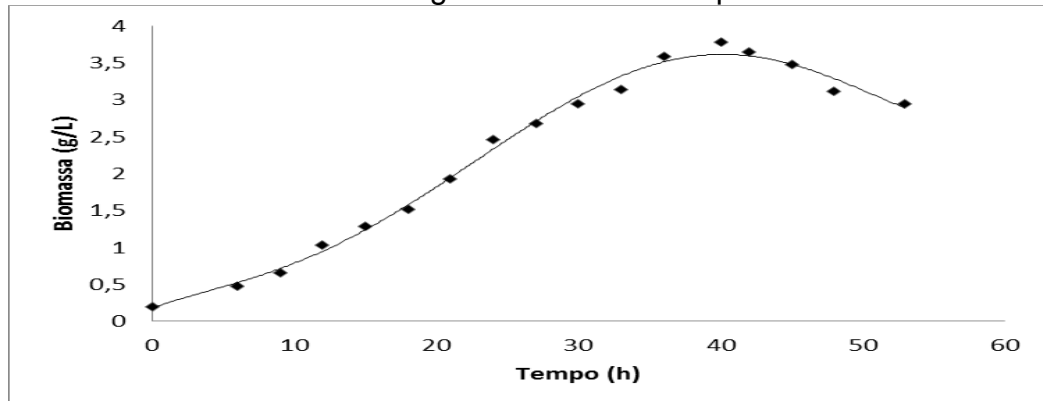
O crescimento celular também foi parecido com o dos demais experimentos, atingindo seu patamar máximo (c.a 4,0 g.L<sup>-1</sup>) em torno de 40 horas de cultivo. Após este período manteve-se praticamente constante em torno de 3,0 g.L<sup>-1</sup> de célula até o fim do processo (Figura 5.38).

**Figura 5.37:** Consumo de lisina, glutamato e maltose em Hol.80 durante o processo fermentativo com meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio em biorreator.



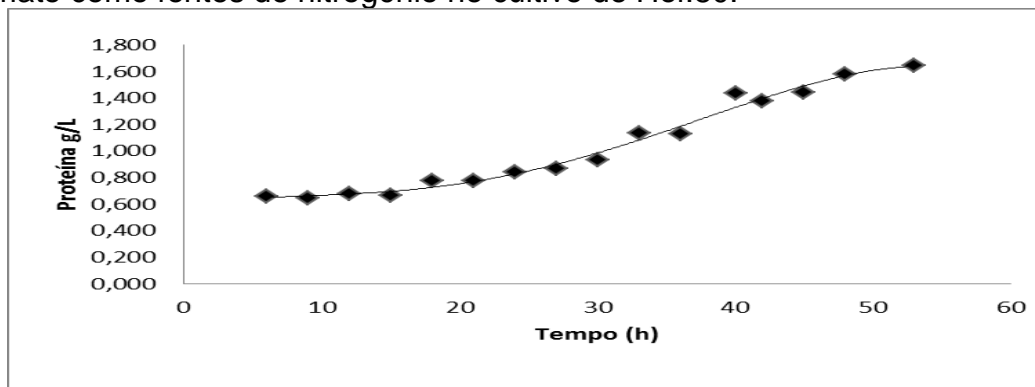


**Figura 5.38:** Biomassa obtida durante processo fermentativo com meio sintético contendo lisina como fontes de nitrogênio em biorreator por Hol.80.

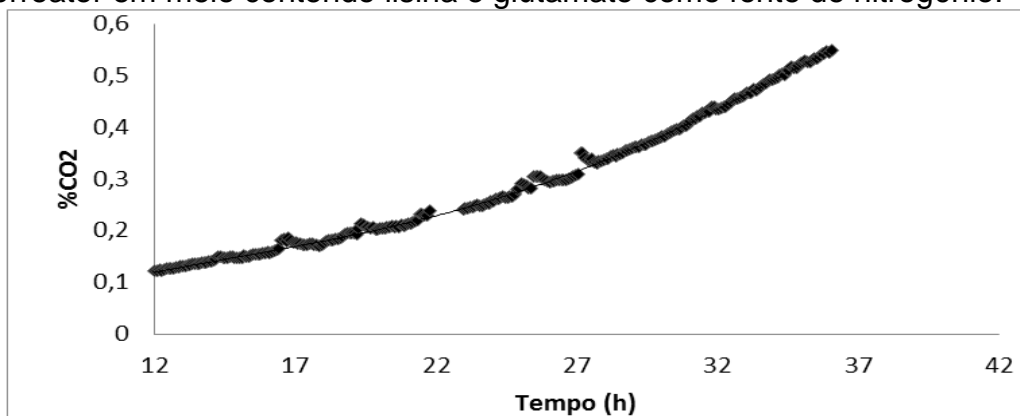


O perfil de secreção de proteína também foi analisado (Figura 5.39). Observou-se um aumento crescente de proteínas externas, praticamente até o fim do processo. Outra variável analisada foi a concentração de  $\text{CO}_2$  na saída de gases do reator, a qual se estabilizou em 0,6% até 40 horas e após este período esta concentração caiu para 0,1% ao fim do cultivo evidenciando a morte microbiana (Figura 5.40).

**Figura 5.39:** Valores da secreção de proteína em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio no cultivo de Hol.80.

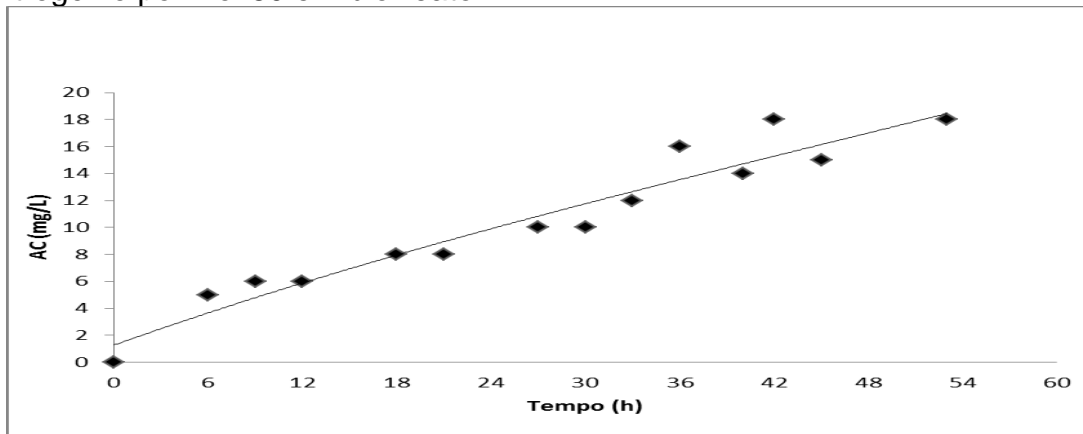


**Figura 5.40:** Evolução da saída de  $\text{CO}_2$  durante o processo fermentativo de Hol.80 em biorreator em meio contendo lisina e glutamato como fonte de nitrogênio.

