ANDRÉ PASTRELO CAVALLIERI

"Distribuição de fluxos metabólicos na produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*"

Orientador: Profa. Dra. Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo

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

ARARAQUARA

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Cavallieri, André Pastrelo
C459d Distribuição de fluxos metabólicos na produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* / André Pastrelo Cavallieri. – Araraquara : [s.n], 2014
102 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo

1. Biotecnologia. 2. Antibióticos beta-lactâmicos. 3. Metabolismo. 4. *Streptomyces clavuligerus*. 5.Fluxos metabólicos. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

ANDRÉ PASTRELO CAVALLIERI

Formação acadêmica/titulação

2010-2014 Doutorado em andamento em Biotecnologia.
Instituto de Química de Araraquara- UNESP, IQAR-UNESP, Brasil
Título: Análise de fluxos metabólicos para a produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*
Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo
Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2008 - 2010 Mestrado em Biotecnologia.
Instituto de Química de Araraquara- UNESP, IQAR-UNESP, Brasil
Título: Adição de precursores em meio complexo solúvel para a produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*, Ano de obtenção: 2010
Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2002 - 2008 Graduação em Farmácia-Bioquímica.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

Formação complementar

2009 - 2009 Curso de curta duração em Engenharia Metabólica.
Simpósio Nacional de Bioprocessos, SINAFERM, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Operação e manutenção básica do Sistema HPLC.
Scientific Instruments CO., SINC, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Importância das Interações Medicamentosas na Terapêutica da Terceira Idade.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Técnicas de Separação Cromatográficas.
Instituto de Química de Araraquara- UNESP, IQAR-UNESP, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Simpósio de Propaganda de Medicamentos.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Validade Científica do Modelo Homeopático.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Desenvolvimento de Fármacos no Brasil.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Atualização Terapêutica: AINEs Inibidores de COX 2.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Módulo Temático Empresarial.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em II Simpósio de Psicofarmacologia- Transtornos de Depressão.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Biofarmácia: Importância no Desenvolvimento Farmacotécnico e na Qualidade Terapêutica de Medicamentos.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em HIV/AIDS: Impacto Social, Estratégias de Combate e a Contribuição da Ciência.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Farmácia Hospitalar.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em O Papel do Farmacêutico na Área de Marketing e Atendimento ao Consumidor.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Simpósio de Alimentos Nutracêuticos.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2004 - 2004 Curso de curta duração em Sistema de Liberação de Farmácos.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2004 - 2004 Curso de curta duração em Desenvolvimento de Fármacos no Brasil.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2004 - 2004 Curso de curta duração em Saneamento Ambiental.
Instituto de Química de Araraquara- UNESP, IQAR-UNESP, Brasil

2004 - 2004 Curso de curta duração em Gestão Ambiental de Resíduos.
Instituto de Química de Araraquara- UNESP, IQAR-UNESP, Brasil

2004 - 2004 Curso de curta duração em Benefícios dos Silicones no Cuidado aos Cabelos.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2004 - 2004 Curso de curta duração em Garantia de Qualidade em Farmácia.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

2004 - 2004 Curso de curta duração em Cachaça- da Produção ao Controle da Qualidade.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, FCFAR-UNESP, Brasil

---

Áreas de atuação

1. Microbiologia Industrial e de Fermentação
2. Microbiologia Aplicada
3. Bioquímica dos Micro-organismos
4. Biotecnologia

Prêmios e títulos

2008 Classificação em 5º lugar na avaliação dos trabalhos cíentíficos da 55ª Jornada Farmacêutica da UNESP, Comissão organizadora da 55ª Jornada Farmacêutica da UNESP

Produção bibliográfica
Artigos completos publicados em periódicos

1. LEITE, C. A., **CAVALLIERI, A. P.**, ARAUJO, M. L. Enhancing effect of lysine combined with other compounds on cephamycin C production in *Streptomyces clavuligerus*. **BMC Microbiology**, v.13, n. 296, 2013.

2. ANTONIO, T.; BELLÃO, C.; CORRÊA, T.; **CAVALLIERI, A. P.;** BADINO, A. C.; ARAUJO, M. L. G. C. Evaluation of different media for the production of cephalosporins by Streptomyces clavuligerus ATCC 27064. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55, p.819 - 825, 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. Cavallieri, A. P.; Araujo, M. L. G. C. Adição de Lisina e Ácido alfa-Aminoadípico para a Produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2011, Caxias do Sul-RS. **Anais do XVIII Simpósio Nacional**

de Bioprocessos. , 2011.

2. Cavallieri, A. P.; Araujo, M. L. G. C. Efeito da adição de l-lisina e ácido alfa-aminoadípico na produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* In: IVSeminário do Projeto Temático - Fapesp Proc. 05/55079-4, 2010, São Carlos. **Anais do IV Seminário do Projeto Temático - Fapesp Proc. 05/55079-4**. , 2010.

3. Cavallieri, A. P.; CORREA, T., Araujo, M. L. G. C. Atividade de lisina-6-aminotransferase na produção de cefamicina C em meio complexo adicionado de lisina In: III Seminário do Projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4, 2009, São Carlos - SP. **Anais do III Seminário do Projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4**. , 2009.

4. Cavallieri, A. P.; BELLAO, C.; Badino, A. C.; Araujo, M. L. G. C. Estratégias de Eliminação de Biocompostos Interferentes na Análise de Cefamicina C por Bioensaio In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal - RN. **Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**. , 2009.

5. Cavallieri, A. P.; CORREA, T.; TEODORO, J. C.; Araujo, M. L. G. C. Influência da Adição de L-Lisina em Meio Complexo na Atividade de Lisina-6-Aminotransferase e na Produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal - RN. **Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**. , 2009.

6. Cavallieri, A. P.; BELLAO, C.; Araujo, M. L. G. C; Badino, A. C. Influência das presenças de Ácido Clavulânico e Penicilina N na análise Cefamicina C In: III Seminário do Projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4, 2009, São Carlos. **Anais do III Seminário do projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4**. , 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. 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.

2. Cavallieri, A. P.; CILLI, E. M.; Araujo, M. L. G. C.
Effect of the Addition of Amino Acids in the Cephamycin C Production by *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064 In: XXXIX Reunião Anuala da Sociedade Brasileira de bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu. **Anais da XXXIX Reunião Anuala da Sociedade Brasileira de bioquímica e Biologia Molecular**. , 2010.

3. Cavallieri, A. P.; HEGUEDUSCH, D. F.; Suarez Jr. J. A. O.; MOREIRA, R. R. D.
Farmacovigilância de Fitoterápicos em Araraquara - SP In: 55ª Jornada Farmacêutica da Unesp, 2008, Araraquara. **Anais da 55ª Jornada Farmacêutica da Unesp**. , 2008.

4. Cavallieri, A. P.; Araujo, M. L. G. C. Uso de Penicilinase na Análise de Cefamicina C Produzida em Meio Fermentativo de *Streptomyces clavuligerus* In: 55ª Jornada Farmacêutica da Unesp, 2008, Araraquara. **Anais da 55ª Jornada Farmacêutica da Unesp**. , 2008.

5. Cavallieri, A. P.; Lisboa H.C.F.; Sponchiado S.R.P. Evaluation of the tyrosinase activity in

melanized strain of *Aspergillus nidulans* In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq, 2005, Águas de Lindóia. **XXXIV Reunião da Sociedade da Sociedade de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq**. São Paulo: Adaltech Soluções para Eventos, 2005. v.XXXIV.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. Cavallieri, A. P.; Araujo, M. L. G. C. Análise de fluxos metabólicos para a produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* In: IVSeminário do Projeto Temático - Fapesp Proc. 05/55079-4, 2010, São Carlos. **Anais do IV Seminário do Projeto Temático - Fapesp Proc. 05/55079-4**. , 2010.

2. Cavallieri, A. P.; Araujo, M. L. G. C. Influência de precursores em meio complexo solúvel na produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* In: III Seminário do Projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4, 2009, São Carlos. **Anais do III Seminário do Projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4**. , 2009.

3. Cavallieri, A. P.; Garcia Jr., Os.; Sponchiado S.R.P. Biossorção de Lantânio e Neodímio Pela Biomassa de *Aspergillus nidulans* In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007. **Anais do XIX congresso de Iniciação Científica da UNESP**. , 2007.

4. Cavallieri, A. P.; Garcia Jr., O.; Sponchiado S.R.P. Biossorção de Neodímio pela Linhagem Melanizada do fungo *Aspergillus nidulans* In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2006, Botucatu. **Anais do XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP**. , 2006.

Apresentação de trabalho e palestra

1. Cavallieri, A. P.; Cilli, E. M.; Araujo, M. L. G. C. Effect of the Addition of Amino Acids in the Cephamycin C Production by *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Eventos
Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no **XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2013. (Congresso)
Purificação de Holomicina produzida por uma linhagem mutante de *Streptomyces clavuligerus*.

2. Apresentação de Poster / Painel no **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM**, 2011. (Congresso)
Adição de Lisina e Ácido alfa;-Aminoadípico para a Produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*.

3. Apresentação Oral no **IV Seminário do Projeto Temático - Fapesp 05/55079-4**, 2010. (Seminário)
Análise de fluxos metabólicos para a produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*.

4. Apresentação Oral no **IVSeminário do Projeto Temático - Fapesp Proc. 05/55079-4**, 2010. (Seminário)
Efeito da adição de l-lisina e ácido alfa;-aminoadípico na produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*.

5. Apresentação de Poster / Painel na **XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2010. (Congresso)
Effect of the Addition of Amino Acids in the Cephamycin C Production by *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064.

6. Apresentação Oral no **III Seminário do Projeto Temático - Fapesp Proc 05/55079-4**, 2009. (Seminário)
Atividade de lisina-6-aminotransferase na produção de Cefamicina C em meio complexo adicionado de lisina.

7. Apresentação de Poster / Painel no **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2009. (Congresso)
Estratégias de Eliminação de Biocompostos Interferentes na Análise de Cefamicina C por Bioensaio.

8. Apresentação de Poster / Painel no **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2009. (Congresso)
Influência da Adição de L-Lisina em Meio Complexo na Atividade de Lisina-6-Aminotransferase e na Produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*.

9. Apresentação Oral no **III Seminário do Projeto Temático - Proc. Fapesp 05/55079-4**, 2009. (Seminário)
Influência das presenças de Ácido Clavulânico e de Penicilina N na análise de Cefamicina C.

10. Apresentação Oral no **III seminário do Projeto Temático - Fapesp Proc. 05/55079-4**, 2009. (Seminário)
Influência de precursores em meio complexo soluvel na produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*.

11. Apresentação de Poster / Painel na **55ª Jornada farmacêutica da Unesp**, 2008.
Farmacovigilância de Fitoterápicos em Araraquara - SP.

12. Apresentação de Poster / Painel na **55ª Jornada Farmacêutica da Unesp**, 2008.
Uso de Penicilinase na Análise de Cefamicina C Produzida em Meio Fermentativo de Streptomyces clavuligerus.

13. **XXXVIII Semana da Química**, 2008.

14. Apresentação de Poster / Painel no **XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2007. (Congresso)
Biossorção de Lantânio e Neodímio Pela Biomassa de *Aspergillus nidulans*.

15. Apresentação de Poster / Painel no **XVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, 2006. (Congresso)

Biossorção de Neodímio pela linhagem melanizada do fungo *Aspergillus nidulans*.

16. **53ª Jornada Farmacêutica da Unesp**, 2006.

17. **52ª Jornada Farancêutica da UNESP**, 2005.

18. **XXX IV Semana da Química Shirley Ana Maria Costa**, 2004.

19. **51ª Jornada Farmacêutica da Unesp**, 2004.

Outras informações relevantes

- Aula ministrada intitulada "Enzimas Oxidorredutases", na disciplina Enzimologia Farmmacêutica oferecida aos alunos do curso Farmácia-Bioquímica-Integral, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, totalizando 2 horas de aula.

- Aula ministrada intitulada "Enzimas Oxidorredutases", na disciplina Enzimologia Farmmacêutica oferecida aos alunos do curso Farmácia-Bioquímica-Noturno, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, totalizando 2 horas de aula.

-Estágio final para conclusão do curso de graduação em Farmácia-Bioquímica na área de "Screening de substâncias bioativas em fungos endofíticos", perfazendo 400 horas (Ano de 2007).

- Iniciação científica em Biossorção de metais terras raras por *Aspergilus nidulans*; Bolsita PIBIC/CNPq no período de setmbro/2005 a dezembro/2007.

-Estudo de parâmetros cinéticos e ativação da enzima tirosinase em fungos melanizados da espécie *Aspergilus nidulans* (Ano de 2004).

-Realização de estágio intitulado Noções Gerais de Microbiologia e Análise da mutação responsável pelo aumento da pigmentacão em *Aspergillus nidulans*, perfazendo total de 800 horas (Ano de 2003).

ANDRÉ PASTRELO CAVALLIERI

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

Araraquara, 01 de abril de 2014.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. José Roberto Ernandes
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Ruy de Sousa Junior
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCAR, São Carlos

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCAR, São Carlos

Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez
Instituto de Ciências Biomédicas – USP, São Paulo

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela sabedoria e capacidade de realização que a nós concedeu, sem as quais este trabalho não seria realizado.

A meu pai **Antonio Sérgio Cavallieri** e a minha mãe **Rosa de Fátima Pastrelo Cavallieri**, pelos valores que me ensinaram, pois sem estes de nada me valeria um título de doutor.

A minha orientadora **Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo** pelos valiosos ensinamentos científicos. Agradeço também pela paciência, dedicação e amizade. Acredito que fizemos uma bela parceria ao longo destes anos.

A minha namorada, **Carla Andréa Leite**, com quem compartilhei, tanto profissionalmente como pessoalmente, estes quatro anos de meu doutorado. Obrigado pelo valiosos auxílio na realização de muitos experimentos. Agradeço também pelo seu incondicional apoio em todos os momentos.

A mestranda **Amanda Salvador Baptista** pelo auxílio na obtenção de dados para simulação dos modelos metabólicos.

Ao químico **Ademir Geraldo Cavallari Costa Longa** pelas valiosas sugestões e enorme auxílio na operação do HPLC.

Aos amigos de Laboratório **Thiago Augusto Nascimento**, **João Pedro Sacrato de Oliveira**, **Thaline de Matos Carbonaro**, **Maria Lucia Frade**, **Tatiana Antonio e Caroline Leite**. Obrigado pelo auxílio nas atividades de trabalho e por tornar o ambiente de trabalho mais leve, diminuindo as tensões do dia a dia.

Aos **meus amigos**. Obrigado pelos excelentes momentos que me proporcionaram, possibilitando revitalizar as forças para vencer os obstáculos que nos são impostos ao longo do pecurso.

A **CAPES** pela bolsa concedida.

“Algo só é impossível até que alguém duvide e resolva provar o contrário.”
Albert Einstein

“Devemos julgar um homem mais pelas suas perguntas que pelas respostas.”
Voltaire

RESUMO

Cefamicina C é um antibiótico produzido por *Streptomyces clavuligerus* de grande interesse, em virtude de seu maior grau de resistência a enzimas do tipo β-lactamases comparativamente a outros antibióticos beta-lactâmicos. Cefamcina C é produzida em pequenas concentrações na natureza assim como acontece com todos os metabólitos secundários. Assim, investimentos em programas de melhoria de linhagens e de otimização de meios de cultura e operação de biorreatores são aspectos-chave para o aumento da produção industrial. Porém, a eficácia de tais estratégias pode ser limitada, o que requer o uso de novas abordagens. Neste sentido, a engenharia metabólica é uma área importante que alia ferramentas de quantificação de fluxos metabólicos e de técnicas de biologia molecular para melhoria de linhagens. O estudo dos fluxos metabólicos permite, por meio de análise criteriosa do metabolismo do micro-organismo, identificar gargalos metabólicos na rota biossintética de um produto de interesse para, posteriormente, propor possíveis soluções para o aumento da produção. No presente projeto realizou-se o estudo dos fluxos metabólicos de *S. clavuligerus* com vistas a encontrar formas de operação do metabolismo que conduzam a aumentos da produção de cefamicina C. Para isto, primeiramente foi desenvolvido um meio de cultivo quimicamente definido contendo maltose como fonte de carbono e lisina como fonte de nitrogênio, para que análises do caldo fermentado não tivessem interferência de componentes desconhecidos. Tal meio possibilitou a obtenção de biomassa em torno de 9 $g.L^{-1}$ e cefamicina C ao redor de 200 $mg.L^{-1}$ em processo contínuo. Este modo de operação foi possível somente em biorreator devido ao controle de pH, pois em shaker as variações deste parâmetro inviabilizaram o processo. Paralelamente, foi construído um modelo metabólico com 78 reações e 81 metabólitos, sendo 10 externos e 71 internos, que descreveu apropriadamente o metabolismo de *S. clavuligerus*. Este modelo foi simulado com auxílio do programa Optflux, um software multi-tarefa desenvolvido especialmente para esta finalidade. Os perfis de maltose, lisina, biomassa, cefamicina C, ácido clavulânico, proteína externa e CO_2 na saída de gases foram monitorados e os dados obtidos foram utilizados para a simulação do modelo. Os resultados de simulação possibilitaram calcular os valores para energia de manutenção que, em comparação com a literatura de referência, mostraram-se adequados. As soluções das simulações mostraram que aumentos na produção de cefamicina C não provocariam grandes mudanças no metabolismo do carbono e na produção de energia para a célula. Porém, no metabolismo do nitrogênio mudanças significativas seriam necessárias, pois os fluxos deste elemento parecem estar limitando a produtividade de cefamicina C.