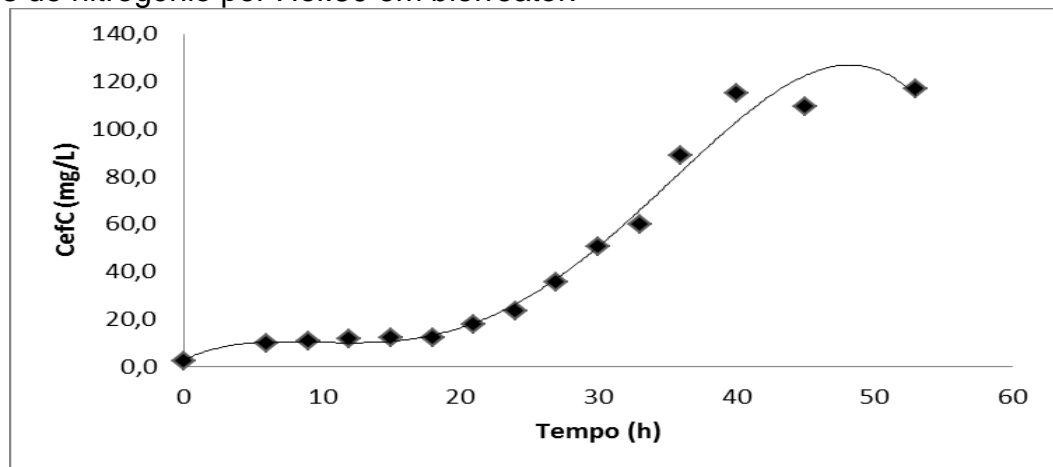


Seguindo a tendência dos experimentos anteriores com Hol.80 a concentração máxima de AC foi de  $18 \text{ mg.L}^{-1}$  enquanto a de CefC foi  $116 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figuras 5.41 e 5.42). A Figura 5.43 mostra as concentrações de Hol produzida no decorrer do processo. Observa-se que a concentração máxima obtida neste cultivo foi em 53 horas e de aproximadamente  $75 \text{ mg.L}^{-1}$ . Analisando este cultivo é possível concluir que a linhagem mutante Hol.80 realmente não é um produtor expressivo de AC e que neste caso as fontes de nitrogênio favoreceram uma maior produção de CefC comparada a Hol.

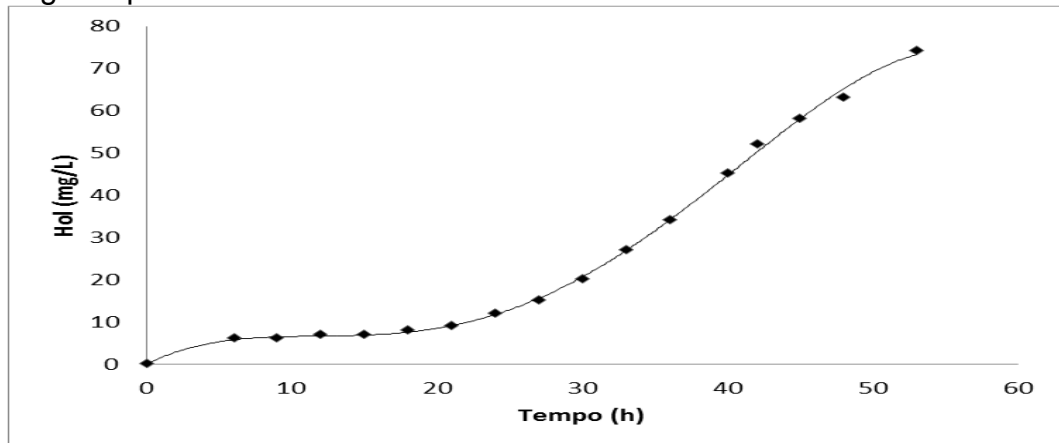
**Figura 5.41:** Produção de AC em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio por Hol.80 em biorreator.



**Figura 5.42:** Produção de CefC em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio por Hol.80 em biorreator.



**Figura 5.43:** Produção de Hol em meio sintético com lisina e glutamato como fontes de nitrogênio por Hol.80 em biorreator.



Comparando-se a produção de bioativos pelas linhagens utilizando-se as diferentes fontes de nitrogênio, foi possível observar maiores diferenças com relação à linhagem selvagem. Enquanto em meio contendo apenas lisina a produção de beta-lactâmicos foi favorecida e não houve produção de Hol, este biocomposto foi produzido em meio contendo lisina e glutamato. Com relação ao mutante, os dois meios favoreceram a produção de Hol.

## 5.5 MODELO METABÓLICO

O modelo (Item 5.5.1) utilizado foi construído durante desenvolvimento de Tese de Doutorado de André Pastrelo Cavallieri (CAVALLIERI, 2014), de nosso grupo de pesquisa, (PPG Biotecnologia/ IQ/ Unesp/ Araraquara) no Laboratório de Bioprocesso.DBTQ. Este modelo é composto por reações da via de Embden.Meyerhof.Parnas para glicólise, via das pentoses.fosfato, ciclo de Krebs, ciclo da uréia, metabolismo das unidades de um C, síntese de blocos construtores da biomassa tais como aminoácidos, açúcares, ácidos graxos, bases nitrogenadas, proteínas e ácidos nucleicos e síntese de CefC, AC e Hol. Bushell *et. al* (2006) não relatou as vias de Entner.Doudoroff para glicólise e ciclo do glioxilato para *S. clavuligerus*, logo não foram incluídas no modelo

### 5.5.1 Reações do modelo metabólico

Abaixo estão todas as reações que compõem o modelo metabólico. As equações estão balanceadas apenas para C, N, oxigênio e energia.

. E as letras I e R à frente das reações indicam se a reação é reversível ou irreversível.

### Reações de *Streptomyces clavuligerus*

#### Reação CATABOLISMO DO ACETATO

		Rev/Irrev
0	Acetato + ATP = Acetil.CoA + AMP	I

#### VIA GLICOLÍTICA

1	Maltose + 3 ATP = 2 Glicose.6.P + 3 ADP	I
2	Glicose.6.P = Frutose.6.P	R
3	Frutose.6.P + ATP = Frutose.1,6.P	I
4	Frutose.1,6.P = 2 Gliceraldeído.3P	R
5	Gliceraldeído.3.P + NAD + ADP = Fosfoenolpiruvato + NADH + ATP	R
6	Fosfoenolpiruvato + ADP = Piruvato + ATP	I
7	Piruvato + NAD = NADH + CO <sub>2</sub> + Acetil.CoA	I

#### VIA DAS PENTOSE.FOSFATO

8	Glicose.6.P + 2 NADP = Ribulose.5.P + CO <sub>2</sub> + 2 NADPH	I
9	Ribulose.5.P = Ribose.5.P	R
10	Ribulose.5.P = Xilulose.5.P	R
11	Ribose.5.P + Xilulose.5.P = Frutose.6.P + Eritrose.4.P	R
12	Eritrose.4.P + Xilulose.5.P = Frutose.6.P + Gliceraldeído.3.P	I

#### CICLO DE KREBS

13	Acetil.CoA + Oxaloacetato + NADP = α.cetogluturato + CO <sub>2</sub> + NADPH	I
14	α.cetogluturato + NAD = Succinil.CoA + NADH + CO <sub>2</sub>	I
15	Succinil.CoA + GDP = Succinato + GTP	R
16	Succinato + FAD = Fumarato + FADH <sub>2</sub>	R
17	Fumarato + NAD = Oxaloacetato + NADH	R

#### REAÇÃO ANAPLERÓTICA

18	Fosfoenolpiruvato + CO <sub>2</sub> + GDP = oxaloacetato + GTP	R
----	----------------------------------------------------------------	---

#### BIOSSÍNTESE DE AMINOÁCIDOS

##### LISINA

19	Aspartato.4.semialdeído + Glutamato + Piruvato + Succinil.CO <sub>2</sub> A + NADPH = Lisina + α.cetogluturato + Succinato + NADP + CO <sub>2</sub>	I
----	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

##### Glutamina

20	Glutamato + NH <sub>3</sub> + ATP = Glutamina + ADP	I
----	-----------------------------------------------------	---

##### Aspartato

- 21 Oxaloacetato + Glutamato = Aspartato +  $\alpha$ .cetoglutarato |  
**Asparagina**
- 22 Aspartato + Glutamina + ATP = Asparagina + Glutamato + ADP |  
**Serina**
- 23 Gliceraldeído.3.P + Glutamato + NAD = Serina +  $\alpha$ .cetoglutarato + NADH |  
**Arginina**
- 24 2 Glutamato + Acetil.COA + ATP + NADPH = Ornitina+ ADP + NADP + Acetato +  $\alpha$ .cetoglutarato |
- 25 2 ATP + CO<sub>2</sub> + Glutamina = Carbamoil.P + 2 ADP + Glutamato |
- 26 Ornitina + Carbamoil.P + Aspartato+ ATP = Arginina + Fumarato + AMP |
- CICLO DA URÉIA**
- 27 Arginina = Ornitina + Uréia |
- 28 Uréia = 2 NH<sub>3</sub> + CO<sub>2</sub> |  
**Treonina e Metionina**
- 29 Aspartato + ATP + NADPH = Aspartato.4.semialdeído + ADP + NADP |
- 30 Homoserina + ATP = Treonina + ADP |
- 31 Homoserina + Succinil.COA+ Cisteína +N5.metiltetrahidrofolato = Metionina + Succinato + Piruvato + Tetrahidrofolato + NH<sub>3</sub> |  
**Isoleucina**
- 32 Treonina + Piruvato + NADPH + Glutamato = Isoleucina +  $\alpha$ .cetoglutarato + NADP + CO<sub>2</sub> + NH<sub>3</sub> |  
**Leucina e Valina**
- 33 2 Piruvato + NADPH =  $\alpha$ .cetoisovalerato + CO<sub>2</sub> + NADP |
- 34  $\alpha$ .cetoisovalerato + Acetil.CoA+ Glutamato + NAD = Leucina +  $\alpha$ .cetoglutarato + CO<sub>2</sub> + NADH |
- 35  $\alpha$ .cetoisovalerato + Glutamato = Valina +  $\alpha$ .cetoglutarato |  
**Fenilalanina, Tirosina e Triptofano**
- 36 2 Fosfoenolpiruvato + Eritrose.4.P + NADPH + ATP = Corismato + ADP + NADP |
- 37 Corismato + Glutamato = Fenilalanina +  $\alpha$ .cetoglutarato + CO<sub>2</sub> |
- 38 Corismato + Glutamato + NAD = Tirosina +  $\alpha$ .cetoglutarato + CO<sub>2</sub> + NADH |
- 39 Corismato + Glutamina + Fosforribosilpirofosfato + Serina = Triptofano + CO<sub>2</sub> + Gliceraldeído.3.P + Glutamato + Piruvato |  
**Prolina**
- 40 Glutamato + ATP + 2 NADPH = Prolina + ADP + 2 NADP |  
**Alanina**

41	Piruvato + Glutamato = Alanina + $\alpha$ .cetoglutarato	I
	<b>Glicina</b>	
42	Serina + Tetrahidrofolato = Glicina + N5.N10.Metilenotetrahidrofolato	I
	<b>Cisteína</b>	
43	Serina + Acetil.COA + 4 NADPH + 2 ATP = Cisteína + Acetato+ 4 NADP + ADP + AMP	I
	<b>Histidina</b>	
44	Ribose.5P + ATP = Fosforribosilpirofosfato + AMP	I
45	Fosforribosilpirofosfato + ATP + Glutamina + 2 NAD = Histidina + $\alpha$ .cetoglutarato + AICAR + 2NADH	I
	<b>ENERGIA DE MANUTENÇÃO</b>	
46	ATP = ADP + ENERGIA DE MANUTENÇÃO	I
	<b>BIOSSÍNTESE DE UNIDADES C1</b>	
47	Tetraidrofolato + CO <sub>2</sub> + NADPH + ATP = N.10.Formiltetraidrofolato + NADP + ADP	I
48	N.10.Formiltetraidrofolato + NADPH = N5,N10.Metilenotetraidrofolato + NADP	R
49	N5,N10.Metilenotetraidrofolato + NADH = N5.Metiltetraidrofolato + NAD	R
50	N.10.Formiltetraidrofolato + NADP = Tetraidrofolato + NADPH + CO <sub>2</sub>	I
	<b>BIOSSÍNTESE DE BASE NITROGENADAS</b>	
	<b>Adenina, Guanina, Desoxiadenina e Desoxiguanina</b>	
51	Fosforribosilpirofosfato + 2 Glutamina + Aspartato + CO <sub>2</sub> + Glicina + 5 ATP + N.10.Formiltetrahidrofolato = AICAR + Tetraidrofolato + Fumarato + 2 Glutamato + 5 ADP	I
52	AICAR + N.10.Formiltetrahidrofolato = Inosinato + Tetraidrofolato	I
53	Inosinato + NAD + Glutamina + 2 ATP = GDP + NADH + Glutamato + AMP + ADP	I
54	Inosinato + Aspartato + GTP = AMP + GDP + Fumarato	I
55	GDP + ATP = GTP + ADP	R
56	AMP + ATP = 2 ADP	R
57	GDP + ATP + NADPH = dGTP + ADP + NADP	I
58	NADPH + ATP = dATP + NADP	I
	<b>Uridina, Citidina, desoxicitidina e desoxitimina</b>	

- 59 Aspartato + Carbamoil.P + Fosforribosilpirofosfato + 2 ATP + NAD = UTP + CO<sub>2</sub> + 2 ADP + NADH |
- 60 UTP + ATP + Glutamina = CTP + ADP + Glutamato |
- 61 CTP + NADPH = dCTP + NADP |
- 62 UTP + 2 NADPH + N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>.Metilenotetraidrofolato + 2 ATP = dTTP + 2 NADP + Tetraidrofolato + 2 ADP |

### BIOSSÍNTESE DE CARBOIDRATOS

- 63 Glicose.6.P + ATP = CARBOIDRATO + ADP |

Nota: CARBOIDRATO equivale a 162 gramas

### BIOSSÍNTESE DE LIPÍDEOS

- 64 8 Acetil.CO.A + 7 ATP + 14 NADPH = LIPÍDEO + 7 ADP + 14 NADP |

Nota: LÍPÍDEO (PALMITATO) equivale a 256 gramas

### BIOSSÍNTESE DE PROTEÍNAS

- 65 0,096 Alanina + 0,055 Arginina + 0,045 Asparagina + 0,045 Aspartato + 0,017 Cisteína + 0,049 Glutamato + 0,049 Glutamina + 0,115 Glicina + 0,018 Histidina + 0,054 Isoleucina + 0,084 Leucina + 0,064 Lisina + 0,029 Metionina + 0,035 Fenilalanina + 0,041 Prolina + 0,040 Serina + 0,047 Treonina + 0,011 Triptofano + 0,026 Tirosina + 0,079 Valina + 4,3 ATP = PROTEÍNA + 4,3 ADP |

Nota: PROTEÍNA equivale a 108,9 gramas

### BIOSSÍNTESE DE RNA

- 66 0,256 ATP + 0,262 UTP + 0,286 GTP + 0,196 CTP + 0,4 ATP = RNA + 0,4 ADP |

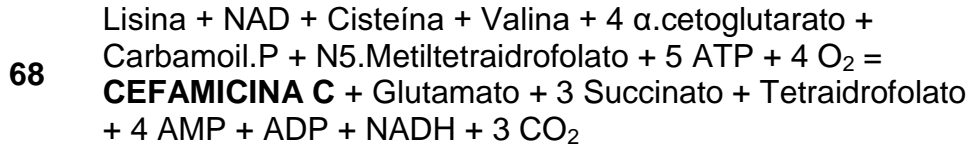
Nota: RNA equivale a 323 gramas

### BIOSÍNTESE DE DNA

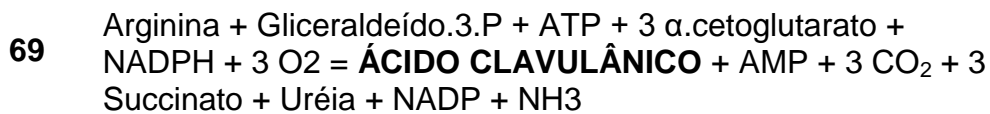
- 67 0,245 dATP + 0,245 dTTP + 0,255 dGTP + 0,255 dCTP + 1,4 ATP = DNA + 1,4 ADP |