Palavras-chave: Análise de fluxos metabólicos. *Streptomyces clavuligerus*. Meio quimicamente definido. Cefamicina C. Ácido clavulânico.

ABSTRACT

Cephamycin C is an antibiotic produced by *Streptomyces clavuligerus* of great interest due to its higher degree of resistance to β-lactamases as compared to other beta- lactam antibiotics. Cephamycin C is produced in small concentrations in nature as with all secondary metabolites. Therefore, investments in improvement of strains and optimization, of culture media and operation of bioreactors are key aspects to increase the production. However, the effectiveness of such strategies may be limited, requiring the use of new approaches. In this aspect, the metabolic engineering is an important field that combines quantification of metabolic fluxes and molecular techniques for improving strains. The study of metabolic fluxes enables one to identify metabolic bottlenecks through careful analysis of metabolism of the microorganism, and to suggest ways to increase production. In this project we carried out the study of metabolic fluxes in *S. clavuligerus* aiming to find ways to increase the production of cephamycin C. For this, first we developed a chemically defined culture medium because this kind of media does not cause interference in the analyses. The developed medium contained maltose as carbon source and lysine as nitrogen source and resulted in 9 $g.L^{-1}$ of biomass and 200 $mg.L^{-1}$ of cephamycin C in the continuous process. This mode of operation was only possible in the bioreactor due to its pH control. Due to variations in the pH, the continuous process in shaken-flasks became unviable. The metabolic model was constructed with 78 reactions and 81 metabolites (10 external and 71 internal) which suitably described the metabolism of *S. clavuligerus*. This model was simulated with the aid of Optflux, a multi-task software developed for this purpose. The profiles of maltose, lysine, biomass, cephamycin C, clavulanic acid, external protein and CO_2 evolution were monitored. These data were used for the model simulations. The results allowed obtaining suitable values for the maintenance energy, according to the reference literature values. The solutions of the simulations showed that increases in the production of cephamycin C would not cause major changes in carbon metabolism and maintenance energy. However, in the nitrogen metabolism significant changes should be necessary, since the flow of this element limits the increase in the productivity of cephamycin C.

Keywords: Metabolic flux analysis. *Streptomyces clavuligerus*. Chemically defined medium. Cephamycin C. Clavulanic acid.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3. 1- ESTRUTURA QUÍMICA DO ANEL B-LACTÂMICO.....25
FIGURA 3. 2 - SUBCLASSES DE COMPOSTOS B-LACTÂMICO.....26
FIGURA 3. 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA CEFAMICINA C.....27
FIGURA 3. 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ANTIBIÓTICO SEMI-SINTÉTICO CEFOXITINA.....27
FIGURA 3. 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO CLAVULÂNICO.....28
FIGURA 3. 6 - ROTAS BIOSSINTÉTICAS EM *S. CLAVULIGERUS* DE (A) CEFC E (B) AC.....29
FIGURA 3. 7 - CONE POLIÉDRICO F REPRESENTANDO GRAFICAMENTE O ESPAÇO SOLUÇÃO PARA AS EQUAÇÕES 3.2 E 3.3.....32
FIGURA 3. 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS PRINCIPAIS METODOLOGIAS PARA ESTUDO DE FLUXOS, APLICADAS A UMA REDE METABÓLICA SIMPLES.....34
FIGURA 4. 1- ETAPAS DE CULTIVO DE *S. CLAVULIGERUS* EM FRASCOS AGITADOS.....41
FIGURA 4. 2 - CURVA DE CALIBRAÇÃO TÍPICA DE CEPC.....48
FIGURA 5. 1 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA ANÁLISE DE UMA SOLUÇÃO DE LISINA 2 G/L, VOLUME DE INJEÇÃO IGUAL A 10 ML, COM COLUNA SHIMADZU SCR-102H.....52
FIGURA 5. 2 - CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA ANÁLISE DE UMA SOLUÇÃO DE NACL 2 G/L, VOLUME DE INJEÇÃO IGUAL A 10 ML, COM COLUNA SHIMADZU SCR-102H.....52
FIGURA 5. 3– CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DA ANÁLISE DE UMA SOLUÇÃO DE $CACL_2$ 0,2 G/L, VOLUME DE INJEÇÃO IGUAL A 10 ML, COM COLUNA SHIMADZU SCR-102H.....52
FIGURA 5. 4- CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DE AMOSTRA DE 24HORAS DE CULTIVO, VOLUME DE INJEÇÃO IGUAL A 10 ML, COM COLUNA SHIMADZU SCR-102H.....53
FIGURA 5. 5– CROMATOGRAMA OBTIDO A PARTIR DE AMOSTRA DE 24HORAS DE CULTIVO, VOLUME DE INJEÇÃO IGUAL A 10 ML, COM COLUNA SHIMADZU DE TROCA IÔNICA SHIM-PACK NA.....53
FIGURA 5. 6 - CEPC TOTAIS OBTIDAS EM MEIO COMPLEXO PARA OS CULTIVOS C1 A C5.....55
FIGURA 5. 7 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS DE UMA SOLUÇÃO DE GLICOSE 10 G/L (A) E DE UMA AMOSTRA DO MEIO C8 EM 12 HORAS DE CULTIVO (B).....57
FIGURA 5. 8 – BIOMASSA, CEPC TOTAIS, PRODUÇÃO ESPECÍFICA, MALTOSE RESIDUAL E PH PARA OS CULTIVOS C6 (A), C7(B) E C8(C).....58
FIGURA 5. 9 – IMAGENS DE CALDOS RESULTANTES DE CULTIVO CONTÍNUO INTERMITENTE DE 96 HORAS EM FRASCOS AGITADOS: COLORAÇÃO NORMAL À ESQUERDA E COLORAÇÃO VERDE-ACINZENTADA À DIREITA.59
FIGURA 5. 10 – CULTIVO C9: BIOMASSA, CEPC TOTAIS, PRODUÇÃO ESPECÍFICA E PH EM CULTIVO CONTÍNUO INTERMITENTE EM FRASCOS AGITADOS COM MEIO QUIMICAMENTE DEFINIDO.....60
FIGURA 5. 11 - CULTIVO C10: BIOMASSA, CEPC TOTAIS, PRODUÇÃO ESPECÍFICA, LISINA RESIDUAL, MALTOSE RESIDUAL E PH EM CULTIVO CONTÍNUO INTERMITENTE EM FRASCOS AGITADOS COM MEIO QUIMICAMENTE DEFINIDO.....60

FIGURA 5. 12– CULTIVO C11: BIOMASSA, CEPC TOTAIS, PRODUÇÃO ESPECÍFICA E MALTOSE RESIDUAL EM CULTIVO CONTÍNUO INTERMITENTE EM BIORREATOR.....62
FIGURA 5. 13 – PERFIS DE MALTOSE (A), LISINA (B), BIOMASSA (C) E CEPC TOTAIS (D) OBTIDOS EM CULTIVO COM C12.....63
FIGURA 5. 14 – PERFIS DE MALTOSE (A) , LISINA (B), BIOMASSA (C), CEPC TOTAIS (D) E AC (E) NO CULTIVO C13 64
FIGURA 5. 15 - PERFIS DE MALTOSE (A), LISINA (B), BIOMASSA (C), CEPC TOTAIS (D) E AC (E) NO CULTIVO C14.....65
FIGURA 5. 16 - PERFIS DE MALTOSE (A), LISINA (B), BIOMASSA (C), CEPC TOTAIS (D), AC (E), PROTEÍNA EXTERNA (F) E CO_2 NA SAÍDA DE GASES (G) NO CULTIVO C14 67
FIGURA 5. 17- PERFIS DE VELOCIDADES ESPECIFICAS DE CONSUMO DE MALTOSE (A) E DE LISINA (B), E DE FORMAÇÃO DE BIOMASSA (C), CEPC TOTAIS (D), AC (E), PROTEÍNA EXTERNA (F) E CO_2 (G). 69
FIGURA 5. 18 – PERFIS DE BIOMASSA (A) E MALTOSE (B) PARA O CULTIVO C16, AJUSTADOS PELO MODELO PROPOSTO POR MONOD (1949) 70
FIGURA 5. 19 - PERFIS DE BIOMASSA (A) E LISINA (B) PARA O CULTIVO C17, AJUSTADOS PELO MODELO PROPOSTO POR MONOD ET AL. (1949).....71
FIGURA 5. 20 - MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS FLUXOS OBJETIVANDO MAXIMIZAÇÃO DA BIOMASSA.....82
FIGURA 5. 21 - MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS FLUXOS NO CULTIVO C16. 83
FIGURA 5. 22 - MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS FLUXOS NO CULTIVO C14, MAXIMIZANDO A SECREÇÃO DE PROTEÍNA. 85
FIGURA 5. 23 - MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS FLUXOS NO CULTIVO C14, COM SECREÇÃO DE PROTEÍNA EXTERNA BASEADA EM DADOS DO CULTIVO C15 86
FIGURA 5. 24 - MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS FLUXOS DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CULTIVO C15. 90
FIGURA 5. 25 - MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS FLUXOS DURANTE A FASE CONTÍNUA DO CULTIVO C15 91
FIGURA 5. 26 - MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS FLUXOS VISANDO AUMENTOS NOS RENDIMENTOS DE CEFC 94

LISTA DE TABELAS

TABELA 4. 1 - COMPOSIÇÃO DE MEIO SÓLIDO PARA OBTENÇÃO DE ESPOROS DE *S. CLAVULIGERUS* 39
TABELA 4. 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE GERMINAÇÃO 39
TABELA 4. 3 - MEIO PARA PROPAGAÇÃO DE MICÉLIOS 39
TABELA 4. 4 – MEIO BASE DE PREPARO DE INÓCULO 41
TABELA 4. 5 - FONTES DE C E N UTILIZADAS PARA OS MEIOS DE PREPARO DE INÓCULO 42
TABELA 4. 6 - MEIO BASE DE PRODUÇÃO 42
TABELA 4. 7 - FONTES DE C E N UTILIZADAS PARA OS MEIOS DE PRODUÇÃO 43
TABELA 4. 8 - TIPOS DE MEIO UTILIZADOS NO PREPARO DO INÓCULO E NA FASE DE PRODUÇÃO PARA OS CULTIVOS C1 A C18. 44
TABELA 4. 9 - EQUIPAMENTO UTILIZADO, FORMA DE OPERAÇÃO, TAXA DE DILUIÇÃO E PERÍODO DE ALIMENTAÇÃO, PARA OS CULTIVOS C1 A C18 45
TABELA 4. 10 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE ALIMENTAÇÃO PARA OS CULTIVOS C2, C3, C4 E C5 46
TABELA 4. 11 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE ALIMENTAÇÃO PARA OS CULTIVOS C9 A C14 46
TABELA 4. 12 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE ALIMENTAÇÃO PARA O CULTIVO C15 46
TABELA 4. 13 - COMPOSIÇÃO DO ÁGAR NUTRIENTE 48
TABELA 5. 1 - FONTE DE C, N E LISINA PARA OS CULTIVOS C1, C2, C3, C4 E C5 54
TABELA 5. 2 – COMPOSIÇÃO GERAL DO MEIO DE PREPARO DE INÓCULO 56
TABELA 5. 3 - FONTES DE C E N PARA OS MEIOS DE PRODUÇÃO C6, C7 , C8, E RESPECTIVOS MEIOS DE INÓCULO UTILIZADOS 56
TABELA 5. 4 – COMPOSIÇÃO MACROMOLECULAR DA BIOMASSA 74
TABELA 5. 5 - COMPOSIÇÃO DA PROTEÍNA MÉDIA. 74
TABELA 5. 6 – COMPOSIÇÃO DO RNA E DNA. 74
TABELA 5. 7 – CULTIVO C14: MÉDIAS DE VELOCIDADES ESPECÍFICAS E VALORES DE FLUXOS NORMALIZADOS. 84
TABELA 5. 8 – VARIAÇÕES GLOBAIS DE CONSUMO DE SUBSTRATOS E FORMAÇÕES DE PRODUTOS DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CULTIVO C15 89
TABELA 5. 9 – MÉDIA DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUBSTRATOS E FORMAÇÕES DE PRODUTOS DURANTE A FASE CONTÍNUA DO CULTIVO C15 89

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 3. 1 31
EQUAÇÃO 3. 2 31
EQUAÇÃO 3. 3 31
EQUAÇÃO 4. 1 48

LISTA DE ABREVIATURAS

a-ACG – α-cetoglutarato

AC – Ácido clavulânico

ACV – L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina

AEF – Análise de equilíbrio de fluxos

AFM – Análise de fluxos metabólicos

AME – Análise de modos elementares

AVM – Análise de vias metabólicas

C – Carbono

CA-P – Carbamoil Fosfato

ccaR – cephamycin and clavulanic acid regulator

CefC – Cefamicina C

CepC – Cefalosporina C

DAC – deacetilcefalosporina C

DAOC – deacetoxicefalosporina C

GA-3P – Gliceraldeído-3-fosfato

HOCDAC – 7-hidroxi-carbamoil-deacetilcefalosporina C

LAT – Lisina- ε-aminotransferase

MOPS – tampão biológico: Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfonico

N – Nitrogênio

OCDAC – orto-carbamoil-deacetilcefalosporina C

OAA – Oxaloacetato

OPA – orto-phtalaldeído

PenG – Penicilina G

PenN – Penicilina N

PEP – Fosfoenolpiruvato

SUCC-COA – Succinil-Coenzima A

UI – Unidade internacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21

2. OBJETIVOS 23

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 24

3.1. *Streptomyces clavuligerus* 24

3.2. Antibióticos β-lactâmicos 25

3.3. Cefamicina C 26

3.4. Ácido clavulânico 28

3.5. Biossíntese de CefC e AC por *S. clavuligerus* 28

3.6. Estudo de fluxos metabólicos 30

3.7. Softwares para simulação de fluxos metabólicos 35

3.8. Análise de fluxos metabólicos em *S. clavuligerus* 35

3.9 Considerações finais 37

4. MATERIAL E MÉTODOS 38

4.1. Equipamentos 38

4.2. Micro-organismo produtor e forma de estocagem 38

4.3. Condições gerais dos cultivos 40

4.3.1. Esquema de trabalho e meios utilizados 40

4.3.2. Alimentação dos cultivos 45

4.4. Métodos analíticos 47

4.4.1. Coleta de amostras, armazenagem do sobrenadante e determinação de biomassa 47

4.4.2. Quantificação de Cefalosporinas totais 47

4.4.3. Análise de AC 49

4.4.4. Análise de maltose 49

4.4.6. Análise de proteínas externa 49

4.4.7. Análise CO_2 50

4.5. Simulação dos modelos metabólicos 50

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 51

5.1. Desenvolvimento de metodologia para análise de lisina 51

5.2. Cultivos em meios complexos de produção 53

5.3. Formulação de meios quimicamente definidos 55

5.3.1. Definição das fontes de C e N 55

5.3.2. Definição dos meios de inóculo 55
5.3.3. Avaliação da composição dos Meios de produção 56
5.3.4. Cultivo contínuo intermitente em mesa incubadora rotativa 58
5.3.5. Cultivo contínuo intermitente em biorreator 60

5.4. Cultivos contínuos com meio quimicamente definido 62
5.4.1. Cultivo C12 com D=0,005 h^{-1} 62
5.4.2. Cultivo C 13 com D=0,006 h^{-1} 63
5.4.3. Cultivo C14 com D=0,012 h^{-1} 65
5.4.4. Cultivo C15 com D=0,013 h^{-1} 66
5.4.5. Cálculo de velocidades específicas nos cultivos C12 a C15 67
5.4.6. Cultivos C16 e C17: crescimento com Maltose como única fonte de C e com lisina como única fonte de C 70

5.5. Construção do modelo metabólico para *S. clavuligeurs* 72
5.5.1. Considerações gerais 72
5.5.2. Metabolismo do C 72
5.5.3. Metabolismo do N 72
5.5.4. Síntese da biomassa 73
5.5.5. Reações do modelo metabólico 75

5.6. Estudo de fluxos metabólicos 80
5.6.1. Distribuição de fluxos considerando maltose como única fonte de C 80
5.6.2. Distribuição de fluxos no cultivo C14 84
5.6.3 Distribuição de fluxos no cultivo C15 87
5.6.4. Distribuição de fluxos visando aumento da produção de CefC 92
5.6.5. Cultivo C18: glutamato e lisina como fontes de N 93

6. CONCLUSÕES 96

REFERÊNCIAS 97

1. INTRODUÇÃO

Em 1928, Alexander Fleming foi muito perspicaz ao observar uma contaminação em uma cultura bacteriana e não tratá-la como tal, mas sim como uma descoberta. Numa placa originalmente inoculada com *Staphylococcus* um fungo havia crescido e, ao redor desta colônia o cientista observou um halo transparente. De forma muita sábia Fleming procurou saber o que realmente havia acontecido ali, além da contaminação. O fungo tinha produzido uma substância capaz de inibir o crescimento bacteriano, mais tarde denominada penicilina, nome este derivado do fungo que a produzira, o *Pencillium notatum* (atualmente *Penicillium chrysogenum*). Aproximadamente uma década depois, Howard Florey e Ernest Chain demonstraram os efeitos quimioterápicos da penicilina em camundongos e em humanos (NIELSEN, 1995). Mas foi somente com a eclosão da Segunda Guerra Mundial que um grande impulso foi dado, iniciando-se então a produção em larga escala. A penicilina salvou milhares de vidas durante o conflito e uma nova era começou a partir da qual as infecções bacterianas passaram a ser controladas de forma eficaz.