Nota: DNA equivale a 310 gramas

### BIOSSÍNTESE DE CEFAMICINA C



### BIOSSÍNTESE DE ÁCIDO CLAVULÂNICO



### BIOMASSA

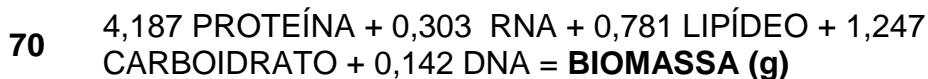
Considerando: 45,6% Proteína

9,8 % RNA

20 % Lipídeos

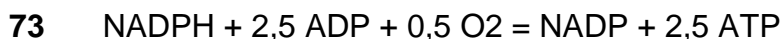
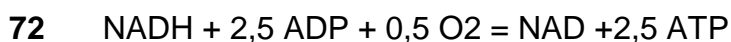
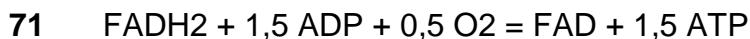
20,2 % Carboidratos

4,4% DNA

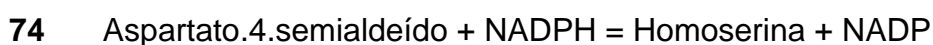


Nota: BIOMASSA equivale a 100 grama de células

### REAÇÕES PARA CONVERSÃO DE COENZIMAS REDUZIDAS EM ATP

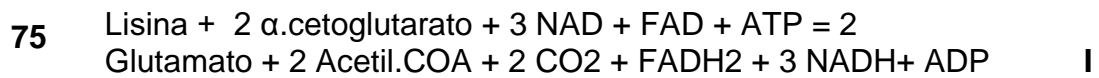


### REAÇÃO COMPLEMENTAR SÍNTESE DE LISINA



### CATABOLISMO DA LISINA





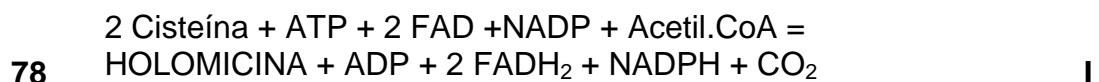
### REAÇÃO GOGAT



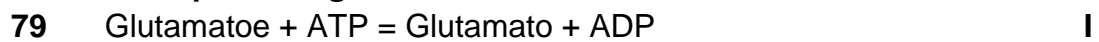
### Transporte Lisina



### BIOSSÍNTESE DE HOLOMICINA



### Transporte de glutamato



### Transporte de Amonia



### GLICONEOGÊNESE



### CATABOLISMO DO GLUTAMATO



## 5.6 Distribuição de fluxos metabólicos

Pela estequiometria das reações do modelo, as quantidades de C, N e O na entrada devem ser mantidas nos componentes de saída. Desta forma, inserindo-se os dados de entrada no programa Optflux (concentrações de substratos e concentração celular inicial) espera-se fechar o balanço de massa para aqueles elementos (C, N e O) na saída. Para proporcionar a melhor visualização das distribuições dos fluxos utilizou-se como base de cálculo uma quantidade de 100 mmols de maltose, um dos substratos limitantes do crescimento.

Os dados de consumo de substratos e formação de produtos obtidos durante o cultivo das linhagens em meio A e meio B (Tabela 4.6 e 4.7) foram utilizados para simular o modelo metabólico. O período do cultivo utilizado para a simulação foi a fase exponencial do crescimento dos micro-organismos, de forma que foram

consideradas as variações globais dos componentes (Tabelas 5.3, 5.4 e 5.5). Esta estratégia também foi adotada por Goel *et al.* (2003). Iniciou-se o processo de simulação das linhagens após a fase lag, finalizando-se após estabilização da concentração celular. Assim, no meio A os períodos de simulação para as linhagens selvagem e mutante foram de 9,5 a 29,5 e 9,0 a 32,0, respectivamente. No meio B, o período de simulação para o mutante foi de 12,0 a 36,0.

**Tabela 5.3:** Variações globais de consumo de substratos e formações de produtos durante a fase exponencial do cultivo de ATCC 27064 em meio contendo lisina e glutamato como fontes de nitrogênio.

Metabólitos	Variação global			Fluxo Normalizado
	g.L <sup>-1</sup>	mmol.L <sup>-1</sup>	g de C.L <sup>-1</sup>	
Maltose	4,59	12,75	5,10	100
Lisina	1,84	10,07	3,97	79,011
Glutamato	6,42	34,31	16,54	269,080
Biomassa	1,99	1,99	1,06	15,589
Proteína	0,736	6,76	3,57	53,008
Hol	0,097	0,45	0,177	3,550
CefC	0,016	0,03	0,015	0,273
AC	0,011	0,06	0,027	0,434

Com os dados reais obtidos nos cultivos com a linhagem mutante foi possível realizar um balanço de C. Os valores foram de 100% e 97,5% para os meios A e B, respectivamente. Isto demonstra a precisão das análises de consumos de substratos e de formação de produtos. Para o cultivo com a linhagem selvagem não foi possível realizar tal balanço, uma vez que não foram obtidos dados da evolução de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 5.4:** Variações globais de consumo de substratos e formações de produtos durante a fase exponencial do cultivo de Hol.80 em meio contendo apenas lisina como fonte de nitrogênio

Metabólitos	Variação global			Fluxo Normalizado
	g.L <sup>-1</sup>	mmol.L <sup>-1</sup>	g de C.L <sup>-1</sup>	
Maltose	6,61	18,36	7,3444	100
Lisina	2,08	11,36	4,477	61,887
Biomassa	1,75	1,75	0,929	9,508
Proteína	0,519	4,76	2,515	25,946
Hol	0,043	0,20	0,079	1,104
CefC	0,039	0,09	0,038	0,480

**Tabela 5.5:** Variações globais de consumo de substratos e formações de produtos durante a fase exponencial do cultivo de Hol.80 em meio contendo lisina e glutamato como fontes de nitrogênio.

Metabólitos	Variação global			Fluxo Normalizado
	g.L <sup>-1</sup>	mmol.L <sup>-1</sup>	g de C.L <sup>-1</sup>	
Maltose	3,20	8,89	1,28	100
Lisina	3,00	16,44	1,18	184,950
Glutamato	4,54	28,05	1,46	315,563
Biomassa	2,57	2,57	1,37	28,913
Proteína	0,511	4,69	0,270	52,789
Hol	0,028	0,131	0,011	1,473
CefC	0,072	0,161	0,031	1,809
AC	0,008	0,038	0,004	0,430

A função objetivo estabelecida foi a maximização de energia, interpretada como energia liberada na forma de ATP em ADP. A distribuição dos principais fluxos no processo de simulação de todos os cultivos visando o máximo de energia é apresentada nas Figuras 5.44, 5.45 e 5.46. Deste modo assumiu-se que todo o C que não fosse utilizado para a síntese celular, seria oxidado a produção de energia.