Com o passar dos anos novos antibióticos foram descobertos, a produtividade aumentou e o mercado destes medicamentos agigantou-se, movimentando, atualmente, cifras que excedem os 40 bilhões de dólares ao ano (HOLMES, 2014). Atualmente, os antibióticos mais importantes clinicamente pertencem aos grupos dos β-lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclinas. Embora passados mais de 80 anos da descoberta do primeiro β-lactâmico, esta classe de antibiótico ainda é muito utilizada no tratamento de diversas patogenicidades. A partir da década de 1970, com a descoberta de que bactérias do gênero *Streptomyces* também produziam bioativos, o número de antibióticos conhecidos aumentou bastante. Mais da metade dos antibióticos hoje conhecidos são produzidos por *Streptomyce*s (TORTORA et al., 2010; TIWARI; GUPTA, 2012). A bactéria *Streptomyces clavuligerus* é um exemplo da diversidade produtiva inerente a este gênero, sendo capaz de produzir mais de 20 diferentes metabólitos secundários. Destaque deve ser dado para o Ácido clavulânico (AC), um potente inibidor de β-lactamases, e para Cefamicina C (CefC), um antibiótico com elevada resistência à ação das enzimas β-lactamases. Devido à característica de resistência da CefC, esta é utilizada para a síntese de antibióticos semi-sintéticos de amplo espectro de ação (OMSTEAD et al., 1985). Desta forma existe grande interesse no aprimoramento do bioprocesso de produção de CefC.

Entretanto, a biossíntese de um metabólito secundário na natureza é realizada em pequena escala, atendendo às necessidades do micro-organismo, ao contrário da indústria de

fermentação, na qual se buscam espécies altamente produtivas. Neste sentido, parte-se de linhagens selvagens com a habilidade em sintetizar determinado metabólito de interesse para posteriormente intervir na regulação do metabolismo microbiano, de forma a aumentar os rendimentos do produto. A espécie *Penicillium chrysogenum* é um excelente exemplo de aumento de produtividade obtido ao longo dos anos através de programas de seleção e melhoramento de linhagens: estima-se que as cepas hoje utilizadas sejam em torno de 1000000 de vezes mais produtivas que a linhagem originalmente isolada por Fleming. Em razão disto, a produção de penicilina excede as 60000 toneladas anuais, a um custo médio de U$5,00 por kg (ROKEM, 2007).

A otimização do meio de cultura e das condições de operação do biorreator são formas eficientes de intervenção no metabolismo, limitadas, porém, pela capacidade produtiva do micro-organismo. A produtividade do micro-organismo está diretamente associada ao seu material genético, o qual pode ser modificado através de técnicas de mutagênese clássica ou engenharia genética. Apesar da ampla aceitação e dos muitos casos bem sucedidos, a mutagênese clássica é um processo randômico e, por isso, moroso. A engenharia genética dispõe, por sua vez, de ferramentas para a realização de modificações específicas que, ainda assim, não garantem resultados positivos (STEPHANOPOULOS, 1999). Torna-se necessário, portanto, compreender melhor o metabolismo para que mudanças possam ser realizadas de maneira mais adequada e com maior sucesso, atendendo as demandas do processo biotecnológico (STEPHANOPOULOS e VALINO, 1991). Neste ponto, insere-se a engenharia metabólica, que consiste na combinação de métodos de quantificação de fluxos metabólicos e do seu controle através de técnicas de biologia molecular, para implementar modificações genéticas com o objetivo de aumentar a conversão de substratos a produtos. Através de uma análise criteriosa das vias metabólicas e da montagem de um modelo estequiométrico que descreva o metabolismo microbiano, é possível conhecer a distribuição dos fluxos metabólicos de dado organismo e, assim, identificar os principais pontos de ramificação deste metabolismo, onde mudanças na partição dos fluxos podem conduzir a aumentos de formação do metabólito desejado.

Diante do exposto, justificou-se o interesse em estudar a distribuição de fluxos metabólicos em *S. clavuligerus*, uma vez que o conhecimento gerado por este trabalho pôde prover informações importantes acerca do metabolismo desta espécie e, assim, indicar possibilidades de melhorias no bioprocesso de produção de CefC.

2. OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho consistiu na obtenção da distribuição dos fluxos metabólicos operantes em *S. clavuligerus*, importante produtor de compostos bioativos β - lactâmicos.

Para o cumprimento do objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

(a) estabelecer meios de cultivo adequados à obtenção de dados para serem utilizados nas simulações dos modelos metabólicos;
(b) estabelecer formas de operação dos cultivos que permitam obter dados reprodutíveis, confiáveis e em quantidade suficiente para serem utilizados nas simulações dos modelos metabólicos;
(c) obter dados de consumo de substratos, formação de produtos e subprodutos em cultivos submersos;
(d) construir uma rede metabólica que represente o metabolismo de *S. clavuligerus*;
(e) simular o modelo metabólico proposto, utilizando os dados obtidos nos cultivos;
(f) avaliar os resultados das simulações e as possibilidades de mudanças nas distribuições de fluxos;
(g) identificar possíveis gargalos da biossíntese de CefC e, paralelamente, propor formas de operação dos fluxos que possam conduzir ao aumento da conversão de substratos a produto.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Streptomyces clavuligerus*

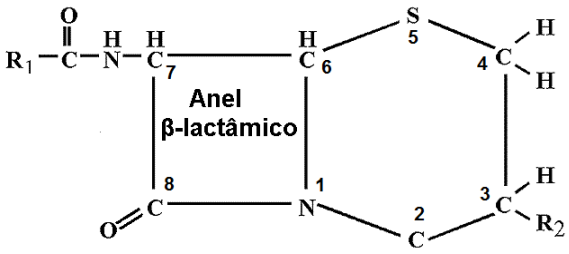
Trata-se de uma bactéria filamentosa gram-positiva pertencente ao grupo dos actinomicetos, depositada nos bancos da ATCC e NRRL sob numerações 27064 e 3585, respectivamente. Seu nome deriva do latim e significa "tendo pequenas clavas"; radical clavul= pequena clava e sufixo igerus=tendo. Foi primeiramente isolada por Higgens e Kastner (1971) a partir de amostras de solo da América do Sul. É um micro-organismo aeróbio estrito, mesófilo (temperatura favorável entre 25 e 35°C) e com crescimento em pH ao redor da neutralidade (6,5 e 8,0). A incapacidade de utilizar glicose, ao mesmo tempo em que metaboliza amido, maltose e glicerol como fontes de carbono (C), é um fato intrigante, que se deve à deficiência no transporte do monossacarídeo (GARCIA-DOMINGUEZ et al., 1989; PÉREZ-REDONDO et al., 2010). Outra característica marcante desta bactéria é a incomum presença do ciclo da uréia em um procarioto (BUSHELL et al., 2006).

S. clavuligerus destaca-se principalmente pela sua capacidade em produzir um grande número de metabólitos secundários, o que o torna um reservatório de bioativos a serem explorados. A tunicamicina, por exemplo, é uma mistura de dez ou mais homólogos de nucleosídeos, que atuam interferindo na formação de glicoproteínas em procariotos e eucariotos (KENIG e READING, 1979). Holomicina, outro composto produzido por esta bactéria, é um antibiótico pertencente à classe das pirrotinas, que possui atividade citotóxica em mamíferos, o que possibilita seu uso como antitumoral (LI e WALSH, 2010). O AC é um potente inibidor de enzimas do tipo β-lactamases, responsáveis pela inativação de compostos β-lactâmicos, sendo o composto de maior sucesso comercial produzido por *S. clavuligerus*, sendo abordado com maiores detalhes mais adiante no item 3.4 (PRUES et al., 1983; PARADKAR et al., 2013). Além de AC, esta bactéria produz ainda várias outras clavamas, algumas inclusive com atividade antifúngica (DE LA FUENTE et al., 2002; BAGGALEY et al., 1997). Por último e não menos importantes, os antibióticos β-lactâmicos penicilina N, deacetilcefalosporina C, deacetoxicefalosporina C e CefC (LIRAS, 1999). Dentre estes antibióticos, com certeza o maior destaque é dado a CefC por sua elevada resistência a β-lactamases (OMSTEAD et al., 1985; BRAKHAGE et al., 2005)

3.2. Antibióticos β-lactâmicos

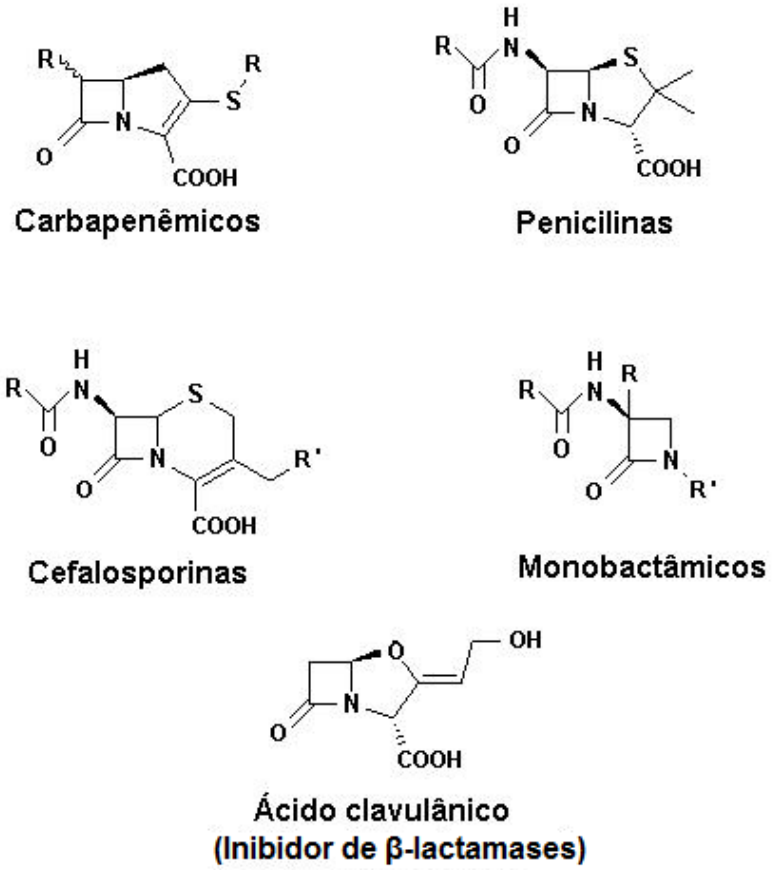
Os antibióticos pertencentes a esta classe possuem em sua estrutura o anel β-lactâmico, uma amida cíclica composta por quatro átomos (Figura 3.1). Este anel é responsável pela atividade do antibiótico, inibindo a enzima transpeptidase que realiza a interligação dos peptideoglicanos da parede celular bacteriana. Com isto ocorre o enfraquecimento da parede levando à lise celular e consequente morte do patógeno (TORTORA et al., 2010). Conforme a estrutura química os antibióticos pertencentes a esta classe são divididos em cinco subclasses, a saber: penicilinas, carbapenêmicos, cefalosporinas, monobactâmicos e os inibidores de β-lactamases (Figura 3.2) (BRAKHAGE, 1998; ELANDER, 2003). Como pode ser observado na Figura 3.2, as cefalosporinas possuem um anel de seis membros conjugado ao anel β-lactâmico, o que dá maior estabilidade ao sistema bicíclico. Este é um fator positivo por atuar oferecendo maior resistência ao ataque de enzimas β-lactamases. Por este motivo, as cefalosporinas são os antibióticos β-lactâmicos mais utilizados na terapêutica atualmente (TORTORA et al., 2010). O sucesso no uso dos β-lactâmicos advém de sua alta especificidade e relativa baixa toxicidade (BRAKHAGE, 1998). As penicilinas e cefalosporinas ainda podem ser classificadas como antibióticos peptídeos não ribossomais, pois tem origem na condensação não ribossomal de três aminoácidos: ácido α-aminoadípico, cisteína e valina. Uma diferença entre procariotos e eucariotos produtores de β-lactâmicos é o fato de o ácido α-aminoadípico ser formado a partir da degradação da lisina nos primeiros ao passo que em eucariotos ele é um intermediário da síntese da lisina (LIRAS, 1999; OMSTEAD et al., 1985).

Figura 3. 1- Estrutura química do anel β-lactâmico



Nesta figura apresenta-se a estrutura típica de uma cefalosporina. Os números dentro do sistema bicíclico indicam a o posicionamento dos átomos na estrutura.

Figura 3. 2 - Subclasses de compostos β-lactâmico



3.3. Cefamicina C

CefC é um antibiótico β-lactâmico produzido por *Nocardia lactamdurans* e *S. clavuligerus*, descoberto pela primeira vez em 1971 por Nagarajan et al. (1971). Seu nome químico é ácido 7-(5-amino-5-carboxivalerilamino)-3-carbamoiloximetil-7-methoxi-3-cefem-4-carboxílico. Em sua forma pura, trata-se de um pó branco, solúvel em água, levemente solúvel em etanol e dimetil sulfóxido (OMSTEAD et al., 1985). Pertence a classe das cefalosporinas, sendo a primeira cefamicina a ser isolada. A característica que diferencia a CefC dos demais compostos de sua classe é a presença de um grupamento metoxi na posição 7- α do sistema bicíclico de anéis. Tal grupamento promove maior estabilidade do anel β-lactâmico, o que aumenta sua resistência ao ataque de β-lactamases (OMSTEAD et al., 1985). CefC é particularmente efetiva contra bactérias gram negativas, mas possui baixa atividade contra gram positivas. Modificações químicas em sua estrutura através de alterações nas cadeias laterais têm sido realizadas visando aumentar o espectro de atividade contra gram positivas. A substituição do radicala α-aminoadipil por um radical tienilacetil originou a Cefoxitina (Figura 2.5), um fármaco com ação contra bactérias gram negativas, gram positivas e anaeróbias (OMSTEAD et al., 1985).

Figura 3. 3 - Estrutura química da cefamicina C

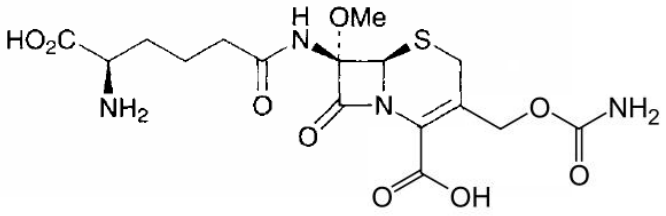
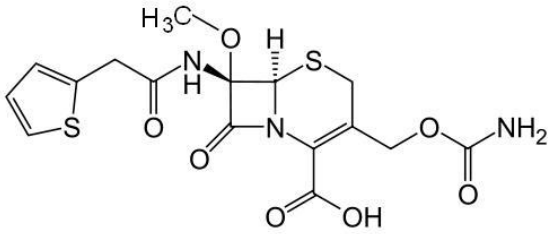


Figura 3. 4 - Estrutura química do antibiótico semi-sintético Cefoxitina

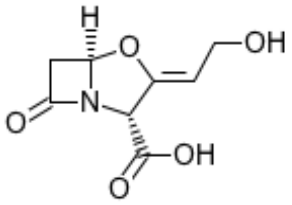


São necessárias 11 reações enzimáticas para a formação de CefC por *S. clavuligerus*. A primeira reação é catalisada pela enzima Lisina-ε-aminotransferase (LAT) que promove desaminação do aminoácido lisina levando à formação de 1-piperideina-6-carboxilato. Este composto, por ação da enzima piperideina-6-carboxilato desidrogenase, é convertido no raro aminoácido ácido L-α-aminoadípico. Neste momento, ocorre a formação de um peptídeo através da condensação não ribossomal dos aminoácidos ácido L-α-aminoadípico, cisteína e valina, dando origem ao tripetídeo δ-(L-α-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV). A enzima isopenicilina N sintase realiza uma ciclização oxidativa do peptídeo levando ao surgimento da Isopenicilina N. Isopencilina N epimerase promove, então, a mudança conformacional da forma L para D da cadeia lateral aminoadipil, aparecendo assim o primeiro antibiótico da rota: a penicilina N. Com a expansão do anel tiazolidínico da penicilina N é formada a deacetoxicefalosporina C, a primeira cefalosporina desta rota biossintética. Este composto é convertido em deacetilcefalosporina C, que por sua vez dá origem a orto-carbamoil-deacetilcefalosporina C. Em antibióticos semi-sintéticos derivados de CefC, o grupamento Carbamoil presente na estrutura é responsável pela estabilidade *in vivo* (OMSTEAD et al., 1985). Finalmente, mais dois passos enzimáticos são responsáveis por promover a metilação da posição 7-α, que confere maior resistência às β-lactamases (MALMBERG et al., 1993; MARTIN, 1998; LIRAS, 1999; ALEXANDER et al., 2000). Tal característica de resistência tem motivado a realização de vários estudos acerca de seu bioprocesso, mesmo passados mais de 40 anos de sua descoberta, demonstrando assim a grande importância deste bioativo. Estes fatos justificaram e motivaram o desenvolvimento deste trabalho.

3.4. Ácido clavulânico

Em 1967, o Beecham Research Laboratories iniciou um programa de triagem em busca de inibidores de β-lactamases de ocorrência natural (OLIVEIRA et al., 2009). Os testes eram realizados por meio de metodologia de bioensaio, tendo *Klebsiella aerogenes* como bactéria teste, em virtude da sua capacidade de produzir β-lactamases. Amostras de caldos de cultivo de diversos micro-organismos eram aplicadas conjuntamente com Benzilpeniclina, até que em dado momento observou-se a inibição do crescimento da bactéria teste (BUTTERWORTH, 1984). Assim, foi descoberto o AC (Figura 3.5), um composto β-lactâmico produzido por *S. clavuligerus*, com baixa atividade antibiótica, mas com alto poder de inibição das enzimas β-lactamases (OLIVEIRA et al., 2009). Diferentemente das penicilinas e cefalosporinas, o anel conjugado ao β-lactâmico não possui enxofre e sim um oxigênio como heteroátomo, tratando-se então de uma oxazolidina (BUTTERWORTH, 1984). Para que exerça efeito terapêutico, o AC deve ser administrado em conjunto com outro antibiótico β-lactâmico, onde o primeiro inibe as β-lactamases e o segundo age contra o patógeno (TORTORA et al., 2010). Clavulin® é um exemplo comercial muito conhecido de associação entre clavulanato de potássio e amoxicilina, sendo farmáco de escolha no tratamento de infecções resistentes. Após muitos anos de sua descoberta, alguns passos enzimáticos de sua biossíntese ainda não foram completamente elucidados. A Figura 3.6 (B) apresenta o esquema reacional mais aceito nos dias atuais, onde a síntese deste composto envolve oito reações catalisadas enzimaticamente.

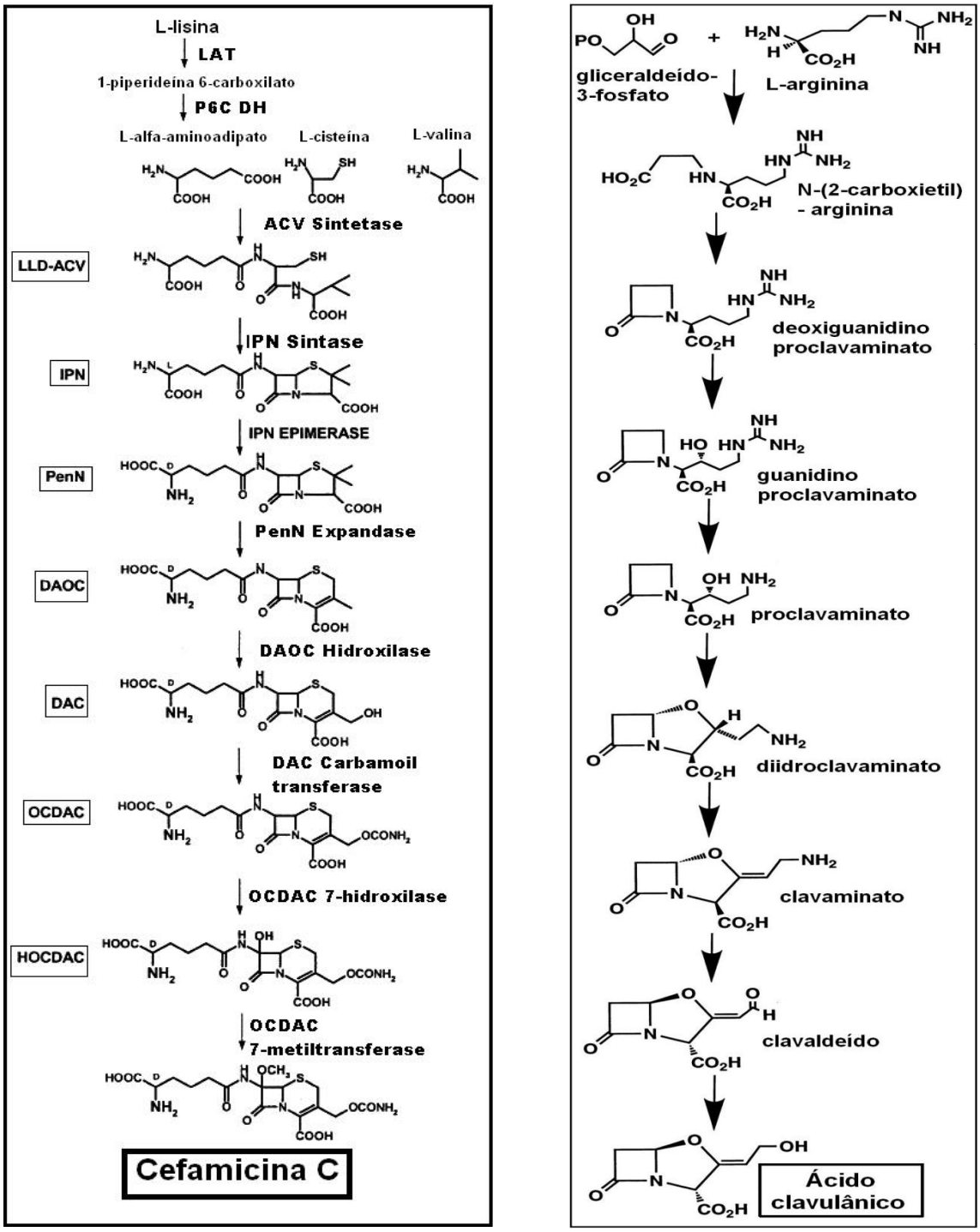
Figura 3. 5 - Estrutura química do Ácido Clavulânico



3.5. Biossíntese de CefC e AC por *S. clavuligerus*

Como pode ser observado na Figura 3.6, as rotas bossintéticas dos dois principais compostos produzidos por *S. clavuligerus* são totalmente independentes. Todavia, a produção destes bioativos na linhagem selvagem ocorre de forma concomitante. Romero et al. (1984) conseguiram dissociar a produção de CefC da de AC em quimiostatos limitados pelo nitrogênio (N) e suplementados com 25 mM de fosfato. Entretanto os níveis de produção de CefC foram muito baixos, atingindo valores em torno de 6,5 $mg.g^{-1}$ de célula. Em quimiostato

Figura 3. 6 - Rotas biossintéticas em *S. clavuligerus* de (A) CefC e (B) AC.



(A) **(B)**

(PenN – penicilina N, DAOC – deacetoxicefalosporina C, DAC – deacetilcefalosporina C, OCDAC – orto-carbamoil-deacetilcefalosporina C, HOCDAC – 7-hidroxi-carbamoil-deacetilcefalosporina C)

Fonte: Liras (1999)

limitado por fosfato e na ausência de sulfato, estes mesmos autores obtiveram a condição inversa, ou seja, produção de AC sem observar a produção de CefC. Bignell et al. (2005) mostraram que o elemento multifuncional ccaR ("cephamycin and clavulanic acid Regulator"), codificado pelo gene *ccaR*, é responsável pela regulação da síntese tanto de CefC quanto de AC. Liras e Martín (2005) verificaram que mutantes não produtores de CefC por vezes também não produzem AC. A regulação da síntese de CefC e AC é um fenômeno muito complexo, influenciada pelas condições de cultivo. A presença e a concentração dos nutrientes no meio de cultivo pode favorecer a produção de um ou outro composto, todavia a produções de altos níveis de um destes bioativos em detrimento do outro, pela linhagem selvagem, é muito difícil. Na Figura 3.6 é possível observar que se tratam de duas moléculas com alto grau de complexidade de síntese, o que acarreta em rotas enzimáticas longas. Tais rotas consomem muitos precursores e cofatores, justificando, portanto, toda a regulação metabólica a que estão sujeitas.

3.6. Estudo de fluxos metabólicos

A otimização das condições de cultivo, screening para obtenção de linhagens melhores produtores, mutagênese clássica e engenharia genética são recursos amplamente utilizadas na indústria de bioprocesso em busca do aumento da produtividade. Entretanto estas estratégias muitas vezes não são bem sucedidas porque as rotas metabólicas têm evoluído de forma a exibir estruturas complexas de controle que resistem ao redirecionamento dos fluxos metabólicos (STEPHANOPOULOS e VALINO, 1991). Estes mecanismos de controle mantêm a síntese de metabólitos precursores, energia (ATP) e força redutora (NADH, NADPH), os quais, sintetizados em razões estequiométricas, são necessários ao crescimento balanceado e à manutenção celular (STEPHANOPOULOS e VALINO, 1991). Por outro lado, altos rendimentos de produto requerem alterações radicais na distribuição de fluxos do metabolismo primário, desviando-os no sentido da produção do composto de interesse, em detrimento das condições ótimas ao crescimento celular. Desta forma, um importante aspecto a ser considerado na produção de metabólitos secundários, é a competição entre metabolismo primário e secundário por cofatores, precursores do produto e energia (STEPHANOPOULOS, 1999; VAN GULIK et al., 2000).

O estudo da distribuição dos fluxos metabólicos coloca-se como uma ferramenta poderosa, podendo auxiliar na identificação de gargalos metabólicos que estariam impedindo o aumento da conversão de substratos em produtos de interesse (STEPHANOPOULOS,

1998). Aliando-se balanço de massa ao conhecimento da estequiometria reacional é possível montar um modelo que descreva o metabolismo e, através do uso de álgebra linear, encontrar a distribuição de fluxos metabólicos. A realização da análise de fluxos metabólicos requer conhecimento bioquímico do micro-organismo em estudo para que um modelo contendo as principais reações metabólicas seja montado. Exige-se, também, conhecimento matemático para simular e elucidar os fluxos metabólicos operantes. Alguns conceitos e equações que possibilitam a realização da análise de fluxos metabólicos são apresentados a seguir.

Com base na lei de conservação de massa, o conjunto de transformações em uma determinada rede metabólica pode ser expresso pela seguinte equação

$$\frac{dx}{dt} = N \bullet v(x)$$

Equação 3. 1

onde x é a concentração dos metabólitos intracelulares, N é uma matriz estequiométrica representando as reações que descrevem o metabolismo e v(x) é o vetor das velocidades das reações (PFEIFFER et al., 1999).

Para o estudo dos fluxos metabólicos assume-se o estado pseudo estacionário para os metabólitos intracelulares, no qual o acúmulo destes metabólitos é igual à zero (VARMA and PALSSON, 1994; PFEIFFER et al., 1999).

Com base nesta consideração, a Equação 3.1 torna-se

$$N \bullet v(x) = 0$$

Equação 3. 2

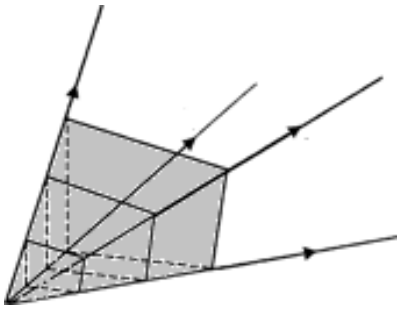
O conjunto completo de vetores v(x) que satisfaz a Equação 3.2 define a região denominada espaço nulo de N, no qual se encontram as soluções ou modos de operação do metabolismo em questão. O espaço nulo prediz as capacidades da rede metabólica em questão, ou seja, determina o que a rede metabólica é ou não é capaz de realizar. O conjunto v(x) pode ainda ser decomposto em dois subconjuntos v_{rev} (para reações reversíveis) e v_{irrev} (para reações ireversíveis), obtendo-se a seguinte restrição

$$V_{irrev} \geq 0$$

Equação 3. 3

Devido à restrição representada pela Equação 3.3, o problema matemático passa a ter solução na análise convexa, através da qual a região que compreende os vetores que satisfazem as Equações 3.2 e 3.3 é representada por um cone poliédrico F (Figura 3.7) (PFEIFFER et al., 1999).

Figura 3. 7 - Cone poliédrico F representando graficamente o espaço solução para as Equações 3.2 e 3.3



Adaptado de SCHILLING et al. (1999)

Para um modelo metabólico, o número dos graus de liberdade é calculado subtraindo-se o número de metabólitos intracelulares do número de reações (PEDERSEN et al., 1999). Se o número de fluxos medidos é maior que o número de graus de liberdade tem-se um sistema sobredeterminado e, caso seja igual, o sistema é dito determinado. Mas se o número de fluxos conhecidos for menor que os graus de liberdade trata-se, então, de um sistema indeterminado. No caso de sistemas sobredeterminados e determinados é possível chegar a uma solução única, ao passo que em sistemas indeterminados o número de soluções é infinito. Dependendo dos objetivos das análises a determinação dos fluxos metabólicos pode ser agrupada em três categorias: Análise de Fluxos Metabólicos (AFM), Análise de Equilíbrio de Fluxos (AEF) e Análise das Vias Metabólicas (AVM). A AFM é aplicada a sistemas sobredeterminados, atentando-se ao fato de que se obtém uma solução para cada condição particular de crescimento (TRINH et al., 2009). Para resolver sistemas indeterminados, uma função objetivo deve ser estabelecida, sujeita a algumas restrições, tais como velocidades de consumo de substratos e de formação de produtos, restrições termodinâmicas, entre outras. Neste caso, utiliza-se a AEF, pela qual se obtém uma distribuição de fluxos assumindo que o sistema biológico está operando de forma a otimizar ou minimizar determinada função celular (função objetivo), como o crescimento ou energia de manutenção por exemplo (LEE et al., 2006; TRINH et al., 2009). Deve-se tomar muito cuidado na escolha da função objetivo para que esta seja condizente com a condição de crescimento desejada do organismo em estudo. Esta metodologia também possibilita estudar estados do metabolismo onde se obtém máxima secreção de produtos de interesse (TRINH et al., 2009). A AVM, por sua vez, permite identificar todos os vetores de fluxos metabólicos sem fixar valores de velocidades de fluxos ou impor funções objetivo. Todavia, neste caso, o número de soluções admissíveis é infinito fazendo-se necessário a adoção de duas restrições adicionais, a não decomposibilidade e a

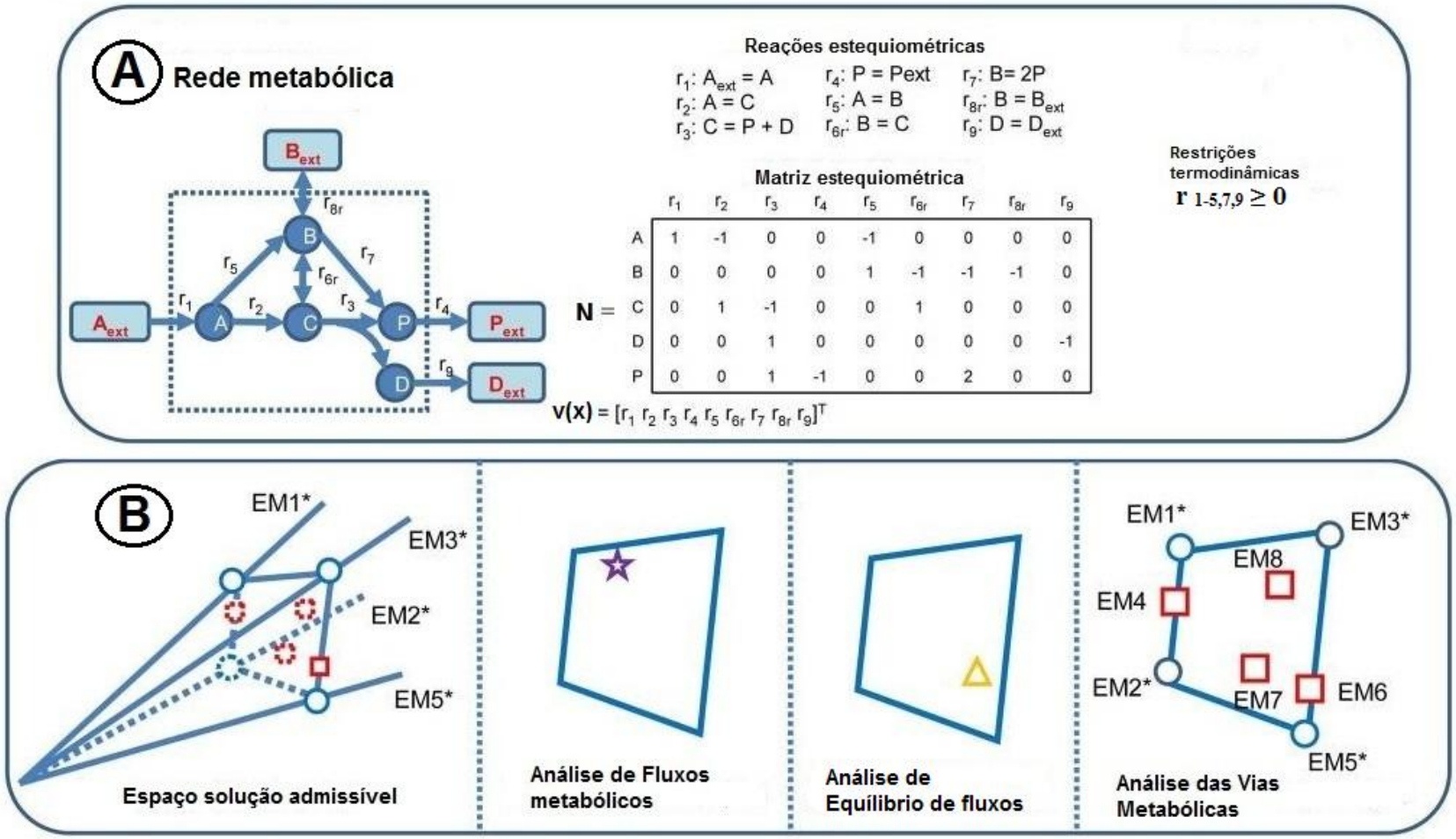
independência sistemática, para seja possível a obtenção de um número finito de soluções. A aplicação destas duas restrições resulta na análise de modos elementares (AME) que permite calcular um conjunto finito de soluções admissíveis para o sistema em estudo, possibilitando a avaliação das capacidades metabólicas da rede sob análise (SCHUSTER et al., 1999; TERZER e STELLING, 2007; TRINH et al., 2009).