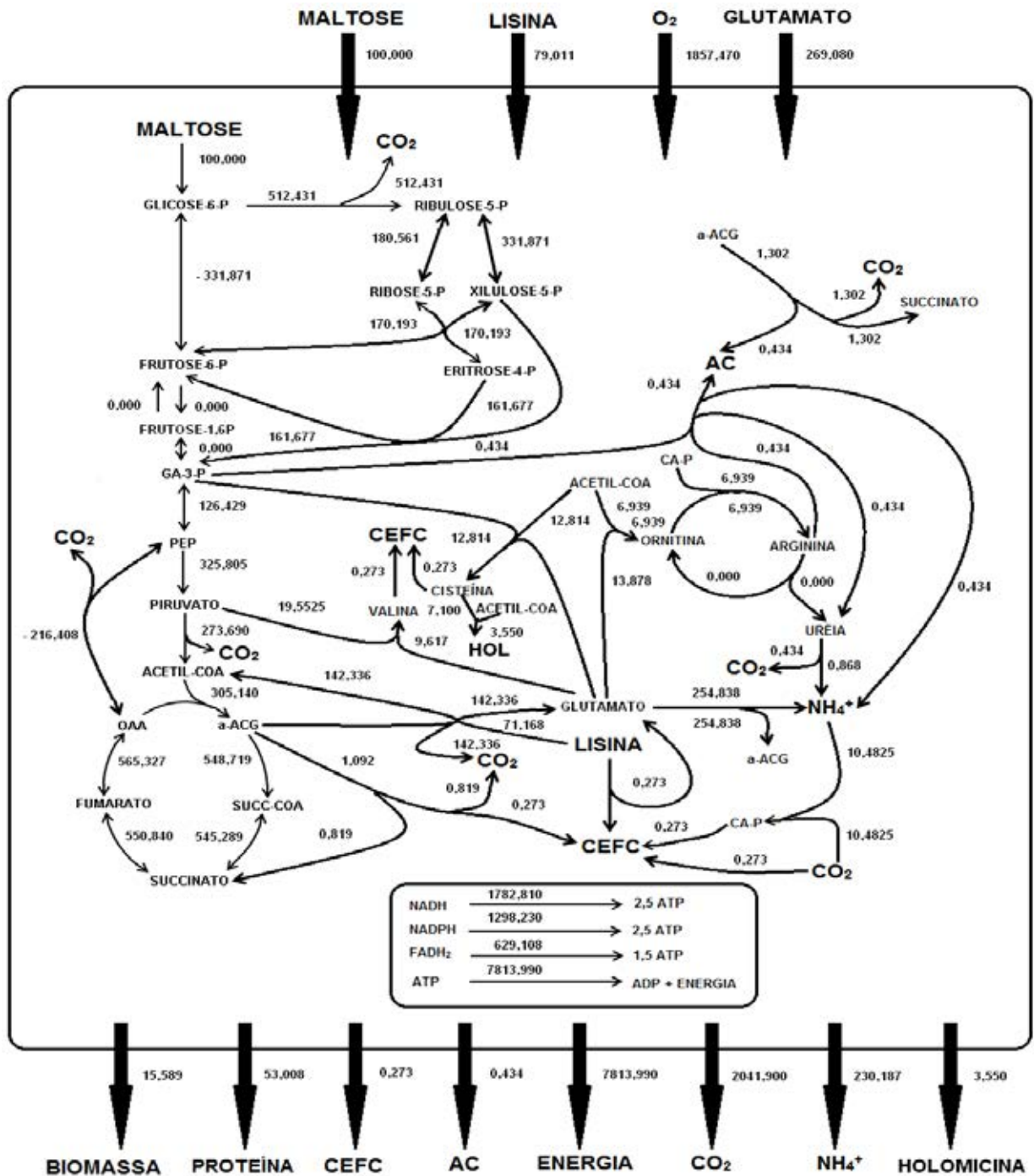
Observaram-se fluxos elevados pela via das pentoses-fosfato e pelo ciclo de Krebs. A via das pentoses-fosfato é responsável pelo suprimento de NADPH, precursor essencial para vias anabólicas de síntese celular. Os dados utilizados para simulação foram obtidos durante a fase exponencial de crescimento condizendo, portanto, com os valores elevados de fluxos por esta via. Por outro lado o ciclo de Krebs é responsável principalmente pela produção de energia para a célula. O fato de os fluxos estarem elevados no ciclo de Krebs indica uma alta demanda energética.

Com os dados reais e com os obtidos por meio de processo de simulação (Soluções 1, 2 e 3) foi possível estimar o consumo energético médio de cada cultivo durante a fase exponencial. Nos cultivos em meio contendo as duas fontes de nitrogênio (lisina e glutamato), os valores de energia de manutenção resultantes nas simulações foram de 19,98 mmol de ATP .g<sub>célula</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e 13,69 mmol de ATP .g<sub>célula</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> para as linhagens ATCC 27064 e Hol.80, respectivamente. No cultivo com lisina o valor simulado de energia de manutenção para o mutante foi de 17,48 mmol de ATP .g<sub>célula</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Cavallieri (2014) simulou as distribuições de fluxos para um cultivo contínuo da linhagem selvagem em meio contendo apenas lisina como fonte de nitrogênio, obtendo 6,3 mmol ATP.g<sub>célula</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> para a fase exponencial e 6,0 mmol

ATP.g<sub>célula</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> para a fase alimentada, respectivamente. Sugere-se que os maiores valores de ATP estão relacionados à presença de Hol no meio, a qual afetou o micro-organismo, exigindo maior quantidade de energia para manter as células viáveis. De acordo com Stephanopoulos et. al. (1998), a energia de manutenção é influenciada pelo tipo de micro-organismo e pelas condições da cultura. Os autores listaram uma ampla faixa de valores, de 1 a 18,9 mmols de ATP.g<sup>-1</sup>célula.h<sup>-1</sup> endossando, assim, os dados obtidos nos trabalhos de nosso grupo de pesquisa. Ainda, a metabolização dos esqueletos carbônicos de glutamato e de lisina é realizada através do ciclo de Krebs, o que também justifica os altos fluxos através deste ciclo. Devido ao alto consumo de glutamato, a atividade do ciclo de Krebs no micro-organismo aumentou cerca de três vezes com relação ao meio contendo apenas lisina.

Os resultados das simulações para os cultivos também permitiram estimar a demanda por O<sub>2</sub>. Nos meios em que foi produzido Hol em concentrações que acarretaram um menor crescimento, tanto com a linhagem selvagem como com o mutante, obteve-se menor demanda específica de O<sub>2</sub>, entre 3,5 e 4,8 mmol de O<sub>2</sub>.g<sub>célula</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Estes valores correspondem a cerca de 50% do estimado por Cavallieri (2014), 8,85 mmol de O<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, para a fase exponencial do cultivo da linhagem selvagem no qual não foi produzido Hol (Item 5.4.1).

**Figura 5.44:** Mapa de distribuição dos principais fluxos durante a fase exponencial do cultivo de ATCC 27064 em meio contendo lisina e glutamato