A realização da AFM, por exigir sistemas determinados, normalmente acarreta em coleta extensiva de dados experimentais (TRINH et al., 2009). Neste sentido, a AFM pode ser auxiliada por meio da utilização de substratos marcados radioativamente. Esta técnica consiste em alimentar o micro-organismo com substratos marcados, tais como, a glicose com ^{13}C (WIECHERT, 2001). O átomo radioativo distribui-se, então, pelo sistema biológico, podendo ser detectado através de técnicas de ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massas (WIECHERT, 2001). Tais dados devem ser processados, com uso de programas computacionais desenvolvidos para este fim, para que forneçam informações acerca dos fluxos intracelulares (WIECHERT, 2001). Trata-se de uma ferramenta poderosa, porém limitada pelo alto custo de aquisição de tais substratos (1 g D-Glucose-1-^{13}C custa aproximadamente US$ 800,00). Portanto a realização de experimentos com tais substratos deve ser muito bem delineada de forma a minimizar a ocorrência de erros e, assim, maximizar as informações obtidas.

Com base no que foi exposto, torna-se necessário adequar a metodologia do estudo da distribuição de fluxos ao sistema a ser estudado. Com AME é possível avaliar sistemas indeterminados e explorar as capacidades do metabolismo, entretanto o elevado número de respostas geradas pode dificultar a interpretação dos dados. A AFM, por outro lado, gera uma única resposta, mas exige sistemas determinados e reflete apenas uma condição fisiológica. Quando sistemas indeterminados necessitam ser avaliados, atualmente um caso comum em virtude da massificação da informação gerada pelas ciências ômicas, AEF pode ser uma excelente opção, lembrando-se, porém, que ela reflete apenas uma condição ótima de funcionamento de determinada função celular.

A Figura 3.8 apresenta uma rede metabólica simplificada, a matriz que representa esta rede e um esquema explicando as principais diferenças ente AFM, AEF e AVM.

Figura 3. 8 - Representação esquemática das principais metodologias para estudo de fluxos, aplicadas a uma rede metabólica simples.



Painel A: apresenta uma rede metabólica simplificada composta por 9 reações, das quais 4 são ireversíveis (r 1-5,7,9); e uma matriz estequiométrica N, onde linhas representam os metabólitos (i) e as colunas as reações (j); cada elemento n_{ij} da matriz representa o coeficiente estequiométrico de uma metabólito i envolvido na reação j. Painel B: Interpretação geométrica mostrando o espaço solução admissível e a localização das respostas geradas por AFM (solução para determinado estado metabólico), AEF (solução ótima) e AVM (todas as soluções possíveis) dentro deste mesmo espaço. (Adaptado de Trinh et al., 2009).

3.7. Softwares para simulação de fluxos metabólicos

A resolução dos fluxos operantes em um dado sistema pode ser realizada com o auxílio de programas computacionais específicos, muitos deles de acesso livre. Nos últimos anos, vários softwares têm sido desenvolvidos para tal finalidade, dentre os quais podem ser citados FluxAnalyzer (KLAMT et al., 2003), MetaFluxNet (LEE et al., 2003) CellNetAnalyzer (KLAMT et al., 2007), COBRA toolbox (BECKER et al., 2007), Systems Biology Research (WRIGHT and WAGNER, 2008), Metatool (PFEIFFER et al., 1999), Optflux (ROCHA et al., 2010). COBRA e CellNetAnalyzer permitem a realização de AEF e simulação com mutantes. Systems Biology Research consiste de um software aberto implementado em linguagem Java e que permite a realização de diversas tarefas. Entretanto, COBRA e Systems Biology Research não possuem interfaces amigáveis de uso e CellNetAnalyzer depende de software comercial. O programa Metatool foi desenvolvido com base no conceito de modos elementares de fluxos (PFEIFFER et al., 1999) ,e portanto, permite realizar AME, sendo muito útil para explorar as capacidades metabólicas da rede em estudo. Todavia, não permite a realização de outras tarefas. Rocha et al. (2010) desenvolveram o programa Optflux, que destaca-se principalmente pela interface amigável e facilidade de uso, possibilitando que usuários com pouco domínio na área da informática o utilizem sem maiores problemas. Trata-se de um software de acesso livre implementado em linguagem JAVA e modular, o que permite que outros cientistas insiram características específicas através de *plug-ins*. Dispõe de recursos para cálculo dos Modos elementares de fluxos, realização de AFM e AEF, e ferramentas para otimização de linhagens *in silico*, o que o torna muito versátil. Por estas razões este programa foi escolhido para o desenvolvido deste trabalho.

3.8. Análise de fluxos metabólicos em *S. clavuligerus*

As linhagens selvagens produtoras de antibióticos têm sido alvo de programas de melhoramento através de processos randômicos de mutagênese clássica. Todavia, como já mencionado, esta abordagem exige grandes esforços para obtenção de uma linhagem superior em termos produtivos (THYKAER e NIELSEN, 2003). Por outro lado, avanços no campo da biologia molecular somados a métodos analíticos de quantificação de fluxos têm possibilitado a introdução de modificações direcionadas. No caso de *S. clavuligerus*, grande parte dos genes envolvidos na rota biossintética já foram descobertos (LIRAS, 1999), mas estudos no

campo de fluxos metabólicos com vistas à produção de CefC não existem. O aprofundamento nos mecanismos de controle metabólico deste micro-organismo possibilitaria a introdução de modificações com êxito.

Malmberg e Hu (1991) desenvolveram um modelo cinético da biossíntese de cefalosporinas por *S. clavuligerus* e indicaram a condensação não ribossomal do tripeptídeo ACV como a etapa limitante da rota biossintética. Posteriormente, estes pesquisadores ampliaram estes estudos com estratégias de manipulação genética, construindo um mutante com uma cópia adicional do gene que codifica LAT (Malmberg et al., 1995). Comparando os cultivos da linhagem selvagem e do mutante, os autores constataram que LAT e ACV sintetase controlam a síntese de antibiótico nos estágios iniciais de cultivo, mas o acúmulo de produtos das atividades destas enzimas, observado após a fase exponencial de crescimento, indicou a existência de limitações em outros pontos do metabolismo. Khetan et al. (1999) determinaram K_m aparente de LAT para lisina e α-cetoglutarato in vitro e mediram a concentração intracelular destes compostos, constatando que esta concentração manteve-se em torno de 1/10 dos valores de K_m, para ambos os substratos. Desta forma, os autores concluíram que os fluxos das duas substâncias estão direcionados principalmente para o metabolismo primário, e que atuam conjuntamente na regulação da biossíntese de cefalosporinas.

Os relevantes trabalhos mencionados apresentaram informações importantes com relação ao estudo do controle da biossíntese de CefC, todavia não contemplaram a integração entre os metabolismos primário e secundário de uma forma global. Sendo assim, o presente trabalho propõe analisar o metabolismo de *S. clavuligerus* sob uma abordagem holística, estudando o metabolismo para identificar fluxos que possam influir, positiva ou negativamente, na produção do antibiótico. Bushell et al. (2006) realizaram estudos de fluxos metabólicos em *S. clavuligerus* para analisar a biossíntese de AC. Os pesquisadores propuseram um esquema para os principais fluxos de C e identificaram os aminoácidos que influenciam positivamente na produção, quando adicionados ao meio de cultura. Ainda no campo da produção de β-lactâmicos, van Gulik et al. (2000) utilizaram AFM para avaliar a produção de penicilina G por *Penicillium chrysogenum* e concluíram que a produção do antibiótico é afetada pela baixa disponibilidade de NADPH. Li et al. (2010) também concluíram que *Acremonium chrysogenum* utiliza NADPH e ATP de forma pouco eficiente para a produção de Cefalosporina C (CepC) durante batelada alimentada com óleo de soja.

3.9 Considerações finais

Como foi visto não há trabalhos disponíveis na literatura nos quais se estudou a distribuição de fluxos em *S. clavuligerus* com foco na biossíntese de CefC . Ainda, como descrito anteriormente, *S. clavuligerus* produz dois compostos importantes em quantidades significativamente maiores que as demais sintetizadas por este micro-organismo: CefC e AC (Figura 3.6). Estes compostos são sintetizados através de rotas biossintéticas totalmente independentes, porém são produzidos concomitantemente no meio de cultura e a dissociação da produção de ambos não é possível. Por isto, apesar do principal foco do presente trabalho ser o estudo da dinâmica de produção de CefC, pretende-se também considerar o fluxo de metabólitos e de energia direcionado à síntese de AC. Desta forma, este trabalho veio preencher a lacuna existente, somando conhecimento na área de fluxos metabólicos direcionados a produção de CefC por *S. clavuligerus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Equipamentos

Lista dos principais equipamentos utilizados para o desenvolvimento do trabalho:

- Mesas rotativas incubadoras (New Brunswick Scientific), para os experimentos em frascos agitados, providas de controle de agitação e de temperatura.
- Biorreator tipo tanque agitado e aerado em escala de bancada, provido de controle de pH, temperatura e controle de agitação, volume útil de 5 litros (New Brunswick Scientific).
- Bomba peristáltica programável (Ismatec MCP)
- Bomba peristáltica (Masterflex)
- Espectrofotômetro (UV e luz visível - Pharmacia)
- Câmara de fluxo laminar (Trox®)
- Balanças Shimadzu AUYZZO,
- Estufas (Fanem e Nova Ética)
- pHmetros (Micronal B474)
- Autoclaves Phoenix (AN75 e AV225)
- Centrífuga refrigerada (Eppendorf 5810R)
- Banhos termostatizados (Solab SL150/A e FANEM 100).
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu) com detectores UV-Vis e índice de refração
- Analisador de gases Quantek modelo 902P
- Microcomputadores para o tratamento dos dados experimentais

4.2. Micro-organismo produtor e forma de estocagem

Para o processo de produção de CefC foi utilizada a linhagem selvagem de *S. clavuligerus* ATCC 27064, adquirida da própria ATCC na forma de células vegetativas (micélios) liofilizadas. Esporos de *S. clavuligerus* foram obtidos em meio sólido proposto por Sánchez e Braña (1996), exposto na Tabela 4.1. O micro-organismo foi cultivado no meio sólido por 10 a 15 dias, em estufa incubadora com temperatura controlada em 28 ± 1 ºC. Após este período, os esporos foram recolhidos em solução crioprotetora (20% v/v glicerol) e armazenados em *ultrafreezer* a −80ºC. Para armazenamento do micro-organismo por períodos prolongados adotou-se o processo de liofilização. Para isto, inicialmente os esporos foram germinados em meio descrito na Tabela 4.2 por um período de 24 horas. Após este período, o micro-organismo foi transferido para o meio descrito na Tabela 4.3 por mais um período de

24 horas com a finalidade de obter massa micelial suficiente para o processo de liofilização. O micélio foi então recolhido, centrifugado, lavado e liofilizado.

Tabela 4. 1 - Composição de meio sólido para obtenção de esporos de *S. clavuligerus*

Componentes	**Concentração (g/L)**
Glicose	5,0
Caseína hidrolisada ácida	1,0
Extrato de levedura	0,5
Extrato de carne	0,5
MOPS	21
Agar	20
pH	7,0

Tabela 4. 2 - Composição do meio de germinação

Componentes	**Concentração (g/L)**
Triptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	10,0
MOPS	21,0
pH	6,8

Tabela 4. 3 - Meio para propagação de micélios

Componentes	**Concentração (g/L)**
Glicerol	5,0
Extrato de malte	3,0
Peptona bacteriológica	10,0
$MgSO_4.7H_2O$	0,75
K_2HPO_4	2,5
MOPS	21,0
Solução de sais[(a)]	1 mL
pH	7,0

(a) solução de sais (g/L): $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,0), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0)

4.3. Condições gerais dos cultivos

Foram realizados 18 cultivos, denominados de C1 a C18, em regime de batelada (duração de 72 horas), cultivo contínuo intermitente (duração de 120 a 144 horas) e cultivo contínuo (120 horas).

Nos cultivos em mesa incubadora rotativa, os frascos foram agitados com temperatura controlada em 28 ºC e freqüência de rotação de 260 rpm. As fermentações foram desenvolvidos 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_2. As amostragens foram realizada a cada 24 horas, retirando-se um volume de 6 mL de amostra

Em biorreator, a temperatura foi mantida em 28°C, o pH em 6,8 e o O_2 dissolvido em 50% com relação à saturação por meio da variação automática da velocidade de agitação.O volume de trabalho em biorreator foi de 1500 mL, e volume de amostragem foi de 10 mL.

4.3.1. Esquema de trabalho e meios utilizados

Primeiramente, o micro-organismo foi posto em um meio de germinação, conforme composição descrita na Tabela 4.2, por um período de 22 horas. Após a etapa de reativação, a bactéria passa para o meio de preparo de inóculo (composição base -Tabela 4.4), por mais um período de 22 horas. A fonte de C nesta etapa foi escolhida entre amido (utilizado em meios complexos) e maltose (utilizado em meios quimicamente definidos), e a de N entre extrato de semente de algodão (fonte complexa) e lisina mais glutamato de sódio (fonte quimicamente definida) (Resumo na Tabela 4.5). Uma alíquota do meio de preparo de inóculo correspondente a 10% do volume do meio de fermentação principal (Composição base - Tabela 4.6) foi utilizada para iniciar a etapa de produção. A(s) fonte(s) de C para produção variou(aram) entre amido e glicerol (em meios complexos) e maltose (em meios quimicamente definidos) conforme o objetivo do experimento, e a de N entre farinha de semente de algodão e lisina para o meio complexo e lisina, glutamato ou NH_4Cl para o meio quimicamente definido. Estabeleceu-se para a fonte de C a concentração inicial de 10 $g.L^{-1}$ baseando-se em experimentos anteriormente realizados em nossos laboratórios (ANTONIO et al., 2012; LEITE et al.,2013). Para as fontes de N as concentrações variaram conforme objetivo do experimento. A tabela 4.7 apresenta um resumo das fontes de C e N adicionadas no início do processo para cada um dos cultivos realizados neste trabalho.

Demais informações acerca destes cultivos, tais como tipos de meios, equipamentos utilizados, forma de operação, taxa de diluição e período de alimentação estão apresentadas nas Tabelas 4.8 e 4.9. O esquema da metodologia utilizada é apresentado na Figura 4.1.