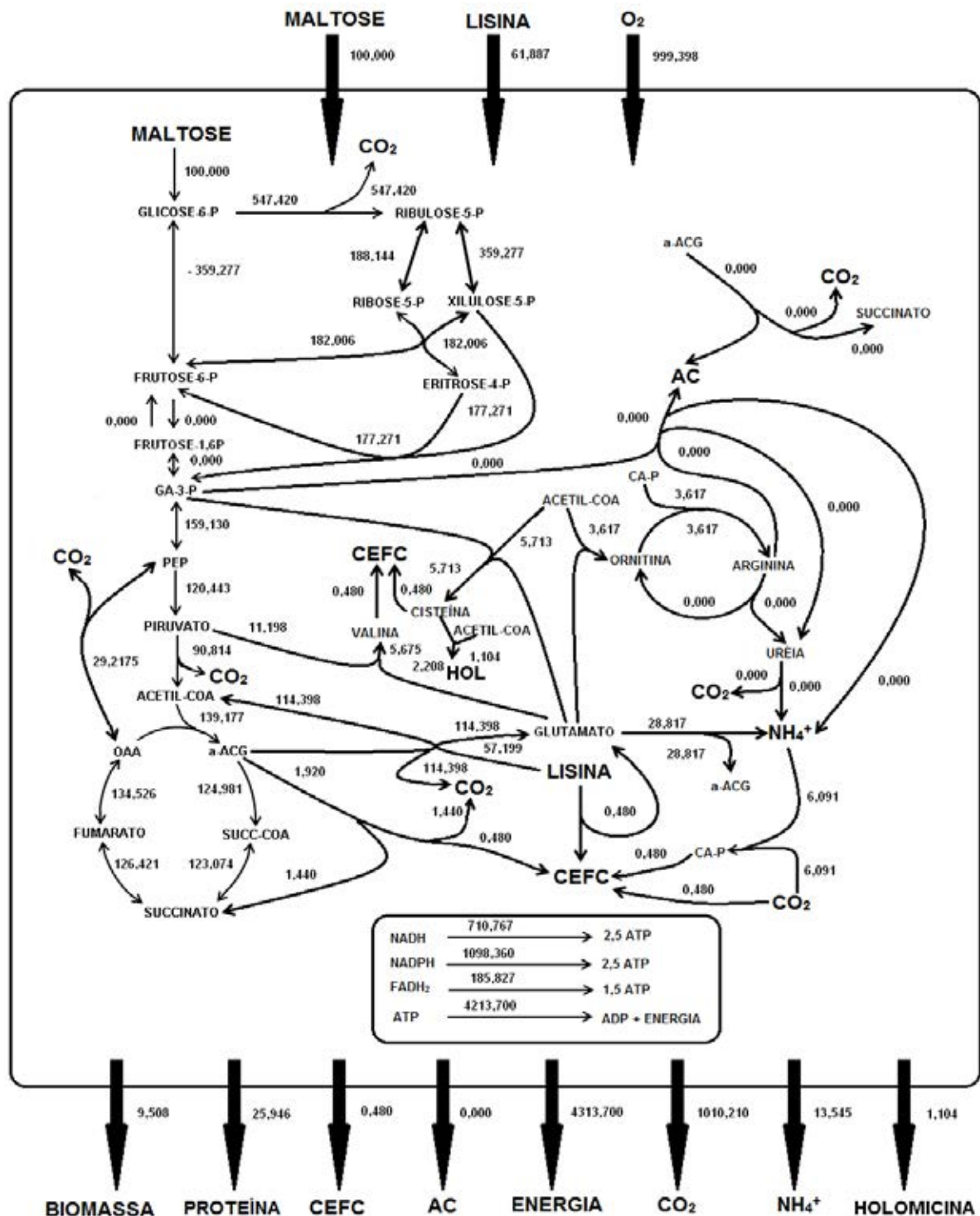


. GA.3P: Gliceraldeído.3.fosfato; PEP: Fosfoenolpiruvato; a.ACG: α.cetoglutarato; SUCC.CO.A: Succinil.Coenzima A; OAA: Oxaloacetato; CA.P: Carbamoil Fosfato)

### Solução 1.

100.0 Maltose + 79.011 Lisinae + 269.08 Glutamatoe + 1857.47 O<sub>2</sub> ..> 53.008 Proteína + 7813.99 Energia + 15.589 Biomassa + 0.273 CefC + 0.434 Aclav + 2041.9 CO<sub>2</sub> + 230.187 NH<sub>3</sub>e + 3.55 Holomicina.

**Figura 5.45:** Mapa de distribuição dos principais fluxos durante a fase exponencial do cultivo de Hol.80 em meio contendo lisina

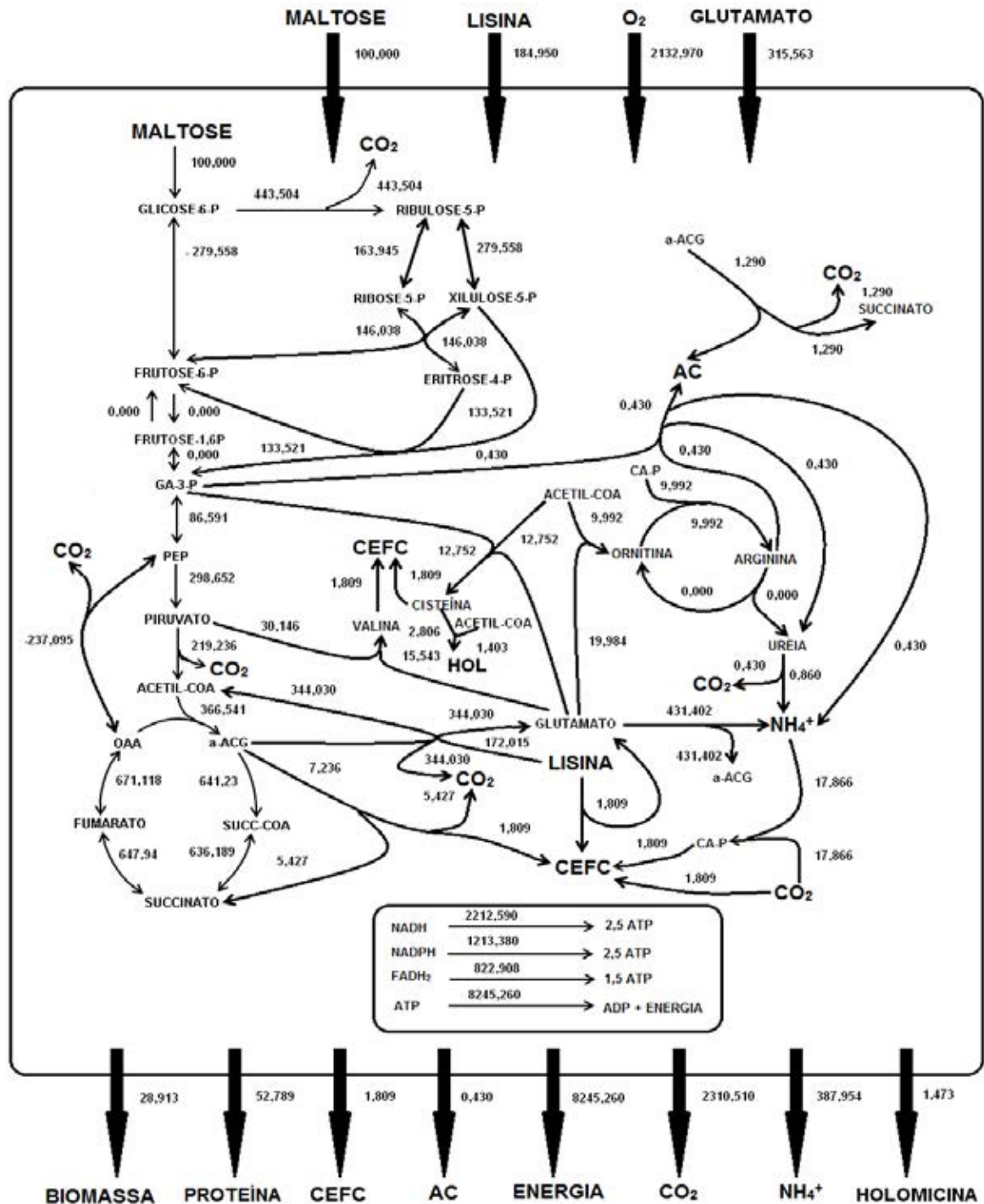


. GA.3P: Gliceraldeído.3.fosfato; PEP: Fosfoenolpiruvato; a.ACG: α.cetoglutarato; SUCC.CO.A: Succinil.Coenzima A; OAA: Oxaloacetato; CA.P: Carbamoil Fosfato)

### Solução 2.

100.0 Maltose + 61.887 Lisinae + 999.398 O<sub>2</sub> ..> 25.946 Proteina + 4313.7 Energia + 9.508 Biomassa + 0.48 CefC + 1010.21 CO<sub>2</sub> + 13.5454 NH<sub>3</sub>e + 1.104 Holomicina

**Figura 5.46:** Mapa de distribuição dos principais fluxos durante a fase exponencial do cultivo de Hol.80 em meio contendo lisina e glutamato.



. GA.3P: Gliceraldeído.3.fosfato; PEP: Fosfoenolpiruvato; a.ACG: α.cetoglutarato; SUCC.CO.A: Succinil.Coenzima A; O.A.A: Oxaloacetato; CA.P: Carbamoil Fosfato)

### Solução 3

100.0 Maltose + 184.95 Lisinae + 315.563 Glutamatoe + 2132.97 O<sub>2</sub> ..> 52.789 Proteína + 8245.26 Energia + 28.913 Biomassa + 1.809 CefC + 0.43 Aclav + 2310.51 CO<sub>2</sub> + 387.954 NH<sub>3</sub>e + 1.473 Holomicina.

## 6 CONCLUSÕES

Apesar de lisina favorecer a produção de CefC e AC e resultar em produção desprezível de Hol pela linhagem selvagem, o mesmo não ocorreu com o mutante Hol.80 em meio contendo apenas este aminoácido. No entanto a linhagem mutante produziu maiores concentrações de Hol e menores de beta-lactâmicos com relação a selvagem.