Figura 4. 1- Etapas de cultivo de *S. clavuligerus* em frascos agitados

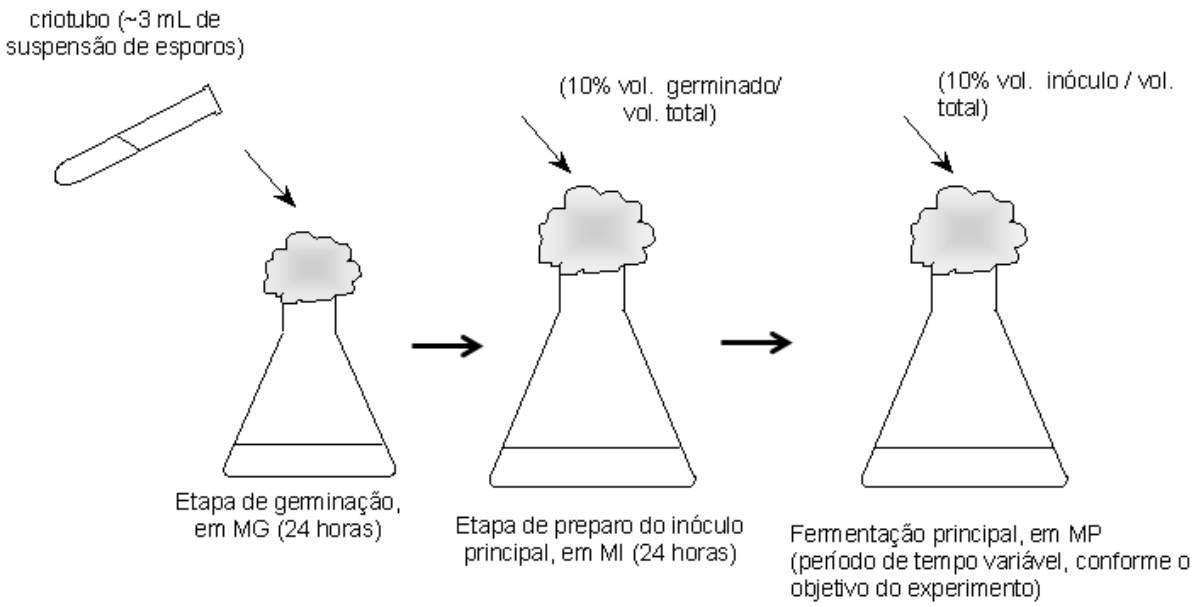


Tabela 4. 4 – Meio base de preparo de inóculo

Componentes	**Concentração (g/L)**
Extrato de Levedura	1,0
K_2HPO_4	0,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,75
MOPS	21,0
Solução de sais[(a)]	10,0 mL
Solução de elemantos-traço[(b)]	1,0 mL
pH	6,8

(a) solução de sais (g/L): $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,0), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0)

(b) solução de elementos traço (g/L): $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,49), $CoCl_2$ (0,28), Na_2MoO_4(0,15) – SOMENTE UTILIZADO EM MEIOS QUIMICAMENTE DEFINIDOS

Tabela 4. 5 - Fontes de C e N utilizadas para os meios de preparo de inóculo

	Componentes	**Concentração (g/L)**
Meio de inóculo complexo	Amido	10,0
	Proflo ™ **(a)**	8,5
Meio de inóculo quimicamente definido	Maltose	10,0
	Lisina	4,0 (21,8 mM)
	Glutamato	5,5

(a) Extrato de semente de algodão, gentilmente cedida pela empresa Traders Protein (Lubbock, Texas, EUA) - SOMENTE UTILIZADO EM MEIOS COMPLEXOS

Tabela 4. 6 - Meio base de produção

Componentes	**Concentração (g/L)**
Tiossulfato de sódio**(a)**	1,0
K_2HPO_4	1,75
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,75
$CaCl_2$	0,2
NaCl	2,0
MOPS	21,0
Solução de sais**(b)**	5,0 mL
Solução de elemantos-traço**(c)**	2,0 mL
pH	6,8

(a) adição após 30 horas de processo

(b) solução de sais (g/L): $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,0), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0)

(c) solução de elementos traço (g/L): $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,49), $CoCl_2$ (0,28), Na_2MoO_4(0,15) – SOMENTE UTILIZADO EM MEIOS QUIMICAMENTE DEFINIDOS

Tabela 4. 7 - Fontes de C e N utilizadas para os meios de produção

	Fonte de C (em g.L^{-1})		**Fonte de N (em g.L^{-1})**			
Cultivo	**Amido**	**Maltose**	**Proflo^{TM} (a)**	**Lisina**	**NH_4Cl**	**Glutamato**
C1	10	-	8,5	18,3	-	-
C2	10	-	8,5	18,3	-	-
C3	10	-	8,5	18,3	-	-
C4	10	-	8,5	5,5	-	-
C5	10	-	8,5	5,5	-	-
C6	10	-	8,5	18,3	-	-
C7	-	10	-	18,3	-	-
C8	-	10	-	18,3	-	-
C9	-	10	-	9,1	-	-
C10	-	10	-	9,1	-	-
C11	-	10	-	9,1	-	-
C12	-	10	-	7,2	-	-
C13	-	10	-	7,2	-	-
C14	-	10	-	7,2	-	-
C15	-	10	-	7,2	-	-
C16	-	10	-	-	6	-
C17$^{(b)}$	-	-	-	12	-	-
C18$^{(c)}$	-	10	-	9,2	-	9,4

(a) Extrato de semente de algodão, gentilmente cedida pela empresa Traders Protein (Lubbock, Texas, EUA) - SOMENTE UTILIZADO EM MEIOS COMPLEXOS

(b) Este experimento teve por objetivo verificar o crescimento de *S. clavuligerus* em lisina como única fonte de C e N

(c) Este meio foi delineado após resultados de análise de fluxos, visando aumento da produção de CefC

Tabela 4. 8 - Tipos de meio utilizados no preparo do inóculo e na fase de produção para os cultivos C1 a C18.

Cultivo	Meio de inóculo	Meio de produção
C1	Complexo	Complexo
C2,C3,C4,C5	Complexo	Complexo
C6	Complexo	Complexo
C7	Complexo	Q. D.*
C8	Q. D.*	Q. D.*
C9	Q. D.*	Q. D.*
C10	Q. D.*	Q. D.*
C11	Q. D.*	Q. D.*
C12	Q. D.*	Q. D.*
C13	Q. D.*	Q. D.*
C14	Q. D.*	Q. D.*
C15	Q. D.*	Q. D.*
C16	Q. D.*	Q. D.*
C17	Q. D.*	Q. D.*
C18	Q. D.*	Q. D.*

* – Meio quimicamente definido

Tabela 4. 9 - Equipamento utilizado, forma de operação, taxa de diluição e período de alimentação, para os cultivos C1 a C18

Cultivo	Equipamento	Operação	D (h^{-1})	Início da alimentação (h)	Fim da alimentação (h)
C1	Mesa I.R.*	Batelada	-	-	-
C2,C3,C4,C5	Mesa I.R.*	Intermitente	0,005	36	120
C6	Mesa I.R.*	Batelada	-	-	-
C7	Mesa I.R.*	Batelada	-	-	-
C8	Mesa I.R.*	Batelada	-	-	-
C9	Mesa I.R.*	Intermitente	0,005	48	96
C10	Mesa I.R.*	Intermitente	0,005	48	120
C11	Biorreator	Intermitente	0,005	36	96
C12	Biorreator	Contínuo	0,005	42	96
C13	Biorreator	Contínuo	0,006	38	96
C14	Biorreator	Contínuo	0,012	42	120
C15	Biorreator	Contínuo	0,013	44	120
C16	Mesa I.R.*	Batelada	-	-	-
C17	Mesa I.R.*	Batelada	-	-	-
C18	Biorreator	Batelada	-	-	-

* - Mesa incubadora rotativa

4.3.2. Alimentação dos cultivos

Nos cultivos contínuos iniciava-se a alimentação no período entre 36 a 48 horas, conforme resultados de análise de açúcares. Nos cultivos contínuos intermitentes em frascos agitados, o processo de retirada/alimentação de meio era realizado a cada 24 horas, ou seja, a cada intervalo estabelecido retirava-se uma alíquota de meio fermentado e adicionava-se meio fresco. Nos cultivos intermitentes em biorreator o intervalo entre cada alimentação foi reduzido para 12 horas. A taxa de diluição destes cultivos foi de D = 0,005 h^{-1}. Os cultivos contínuos foram realizados apenas em biorreator e as taxas de diluição testadas para tais cultivos foram de 0,005; 0,006, 0,0012 e 0,013 h^{-1}. Ainda, as composições dos meios de alimentação para os cultivos realizados encontram-se descritas nas Tabelas 4.10, 4.11 e 4.12.

Tabela 4. 10 – Composição do meio de alimentação para os cultivos C2, C3, C4 e C5

Componente	**Cultivo**			
	C2	**C3**	**C4**	**C5**
Amido ($g.L^{-1}$)	37,2	-	37,2	-
Glicerol ($g.L^{-1}$)	-	41,3	-	41,3
Lisina ($g.L^{-1}$/mM)	-	-	13,7/ 75	13,7/ 75
MOPS	21,0	21,0	21,0	21,0
Solução de sais[(a)] (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0
pH			6,8	

(a) solução de sais (g/L): $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,0), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0)

Tabela 4. 11 – Composição do meio de alimentação para os cultivos C9 a C14

Componentes	**Concentração (g/L)**
Maltose	37,2 (±1,4)
Lisina	8,7(±0,6) (48mM)
MOPS	21
Solução de sais[(a)]	5,0 mL
Solução de elementos-traço[(b)]	2,0 mL
pH	6,8

(a) solução de sais (g/L): $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,0), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0)

(b) solução de elementos traço (g/L): $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,49), $CoCl_2$ (0,28), Na_2MoO_4(0,15)

Tabela 4. 12 – Composição do meio de alimentação para o cultivo C15

Componentes	**Concentração (g/L)**
Maltose	37,2 (±1,4)
Lisina	8,7(±0,6) (48mM)
K_2HPO_4	1,75
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,75
$CaCl_2$	0,2
NaCl	2,0
MOPS	21,0
Solução de sais[(a)]	5,0 mL
Solução de elementos-traço[(b)]	2,0 mL
pH	6,8

(a) solução de sais (g/L): $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (1,0), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0)

(b) solução de elementos traço (g/L): $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,49), $CoCl_2$ (0,28), Na_2MoO_4(0,15)

4.4. Métodos analíticos

4.4.1. Coleta de amostras, armazenagem do sobrenadante e determinação de biomassa

Após a coleta de amostra, o caldo fermentativo foi centrifugado por 10 minutos, 15500 g a 4°C. O sobrenadante foi armazenado em *ultrafreezer* (–80°C) para as análises de consumo das fontes de C e N, quantificação de CepC totais, AC e proteínas totais excretadas. O precipitado contendo a massa celular foi lavado duas vezes com água destilada para a remoção de impurezas, sendo o *pellet* resultante seco em estufa a 105°C, por 24 horas, em recipiente previamente pesado. Após 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 termos de massa seca por volume de meio de cultura ($g \cdot L^{-1}$).

4.4.2. Quantificação de Cefalosporinas totais

A metodologia de quantificação de antibióticos foi baseada em Liras e Martin (2005). Em virtude da indisponibilidade do padrão de CefC, a dosagem deste composto foi realizada por meio de bioensaio utilizando como padrão CepC, devido à semelhança de halos de inibição produzidos por estes dois bioativos. Assim, o antibiótico produzido foi quantificado de forma indireta e expresso em termos de concentração de Cefalosporinas totais (CepC totais, em mg/L).

Utilizou-se a bactéria teste *E. coli* ESS 2235, cultivada em Meio Agar Nutriente, descrito na Tabela 4.13. Primeiramente, foi preparada uma suspensão desta bactéria, em solução salina 0,9 massa/volume, com absorbância igual a 1,000 em leitura a 600 nm. A cada 100 mL de agar nutriente era adicionado 1 mL desta suspensão e, então, o meio era vertido em placas de Petri. Após a solidificação do agar, poços com 5 mm de diâmetro eram perfurados para que padrões e amostras fossem depositados nestes orifícios. Com a adição de soluções com oito diferentes concentrações de CepC foi possível construir curvas de calibração que correlacionavam o diâmetro do halo de inibição com o log da concentração de antibióticos (Figura 4.2). Cada concentração foi aplicada em 16 poços, gerando 16 medidas de halos para cada concentração, possibilitando o cálculo do desvio padrão apresentado no gráfico. Ainda, para eliminar penicilina N que possivelmente existisse na amostra e pudesse interferir nos resultados de bioensaio utilizou-se a enzima BD Difco ™ Penase®, adicionada a uma proporção de 20 μL de enzima por mL de amostra, reagindo-se por um período de 20 minutos. A solução enzimática foi adicionada à amostra de meio já diluída para que fosse minimizado o efeito de inibição de AC sobre a enzima. As características da enzima BD

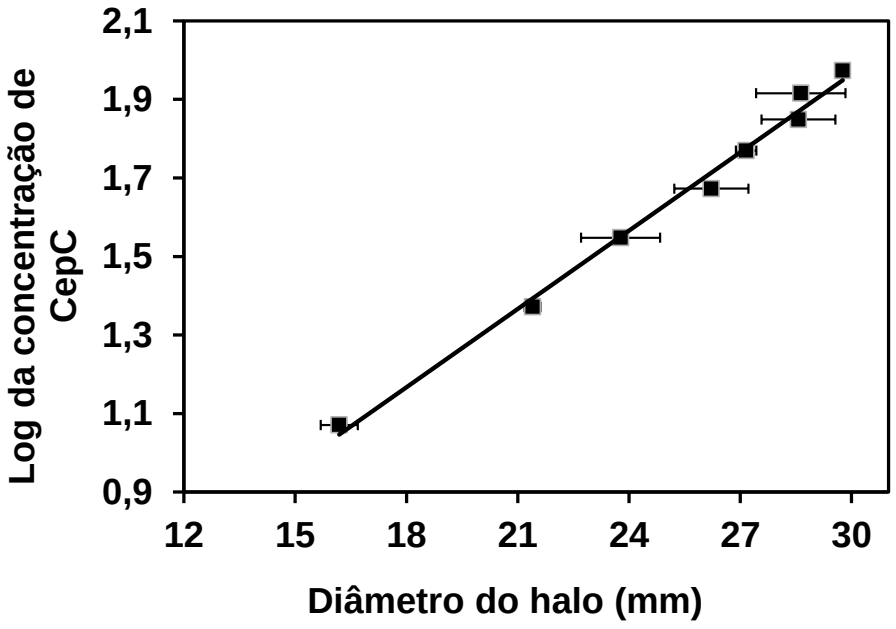
Difco ™ Penase são: potência 1977 UI/mL/min , a pH 7, 25ºC, tomando-se como base 1mg de Penicilina G (PenG) ≡ 1595 UI.

No interior dos poços perfurados eram adicionados 20 μL das soluções preparadas de amostras. As placas foram incubadas a 30ºC, por 18 horas, sendo medidos, então, os diâmetros dos halos de inibição. Posteriormente, a partir da medida do halo de inibição gerado pela aplicação das amostras de caldo de cultivo, era possível calcular a concentração de CepC totais no meio fermentado

Tabela 4. 13 - Composição do Ágar Nutriente

Componentes	**Concentração (g/L)**
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0
Ágar	15
pH	7,0

Figura 4. 2 - Curva de calibração típica de CepC



$$\text{Log [CepC]} = 0{,}0665 * D_{halo} - 0{,}0298$$

Equação 4. 1

R^2=0,99

4.4.3. Análise de AC

Costa e Badino (2012) avaliaram a produção de AC por *S. clavuligerus* por HPLC e por método espectrofotométrico (BIRD et al., 1982), concluindo que existe pouca diferença entre os resultados obtidos por ambos os métodos. Desta forma, neste trabalho utilizou-se o método espectrofotométrico proposto por Bird et al. (1982). Neste método, a amostra é derivatizada com imidazol (60 g/L) por 12 minutos 30ºC e após a reação, a solução é resfriada em banho termostatizado a 20ºC. O produto da reação (1-(4-aza-8-hydroxy-6-oxo) oct-2-en-1-oylimidazol) é então determinado através de leitura em espectrofotômetro UV a 312 nm. Previamente, foi construída uma curva de calibração com o padrão da substância. Este método é específico para AC, sendo que penicilinas praticamente não são detectadas.

4.4.4. Análise de maltose

A análise de maltose por HPLC consistiu em um método isocrático, tendo como fase móvel 100 % de água e fluxo de 0,8 $mL.min^{-1}$. Utilizou-se coluna Shim-Pack SCR-101P (7,9 mm x 30 cm), em forno a 80°C e o açúcar foi detectado por índice de refração (Modelo RID-10A/ Shimadzu). O tempo de retenção médio foi de 11,8 minutos.

4.4.5. Análise de lisina

Inicialmente a análise de lisina residual no meio de cultura era realizada por meio de método envolvendo derivatização pós-coluna com *orto*-phtalaldeído (OPA), utilizando-se uma coluna de troca iônica Shim-pack NA, em um analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A, acoplado a um detector de fluorescência Shimadzu modelo RF-10a XL ajustado com o comprimento de onda de excitação e emissão de 350 nm e 450 nm, respectivamente.

Posteriormente um método utilizando coluna de troca iônica Shim-pack NA, em um analisador automático Shimadzu LC-20AT, acoplado a um detector de refração modelo RID-10A foi desenvolvido. Discussão detalhada sobre o desenvolvimento deste método é apresentada na Seção de Resultados e Discussões (Item 5.1).

4.4.6. Análise de proteínas externa

A análise proteínas secretadas no caldo de cultivo foi realizada seguindo o método proposto por Lowry et al. (1959) e modificado por Hartree (1972). Utilizou-se como padrão soroalbumina bovina. As proteínas totais lidas neste método foram expressas sob a terminologia Proteína externa, tendo como unidade $g.L^{-1}$.

4.4.7. Análise CO_2

A análise de CO_2 na saída de gases do reator foi realizada com detector infravermelho, aparelho Quantek modelo 902P. A concentração de CO_2 emitido foi expressa em % de CO_2 na saída de gases. Tais valores percentuais foram convertidos em velocidades específicas de geração de CO2 (em mmol $CO_2.gcél^{-1}.h^{-1}$) para que pudessem ser utilizados como dados para os processos de simulação. Através da medida da percentagem foi possível calcular o volume de CO2 (em L) que saía do biorreator por hora e, com uso da lei dos gases (P*V=n*R*T), realizar a conversão para mmols.

4.5. Simulação dos modelos metabólicos

Os modelos metabólicos foram simulados o software Optflux, versão 3, disponível em: www.optflux.org. Todos os processos de simulação foram realizados utilizando a técnica de AEF, com estabelecimento da função objetivo que melhor se adequava a cada processo de simulação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Desenvolvimento de metodologia para análise de lisina

Visando à utilização de recursos disponíveis em nossos laboratórios, um novo método de análise para lisina foi desenvolvido em Cromatografia Liquída de Alta Eficiência (HPLC). Optou-se por utilizar detector de índice de refração, um detector universal que possui baixa sensibilidade, detectando apenas compostos em concentrações mais elevadas. No caso da utilização de meios quimicamente definidos, todos os constituintes adicionados em quantidades significativas são conhecidos e, assim, torna-se possível rastreá-los com o uso deste detector. Devido ao fato da lisina ser o único aminoácido presente em elevadas quantidades no meio, foi possível identificá-lo e quantificá-lo através de refração. Todavia, foi necessário o uso de uma coluna e de um método que promovessem adequada eluição do aminoácido. A primeira tentativa consistiu na utilização de ácido acético 0,05M como fase móvel e da coluna SCR-102H (Shimadzu) para ácidos orgânicos, uma vez que lisina possui o mesmo grupamento ácido destes compostos. Os cromatogramas obtidos a partir de análise do padrão (Figura 5.1) e de amostra do caldo fermentado (Figura 5.4) apresentaram boa resolução, entretanto, outros dois constituintes do meio, NaCl e $CaCl_2$, eluíram conjuntamente com o aminoácido (Figuras 5.2 e 5.3, respectivamente), inviabilizando o método proposto. Tal fenômeno provavelmente se deve ao fato de que o tempo de retenção é determinado pela interação do ânion com a resina polimérica da coluna. Cloridrato de lisina foi utilizado como reagente e, desta forma, a espécie que interagiu com a coluna foi o íon cloreto, o mesmo responsável pela interação de NaCl e $CaCl_2$. Além disto, mesmo que toda lisina fosse consumida, o ânion cloreto não seria e continuaria presente no meio, fazendo com que o pico referente a esta substância não desaparecesse, gerando então um resultado de falso positivo para a concentração de lisina no caldo.