O meio contendo lisina e glutamato resultou em produções desprezíveis de AC e CefC por ambas as linhagens, enquanto Hol foi produzida em maiores concentrações por ambas as linhagens comparativamente aos cultivos utilizando apenas lisina.

Avaliando-se o crescimento em uma única fonte de C por meio de estimativa de parâmetros cinéticos, a linhagem selvagem e o mutante Hol.80 apresentaram o mesmo comportamento em maltose e glutamato. Por outro lado, o mutante mostrou um crescimento desprezível em lisina, observando-se que este aminoácido serviu apenas para manter íntegra a pouca biomassa formada durante o cultivo.

Analisando-se os dados experimentais e os modelos cinéticos ajustados concluímos que:

(a) com relação à combinação maltose e lisina, lisina não é uma fonte C adequada para o crescimento de *S. clavuligerus*; no entanto, mostrou-se uma fonte eficiente para manutenção celular e maltose para o crescimento celular.

(b) na combinação maltose, glutamato e lisina, foi observado que maltose e glutamato atuam juntamente como fontes principais de crescimento e lisina exclusivamente como fonte de manutenção celular.

Estudos de distribuição de fluxos mostraram que a presença de Hol promove o aumento na demanda energética, já que este composto exerce certa toxicidade às células microbianas, exigindo maior consumo energético para manter a viabilidade das células. Ainda, verificou-se que a atividade do ciclo de Krebs aumentou cerca de três vezes na presença do glutamato no meio, com relação ao meio contendo apenas lisina.



## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, D. C.; BRUMLIK, M. J.; LEE, L.; JENSEN, S. E. Early cephamycin biosynthetic genes are expressed from a polycistronic transcript in *Streptomyces clavuligerus*. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 2, p. 348.356, 2000.
- ANTONIO, T; BELLÃO, C.; CORRÊA, T.; CAVALLIERI, A. P.; BADINO, A. C.; ARAUJO, M. L. G. C. Evaluation of different media for production of cephalosporins by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 55, n. 6, 2012, In press.
- ARAUJO, M. L. G. C.; GIORDANO, R. C.; HOKKA, C. O. Studies on the respiration rate of free and immobilized cells of *Cephalosporium acremonium* in cephalosporin C production. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 63, p. 593.600, 1999.
- ARGUESO, J. L.; CARAZZOLLE, M. F.; MIECZKOWSKI, P. A.; DUARTE, F. M.; CARVALHO NETTO, O. V.; MISSAWA, S. K.; GALZERANI, F.; COSTA, G. G.; VIDAL, R. O.; NORONHA, M. F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M. G.; ANDRIETTA S. R.; CUNHA, A. F.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C.; ALCARDE, A. R.; DIETRICH F. S.; McCUSKER, J. H.; PETES, T. D.; PEREIRA, G. A. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Res**, v. 19, p. 2258.2270, 2009.
- BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Nat. Prod. Rep.**, v. 14, n. 4, p. 309.333, 1997.
- BELLÃO, C.; ANTONIO, T.; ARAUJO, M. L. G. C.; BADINO, A. C. Production of acid clavulanic and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* in different fed.batch conditions. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 30, n. 2, p. 257.266, 2013.
- BIRD, A. E.; BELLIS, J. M.; GASSON, B. C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. **Analyst**, v. 107, n. 1279, p. 1241.1245, 1982.
- BRAKHAGE, A. A. Molecular regulation of  $\beta$ -Lactam biosynthesis in filamentous fungi. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 547. 585, 1998.
- BUSHELL, M. E.; KIRK, S.; ZHAO, H.J.; ROSA, C. A. A. Manipulation of the physiology of clavulanic acid biosynthesis with the aid of metabolic flux analysis. **Enz. Microb. Technol.**, v. 39, n. 1, p. 149.157, 2006.
- BUSSARI, B.; SURVASE, S. A.; SAUDAGAR, P. S.; SINGHAL, R. S. An integrated approach for production of cephamycin C using *Streptomyces clavuligerus* NT4: sequential optimization of production medium and effect of amino acids. **Curr. Trends Biotechnol. Pharm.**, v. 3, p. 372.384, 2009.
- BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: VANDAMME, E. J. (Ed.). **Biotechnology of industrial antibiotics**. New York: Marcel Dekker, 1984, p. 3.31.

CAVALLIERI, A. P. **Estudo de fluxos metabólicos na produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus***. 2014. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) . Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, p. 14555-14561, 2003.

CHARUSANTI, P.; FONG, N. L.; NAGARAJAN, H.; PEREIRA, A. R.; LI, H. J.; ABATE, E. A.; SU, Y.; GERWICK, W. H.; PALSSON, B. O. Exploiting adaptive laboratory evolution of *Streptomyces clavuligerus* for antibiotic discovery and overproduction. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0033727.

CRUZ, A. J. G.; PAN, T.; GIORDANO, R. C.; ARAUJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O. Cephalosporin C production by immobilized *Cephalosporium acremonium* cells in a repeated batch tower bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 85, p. 96-102, 2004.

CUNDLIFFE, E.; DEMAIN, A.L. Avoidance of suicide in antibioticproducing microbes. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 37, n. 7, p. 643-672, 2010.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Involvement of nitrogen-containing compounds in  $\beta$ -lactam biosynthesis and its control. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 26, n. 2, p. 67-82, 2006.

DOMINGUES, L. C. G.; TEODORO, J. C.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C.; ARAUJO, M. L. G. C. Optimisation of the glycerol.to.ornithine molar ratio in the feed medium for the continuous production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. **Biochem. Eng. J.** , v. 53, p. 7-11, 2010.

ETTLINGER, L.; GÄUMANN, E.; HÜTTER, R.; KELLER.SCHIERLEIN, W.; KRADOLFER, F.; NEIPP, L.; PRELOG, V.; ZÄHNER, H. Stoffwechsel produkte von actinomyceten, holomycin. **Helv. Chim. Acta.**, v. 42, p. 563-569, 1959.

FANG, A.; KEABLES, P.; DEMAIN, A. L. Unexpected enhancement of  $\beta$ -lactam antibiotic formation in *Streptomyces clavuligerus* by very high concentrations of exogenous lysine. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 44, p. 705-709, 1996.

FREDRICKSON, A. G.; MEGEE, R. D.; TSUCHIYA, H. M. Mathematical models for fermentation processes. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 13, p. 419-465, 1970.

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

GARCIA.DOMINGUEZ, M.; MARTIN, J. F.; LIRAS, P. Characterization of sugar uptake in wild.type *Streptomyces clavuligerus*, which is impaired in glucose uptake, and in a glucose.utilizing mutant. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 12, p. 6808-6814, 1989.

GEROSA, L.; SAUER, U. Regulation and control of metabolic fluxes in microbes **Curr. Op. Biotechnol.**, v. 22, p. 1.10, 2011.

GIERSH, C. Mathematical of metabolism. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 3, p. 249.253, 2000.

GOEL, A.; FERRANCE, J.; JEONG, J.; ATAAI, M. M. Analysis of metabolic fluxes in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 42, n. 6, p. 686.696, 1993.

GOMBERT A. K.; NIELSEN, J. Mathematical of metabolism. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 11, p. 180.186, 2000.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667.679, 2010.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, n. 2, p. 422.427, 1972.

HIGGINS, C. E.; KASTNER, R. E. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a beta-lactam antibiotic producer. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 21, p. 326.331, 1971.

KENING, M.; READING, C. Holomycin and an antibiotic (MM 19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. **J. Antibiot.**, v. 32, n. 6, p. 549.554, 1979.

KIESER, T.; CHATER, K. F.; BIBB, M. J.; BUTTNER, M. J.; HOPWOOD, D. A. **Practical streptomyces genetics**. Norwich: John Innes, p. 613, 2000.