Desta forma, um novo método foi testado utilizando-se os mesmos equipamento e detector, porém trocando-se a coluna SCR-102H pela coluna de troca iônica Shim-pack Na (Shimadzu). O seguinte esquema de eluição foi utilizado:

- 0 a 25 minutos: 100% de Borato de Sódio 0,05 M
- 25 a 30 minutos: gradiente de Hidróxido de Sódio 0,2 M de 0 a 100%
- 30 a 35 minutos: 100% de Hidróxido de Sódio 0,2 M
- 35 a 40 minutos: gradiente de Borato de Sódio de 0 a 100% 0,05 M
- 40 a 55 minutos: 100% de Borato de Sódio 0,05 M

Neste esquema, vários constituintes do meio eluíram logo no ínicio da corrida (pico em 1,6 minutos) e o pico referente à lisina foi detectado em 20,4 minutos (Figura 5.5). O uso de hidróxido de Sódio teve por função a eluição de possíveis contaminantes aderidos a coluna e o restabelecimento dos terminais de Sódio da resina polimérica.

Figura 5. 1 - Cromatograma obtido a partir da análise de uma solução de lisina 2 g/L, volume de injeção igual a 10 µL, com coluna SHIMADZU SCR-102H.

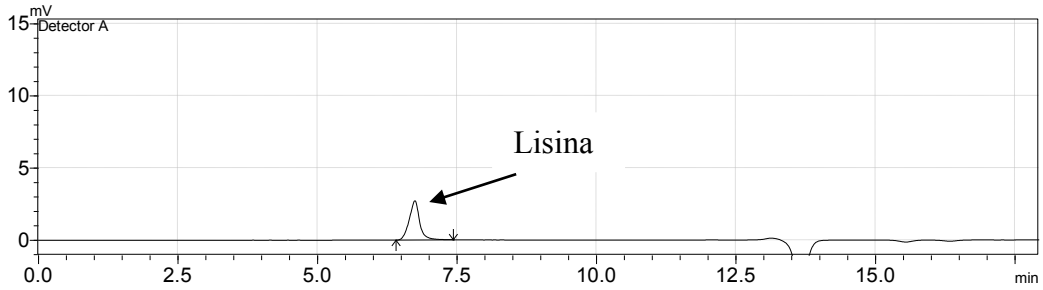


Figura 5. 2 - Cromatograma obtido a partir da análise de uma solução de NaCl 2 g/L, volume de injeção igual a 10 µL, com coluna SHIMADZU SCR-102H.

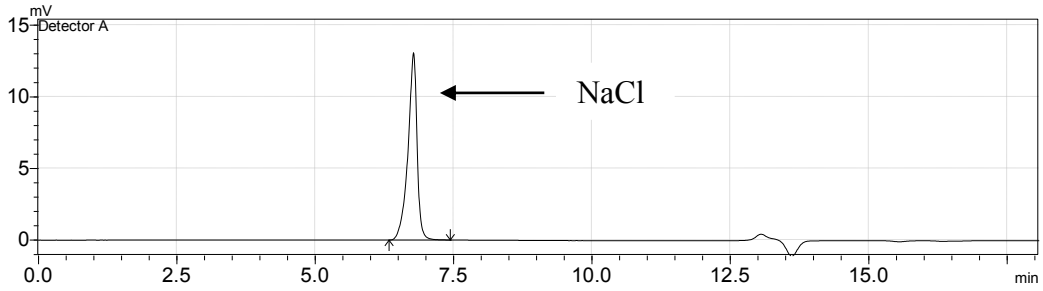


Figura 5. 3– Cromatograma obtido a partir da análise de uma solução de $CaCl_2$ 0,2 g/L, volume de injeção igual a 10 µL, com coluna SHIMADZU SCR-102H.

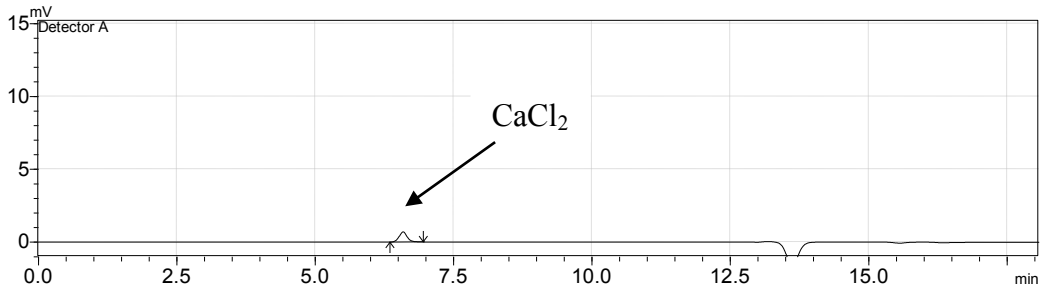


Figura 5. 4- Cromatograma obtido a partir de amostra de 24horas de cultivo, volume de injeção igual a 10 µL, com coluna SHIMADZU SCR-102H.

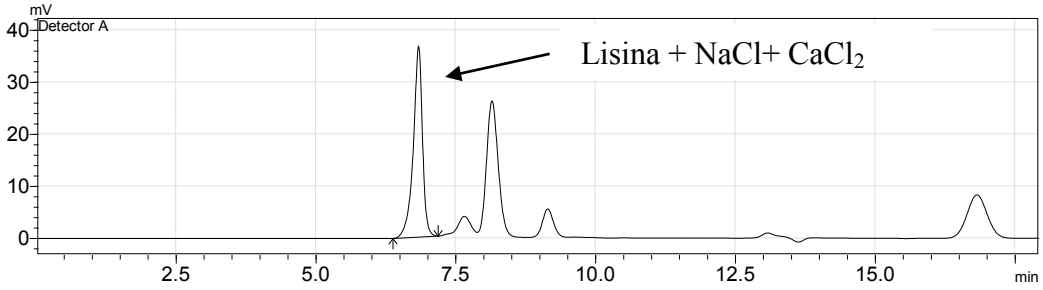
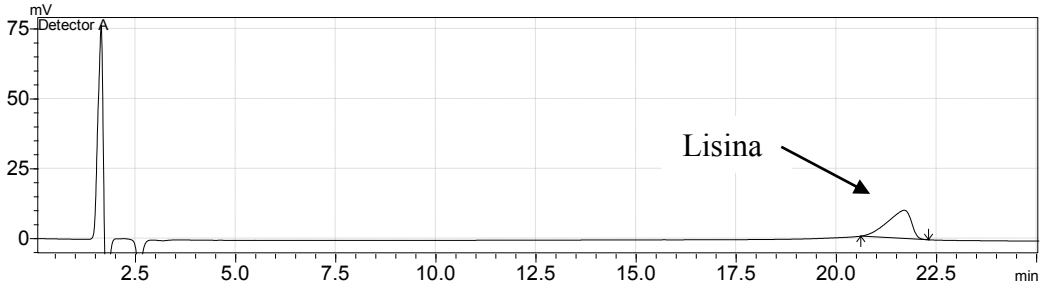


Figura 5. 5– Cromatograma obtido a partir de amostra de 24horas de cultivo, volume de injeção igual a 10 µL, com coluna Shimadzu de troca iônica Shim-pack Na.



5.2. Cultivos em meios complexos de produção

Os cultivos do micro-organismo foram realizados, inicialmente, utilizando-se meios complexos. Uma batelada de 96 horas (C1) foi realizada em meio contendo amido como fonte de C, Proflo^{TM} como fonte complexa de N e 100 mM (18,3 g.L^{-1}) de lisina que, segundo a literatura (FANG et al., 1996; ANTONIO et al., 2012; LEITE et al., 2013) proporciona aumento na produção de CefC. Esse cultivo foi considerada como referência. Esta composição tem sido utilizada em nossos laboratórios e tem proporcionado bons níveis de produção (ANTONIO et al., 2012; LEITE et al., 2013). Paralelamente a este experimento outros quatro cultivos foram realizados em regime contínuo intermitente com taxa de diluição D=0,005 h^{-1} e duração de 144 horas (C2, C3, C4, C5) foram realizados, objetivando avaliar o efeito da alimentação com amido, glicerol e/ou lisina na concentração de CepC totais. Este baixo valor de D foi escolhido para evitar arraste de células, uma vez que *S. clavuligerus* apresenta baixa velocidade de crescimento.

Os meios base de inóculo (Tabela 4.4) e de produção (Tabela 4.6) utilizados em todos estes cultivos continham amido como fonte de C e Proflo^{TM} como fonte de N. A Tabela 5.1 apresenta um resumo das fontes de C e N utilizadas, bem como os componentes dos meios de

alimentação. Optou-se por iniciar a alimentação dos cultivos em 36 horas, momento em que a concentração de amido inicial era baixa.

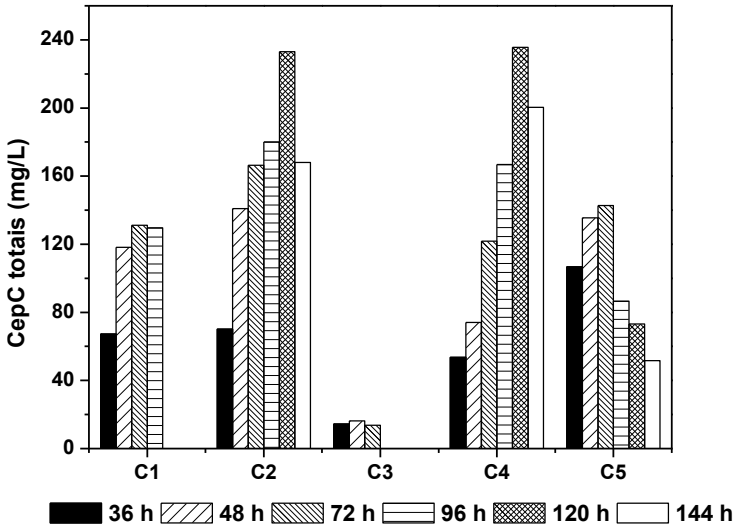
A análise da Figura 5.6 mostra que as condições C2 e C4 proporcionaram as maiores concentrações de CepC totais, atingindo valores ao redor de 230 mg/L, o que representa um aumento de 78 % em relação à condição padrão (C1). Estes resultados demonstram que a estratégia do cultivo contínuo intermitente com alimentação de amido é viável para estudar a produção de CefC em shaker. A concentração inicial de lisina neste caso não foi influente. Quanto à alimentação com glicerol (C3 e C5), os resultados não foram satisfatórios ficando aquém daqueles obtidos com amido. Isso pode ser justificado pelo fato de que o glicerol é uma fonte de C facilmente assimilável, e atuaria inibindo a produção de CefC. Ainda neste caso, a menor concentração de lisina inicial no meio C5 proporcionou maior produção em relação ao seu par, C3, que iniciou com 100 mM de lisina. Nota-se que na condição C3 a concentração de antibióticos foi muito baixa e, portanto, a análise de antibióticos foi realizada apenas para as amostras de 36, 48 e 72 horas.

Tabela 5. 1 - Fonte de C, N e lisina para os cultivos C1, C2, C3, C4 e C5

	Componente	**Cultivo**				
		C1	C2	C3	C4	C5
Componentes adicionados inicialmente ao meio	Amido Inicial($g.L^{-1}$)	10				
	Proflo ™ ($g.L^{-1}$)	8,5				
	Lisina inicial ($g.L^{-1}$/mM)	18,3/ 100			5,5/ 30	
Componentes do meio de alimentação [(a)]	Amido ($g.L^{-1}$)	-	36,2	-	36,2	-
	Glicerol ($g.L^{-1}$)	-	-	41,3	-	41,3
	Lisina ($g.L^{-1}$/mM)	-	-	-	13,7/ 75	13,7/ 75

(a) Adicionou-se solução de sais ao meio de alimentação na proporção de 5 $mL.L^{-1}$ e 21 $g.L^{-1}$ de MOPS.

Figura 5. 6 - CepC totais obtidas em meio complexo para os cultivos C1 a C5



5.3. Formulação de meios quimicamente definidos

5.3.1. Definição das fontes de C e N

A presença de componentes complexos no meio de cultura, tais como a fonte de N utilizada (Proflo^{TM}), dificulta análises que, assim, fornecem dados imprecisos que acabam por interferir na elucidação dos fluxos operantes no micro-organismo. A utilização de aminoácidos é uma alternativa viável para contornar este problema. No presente trabalho foi utilizada lisina, que estimula a produção de antibióticos β-lactâmicos em *S. clavuligerus* e é metabolizada por este micro-organismo como fonte de N.

Uma característica marcante de *S. clavuligerus* é a sua incapacidade em metabolizar glicose possuindo, todavia, a capacidade de metabolizar açúcares maiores, tais como maltose e amido (GARCIA-DOMINGUEZ et al., 1989). No experimento com meio complexo, amido foi utilizado como fonte de C e apresentou bons resultados. Porém, a quantificação do seu consumo apresentou relativa dificuldade, pelo fato de que o micro-organismo hidrolisa este biopolímero em unidades menores, de diferentes tamanhos, complicando a quantificação via HPLC. Por isto, optou-se por testar maltose como fonte de C no meio quimicamente definido, que pode ser facilmente quantificada via HPLC.

5.3.2. Definição dos meios de inóculo

Nesta fase do projeto, além de estabelecer um meio quimicamente definido para a produção, optou-se por testar as composições quimicamente definida e complexa para o meio

de inóculo (Tabela 5.2) e sua influência sobre a produção de CefC. A Tabela 5.2 expõe as diferenças entre os meios de inóculo complexo e quimicamente definido.

Tabela 5. 2 – Composição geral do meio de preparo de inóculo

	Componentes	**Concentração (g/L)**
Meio de inóculo complexo	Amido	10,0
	Proflo™	8,5
Meio de inóculo quimicamente definido	Maltose	10,0
	Lisina	4,0 (21,8 mM)
	Glutamato	5,5
Componentes comuns a ambos os meios	Vide Tabela 4.4	

5.3.3. Avaliação da composição dos Meios de produção

Nos experimentos C6, C7 e C8, foram avaliadas três condições de meio, sendo considerado padrão o experimento C6, a qual possuía a mesma composição da condição C1 relatada no item 5.2, e duas com composição quimicamente definidas (C7 e C8). Um resumo com as fontes de C e N e meios de inóculo utilizados nesta fase constam na Tabela 5.3 e os demais constituintes são aqueles do meio base de produção (Tabela 4.6).

Tabela 5. 3 - Fontes de C e N para os meios de produção C6, C7 , C8, e respectivos meios de inóculo utilizados

Meio	**Fonte de C**	**Fonte de N e Lisina**	**Meio de Inóculo utilizado**
C6	Amido (10 g/L)	Proflo™ (8,5 g/L) + Lisina (18,3 $g.L^{-1}$/100 mM)	Complexo
C7	Maltose (10 g/L)	Lisina (18,3 $g.L^{-1}$/100 mM)	Complexo
C8	Maltose (10 g/L)	Lisina (18,3 $g.L^{-1}$/100 mM)	Quimicamente definido

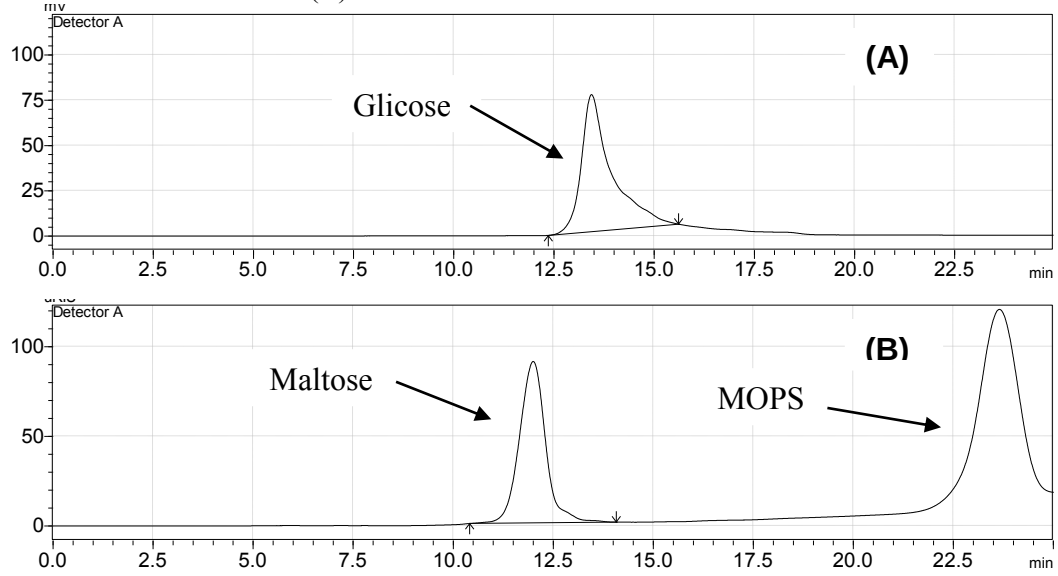
Primeiramente, foi realizado um processo em batelada para investigar a dinâmica do processo e, com os resultados, propor a composição de meios para cultivos contínuos. A análise de açúcares no meio de cultura revelou que maltose não sofre hidrólise pelo micro-

organismo no ambiente extracelular, como pode ser observado nos cromatogramas obtidos com padrão de glicose e amostra do meio C8 no tempo de 12 horas (Figura 5.7). Nesta amostra, nenhum sinal no tempo de retenção correspondente à glicose foi detectado (Figura 5.7 B). Por fim, o perfil de consumo de maltose encontra-se nos gráficos da Figura 5.8. O açúcar foi totalmente consumido em 48 horas de cultivo. Portanto estratégias de alimentação levaram em consideração este comportamento, de forma a não haver acúmulo deste substrato no meio e inibição da produção de antibióticos pelo micro-organismo.