KORKE, R.; RINK, A.; SEOW, T. K.; CHUNG, M. C. M.; BEATTIE, C. W.; HU, W. S. Genomic and proteomic perspectives in cell culture engineering. **J. Biotechnol.**, v. 94, n. 1, p. 73.92, 2002.

LAVARDA, S. C. S.; HOKKA, C. O.; ARAUJO, M. L. G. C. Clavulanic acid production processes in a tower bioreactor with immobilised cells. **Biochem. Eng. J.**, v. 39, p. 131.136, 2008.

LEDUY, A.; ZAJIC, J. E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and product formation. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 15, n. 4, p. 805.810, 1973.

LEITE, C. A.; CAVALLIERI, A. P.; ARAUJO, M. L. G. C. Enhancing effect of lysine combined with other compounds on cephamycin C production in *Streptomyces clavuligerus*. **BMC Microbiol.**, v. 13, p. 1.11, 2013.

LI, B.; WALSH, C. T. Identification of the gene cluster for the dithiolopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 107, n. 46, p. 19731.19735, 2010.

LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 109.124, 1999.

LIRAS, P. Holomycin, a dithiopyrrolone compound produced by *Streptomyces clavuligerus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 98, n. 3, p. 1023.1030, 2014.

LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*: microbial processes and products. In: BARREDO, J. L. (Ed.). **Methods in biotechnology**. New Jersey: Humana Press, 2005. v. 18, p. 149.163.

LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? **Int. Microbiol.**, v. 9, p. 9.19, 2006.

LORENZANA, L. M.; PÉREZ.REDONDO, R.; SANTAMARTA, I.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Two oligopeptide permease encoding genes in the clavulanic acid cluster of *Streptomyces clavuligerus* are essential for production of the beta-lactamase inhibitor. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 11, p. 3431.3438, 2004.

MADDURI, K.; STUTTARD, C.; VINING, L. C. Lysine catabolism in *Streptomyces spp.* is primarily through cadaverine:  $\beta$ .lactam producers also make alpha.aminoadipate. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 1, p. 299.302, 1989.

MALMBERG, L. H.; HU, W. S; SHERMAN, D. H. Precursor flux control through targeted chromosomal insertion of the lysine 6.amino transferase (lat) gene in cephamycin C biosynthesis. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 21, p. 6916.6924, 1993.

MARQUARDT, D. W. An algorithm for least.squares estimation of nonlinear parameters. **J. Soc. Ind. App. Math.**, v. 11, n. 2, p. 431.441, 1963.

MARTIN, J. F. New aspects of genes and enzymes for  $\beta$ .lactam antibiotic biosynthesis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, n. 1, p. 1.15, 1998.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 1, p. 371.394, 1949.

NAGARAJAN, R.; BOECK, L. D.; GORMAN, M.; HAMILL, R. L.; HIGGINS, C. E.; HOEHN, M. M.; STARK, W. M.; WHITNEY, J. G. Beta-lactam antibiotics from *Streptomyces*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 93, p. 2308.2310, 1971.

OKAMURA, K.; SOGA, K.; SHIMAUCHI, Y.; ISHIKURA, T. Holomycin and Npropionyl.holothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. **J. Antibiot.**, v. 30, p. 334.336, 1977.

OLIVEIRA, J. H.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M.; TRSIC, M. Clavulanic acid and cephamycin C: a perspective of the biosynthesis, isolation and action mechanism. **Quím. Nova**, v. 32, n. 8, p. 2142.2150, 2009.

OMSTEAD, D. R.; HUNT, G. H.; BUCKLAND, B. C. Commercial production of cephamycin antibiotics. In: MOO.YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive biotechnology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 3, chap. 9, p. 187.210.

PATNAIK, R. Engineering complex phenotypes in industrial strains. **Biotechnol. Prog.**, v. 24, p. 38.47, 2008.

PRICE, N. P. J.; TSVETANOVA, B. Biosynthesis of the tunicamycins: a review. **J. Antibiot.**, v. 60, n. 8, p. 485.491, 2007.

QIN, Z.; BAKER, A. T.; RAAB, A.; SHENG, H.; WANG, T.; YU, Y.; JASPARS, M.; SECOMBES, C. J.; DENG, H. The fish pathogen *Yersinia ruckeri* produces holomycin and uses an RNA methyltransferase for self-resistance. **Biol. Chem.**, v. 288, n. 21, p. 14688.14697, 2013.

ROBLES.REGLERO, V.; SANTAMARTA, I.; ÁLVAREZ.ÁLVAREZ, R.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. **J. Biotechnol.**, v. 163, n. 1, p. 69.76, 2013.

ROCHA, I.; MAIA, P.; EVANGELISTA, P.; VILAÇA, P.; SOARES, S.; PINTO, J. P.; NIELSEN, J.; PATIL, K. R.; FERREIRA, E. C.; ROCHA, M. OptFlux: an open.source software platform for in silico metabolic engineering. **BMC Syst. Biol.**, v. 4, n. 1, p. 45, 2010.

RODRIGO, G.; CARRERA, J.; ELENA, S. F. Network design meets *in silico* evolutionary biology. **Biochimie**, v. 92, p. 746.752, 2010.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTIN, J. F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 20, n. 5, p. 318.325, 1984.

SÁNCHEZ, L.; BRAÑA, A. F. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Microbiology**, v. 142, p. 1209.1220, 1996.

SANTAMARTA, I.; LÓPEZ.GARCÍA, M. T.; PÉREZ.REDONDO, R.; KOEKMAN, B.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Connecting primary and secondary metabolism: AreB, an IclR.like protein, binds the AREccaR sequence of *S. clavuligerus* and modulates leucine biosynthesis and cephamycin C and clavulanic acid production. **Mol. Microbiol.**, v. 66, n. 2, p. 511.524, 2007.

SAUDAGAR, P. S.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Clavulanic acid: a review. **Biotechnol Adv.**, v. 26, p. 335.351, 2008.

SCHILLING, C. H.; SCHUSTER, S.; PALSSON, B. O.; HEINRICH, R. Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post-genomic era. **Biotechnol. Prog.**, v. 15, n. 3, p. 296.303, 1999.

STAPLEY, E. O.; JACKSON, M.; HERNANDEZ, S.; ZIMMERMAN, S. B.; CURRIE S. A.; MOCHALES, S.; MATA J. M.; WOODRUFF, H. B.; HENDLIN, D. Cephamycins, a new family of  $\beta$ -lactam antibiotics i. production by actinomycetes, including *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 2, n. 3, p. 122.131, 1972.

STELLING, J. Mathematical models in microbial systems biology. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 7, p. 513.518, 2004.

STEPHANOPOULOS, G. Metabolic fluxes and metabolic engineering. **Metab. Eng.**, v. 1, p. 1.11, 1999.

STEPHANOPOULOS, G.; VALINO, J. J. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. **Science**, v. 252, p. 1675.1681, 1991.

TEODORO, J. C.; BAPTISTA.NETO, A.; ARAUJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Influence of glycerol and ornithine feeding on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 27, n. 4, p. 499.506, 2010.

TIWARI, K.; GUPTA, R. K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 32, p. 108.132, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**. 10th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2010.

VAN GULIK, W. M.; DE LAAT, W. T. A. M.; VINKE, J. L.; HEIJNEN, J. J. Application of metabolic flux for the identification of metabolic bottlenecks in the biosynthesis of penicillin.G. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 68, n. 6, p. 602.618, 2000.

VILLADSEN, J.; NIELSEN, J.; LIDÉN, G. Biochemical reaction networks. In: \_\_\_\_\_ .**Bioreaction engineering principles**. New York: Springer, 2011. p. 151.215.

WIETZ, M.; MANSSON, M.; GOTFREDSEN, C. H.; LARSEN, T. O.; GRAM, L. Antibacterial compounds from marine vibronaceae isolated on a global expedition. **Mar. Drugs**, v. 8, p. 2946.2960, 2010.

ZHU, H.; SANDIFORD, S. K.; VAN WEZEL, G. P. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 41, p. 371.386, 2014.