A condição do cultivo C6 foi a mesma do cultivo C1 relatado no item 5.2. Nota-se que a produção em C6 foi 35 % inferior à obtida em C1. Provavelmente este fato foi devido à qualidade do banco de micro-organismos utilizado, o qual estaria com menor capacidade produtiva na ocasião da fermentação C6. Portanto, os experimentos dos itens 5.2 e 5.3 devem ser analisados em blocos separados e a comparação entre eles deve sempre levar em conta o padrão de cada bloco, de forma a relativizar os resultados.

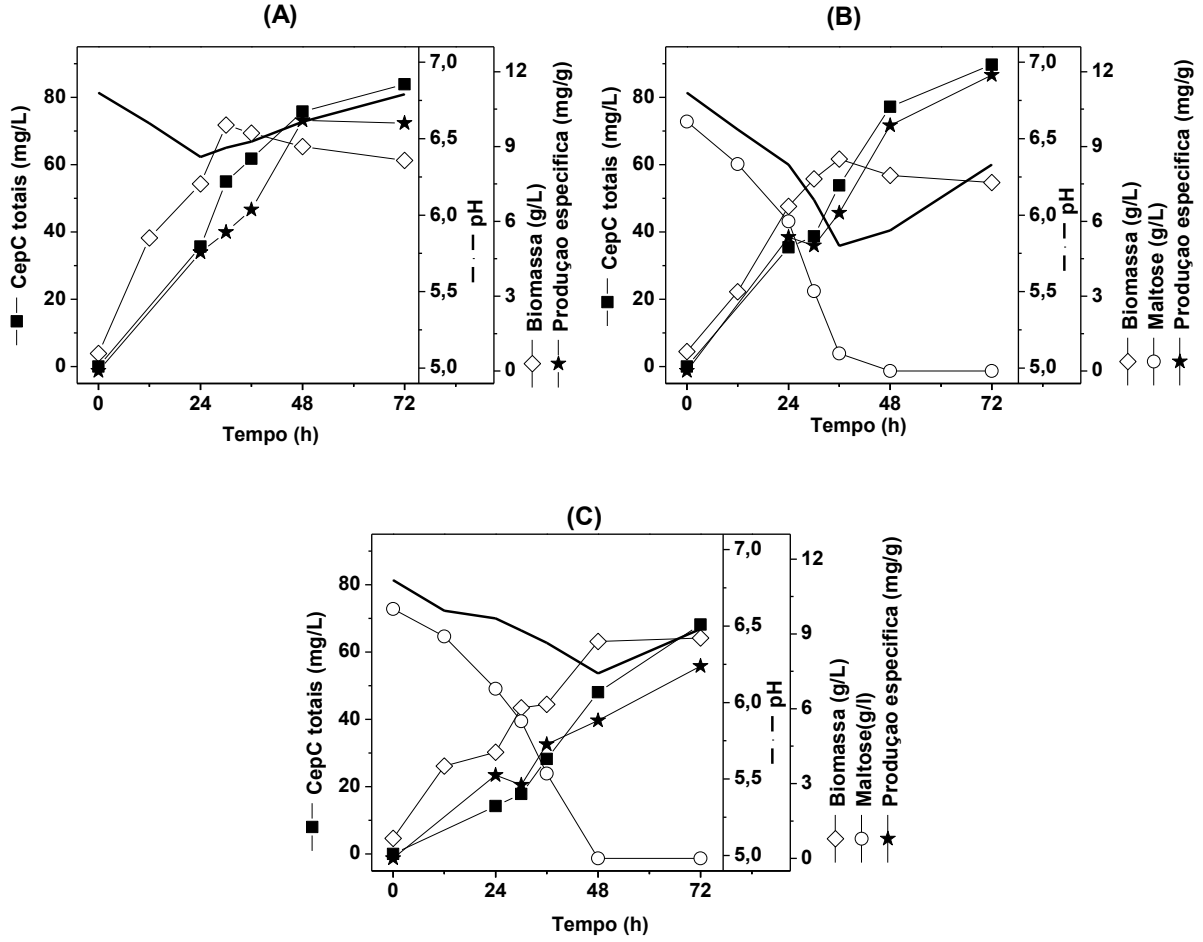
Tendo em vista as considerações aqui relatadas, pode-se afirmar que o uso de meio quimicamente definido proporcionou produção de CepC totais igual (C7) ou próxima (C8) à obtida em meio complexo (C6), no processo em batelada (Figura 5.8). Desta forma, conclui-se que é possível utilizar meios quimicamente definidos, mesmo para o preparo do inóculo, evitando assim a inconveniência de carregar resíduos complexos para o meio de produção, tais como fibras provenientes do Proflo^{TM}, de difícil identificação e análise. Dados mais detalhados sobre cada um destes cultivos podem ser visualizados nos gráficos da Figura 5.8.

Figura 5. 7 – Cromatogramas obtidos de uma solução de glicose 10 g/L (A) e de uma amostra do meio C8 em 12 horas de cultivo (B).



O tempo de retenção médio para glicose foi de 13,4 minutos e para maltose de 11,8 minutos.

Figura 5. 8 – Biomassa, CepC totais, produção específica, maltose residual e pH para os cultivos C6 (A), C7(B) e C8(C).



5.3.4. Cultivo contínuo intermitente em mesa incubadora rotativa

O próximo passo, após realização dos cultivos em batelada com meios quimicamente definidos, consistiu na realização de cultivos contínuos para verificar a influência da alimentação. Foram realizados 24 cultivos contínuos intermitentes em frascos agitados para melhor estabelecer as concentrações ideais das fontes de C e N. Entretanto grande parte destes cultivos não foram bem sucedidos. No período intermediário dos cultivos (72 a 96 horas) alguns meios adquiriram coloração verde-acinzentada (Figura 2.9), acompanhada de baixas concentrações de antibiótico. Testes microbiológicos realizados nestes cultivos excluíram a possibilidade de contaminação por micro-organismos exógenos. Porém, mesmo as análises dos poucos caldos coletados no período de 72 a 96 horas que apresentavam a típica coloração creme, acusaram baixas produções. Tais cultivos foram interrompidos em 96 horas devido à queda do pH, surgimento da coloração verde-acinzentada e baixa produção. Os dados de apenas um destes cultivos, denominado C9, realizado em duplicata, estão apresentados na Figura 5.10.

Entretanto um único cultivo bem sucedido (Figura 5.11) mostrou que seria possível o estabelecimento de cultivos contínuos com o meio quimicamente definido proposto. Neste cultivo, nomeado C10, a produção de CepC totais atingiu níveis ao redor de 150 $mg.L^{-1}$ (Figura 5.11). Várias hipóteses elaboradas e testadas para descobrir as causas da baixa produção não solucionaram o problema, porém, uma diferença importante observada entre o cultivo bem sucedido e os demais foi a queda acentuada de pH nestes últimos (Figuras 2.10 e 2.11). Todavia, a limitação da amostragem a cada 24 horas em frascos agitados impediu um monitoramento constante e contínuo do pH e, assim, não foi possível associar esta variável com a diferença entre as produções.

Figura 5. 9 – Imagens de caldos resultantes de cultivo contínuo intermitente de 96 horas em frascos agitados: coloração normal à esquerda e coloração verde-acinzentada à direita.

Figura 5. 10 – Cultivo C9: biomassa, CepC totais, produção específica e pH em cultivo contínuo intermitente em frascos agitados com meio quimicamente definido.

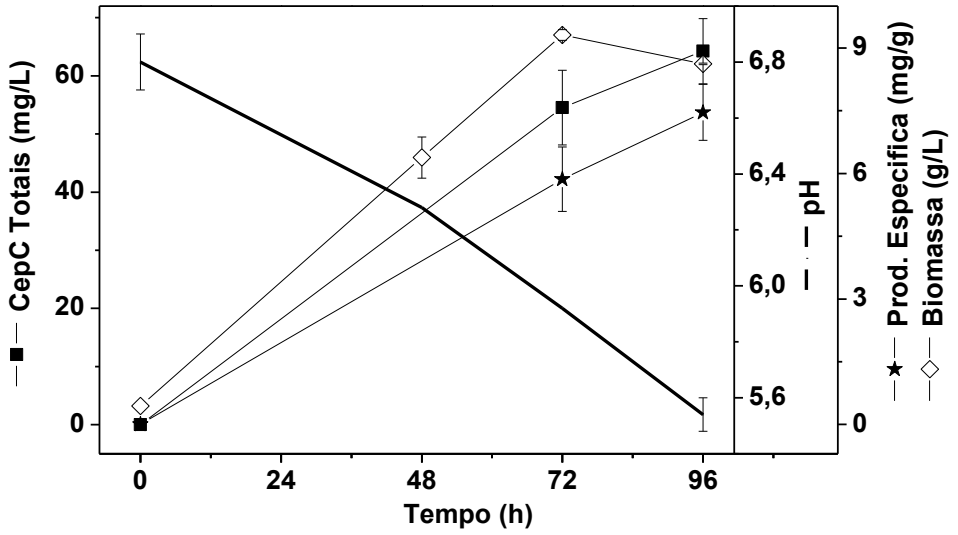
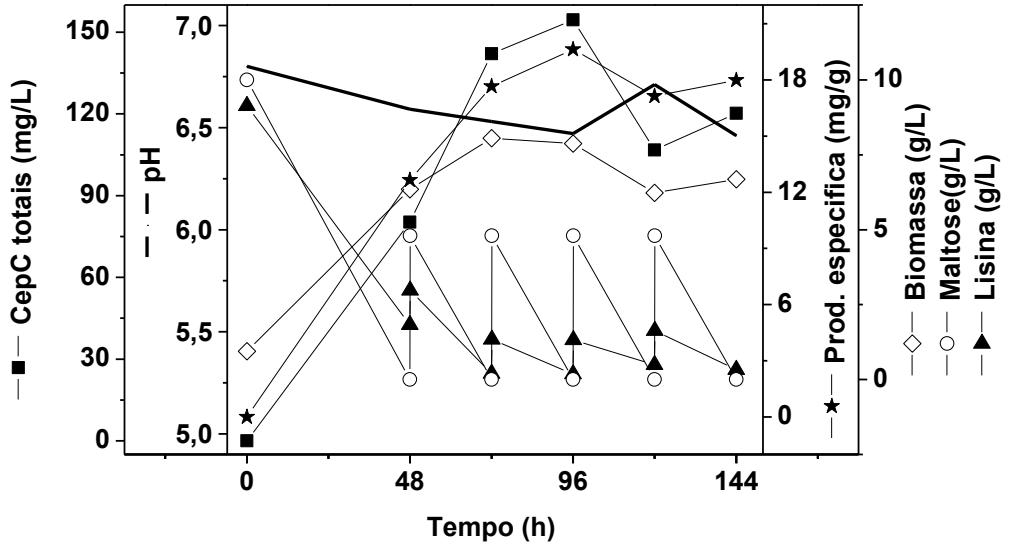


Figura 5. 11 - Cultivo C10: Biomassa, CepC totais, produção específica, lisina residual, maltose residual e pH em cultivo contínuo intermitente em frascos agitados com meio quimicamente definido.



5.3.5. Cultivo contínuo intermitente em biorreator

Após as tentativas mal sucedidas de cultivo em frascos agitados optou-se por realizar novos testes em biorreator, pois o mesmo proporciona maior controle das condições do bioprocesso. As concentrações das fontes de C e N nos meio de inóculo, produção e alimentação foram as mesmas utilizadas para o cultivo intermitente com meio quimicamente definido em frascos agitados. A alimentação, entretanto, foi iniciada em 36 horas, uma vez que quase toda maltose adicionada inicialmente havia se esgotado nesse período. O intervalo

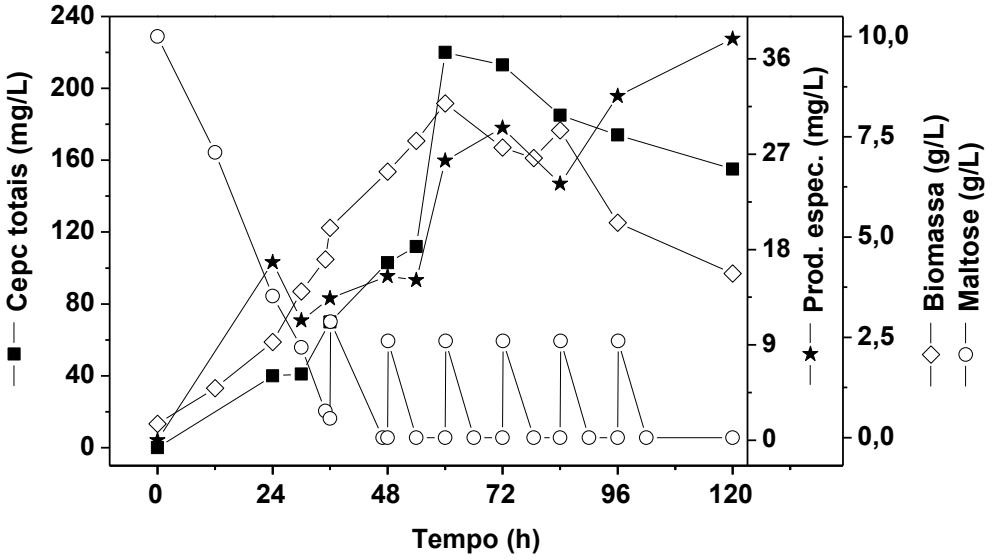
de intermitência também foi reduzido para 12 horas no biorreator enquanto para cultivos em frascos agitados era de 24 horas. A taxa de diluição foi mantida em 0,005 h^{-1}.

No cultivo em biorreator, informações relevantes puderam ser extraídas, sendo o comportamento do pH ao longo do processo a principal delas. Observou-se claramente que a tendência do pH era de queda durante o consumo de maltose, fato este evidenciado principalmente na fase de alimentação (36 a 96 h). Imediatamente após a adição de meio fresco, o pH começava a cair e, após aproximadamente 6 horas, a tendência mudava, ou seja, o pH começava a aumentar. Assim, foram realizadas análises de maltose no momento de inversão da tendência de pH, observando-se ausência deste açúcar (Figura 5.12). Concluiu-se, então, que a velocidade de consumo foi superior à de alimentação. Em biorreator, devido aos controles existentes, o pH foi mantido em uma faixa adequada ao processo (6,8±0,1). Estendendo as constatações acima descritas aos cultivos em frascos agitados, pode-se concluir que as variações de pH inviabilizaram o modo de operação contínuo em *shaker*.

A produção de antibióticos em biorreator atingiu níveis ao redor de 230 mg/L entre 60 e 72h (Figura 5.12). Com relação à operação contínua intermitente em mesa incubadora rotativa também houve aumento da produção específica, passando de 18 mg/g (Figura 5.11) para aproximadamente 30 mg/g nos períodos de maior produção, comprovando mais uma vez que o comportamento do pH afeta a produção de CefC.

A utilização de cultivo intermitente foi relatada por Domingues et al. (2010) para a produção de AC, obtendo excelentes resultados de produção deste biocomposto, provavelmente pelo fato de que uma proporção considerável de meio era trocada de uma única vez em intervalos periódicos acarretando uma diluição de possíveis componentes tóxicos às células. No presente trabalho constatou-se a mesma eficiência deste modo de operação para a produção de CefC, em meio quimicamente definido. Entretanto, como pode ser observado no gráfico da Figura 5.12, a concentração celular e de antibióticos não se mantiveram constantes, indicando que esta não seria a forma mais adequada de operação dos cultivos para obtenção de dados visando ao estudo dos fluxos metabólicos.

Figura 5. 12– Cultivo C11: biomassa, CepC totais, produção específica e maltose residual em cultivo contínuo intermitente em biorreator.



5.4. Cultivos contínuos com meio quimicamente definido

Dadas às constatações do cultivo contínuo intermitente, o caminho lógico a ser seguido foi operar os cultivos de forma efetivamente contínua, ou seja, eliminando-se o intervalo entre as alimentações, em busca de maior estabilidade das variáveis estudadas.

5.4.1. Cultivo C12 com D=0,005 h^{-1}

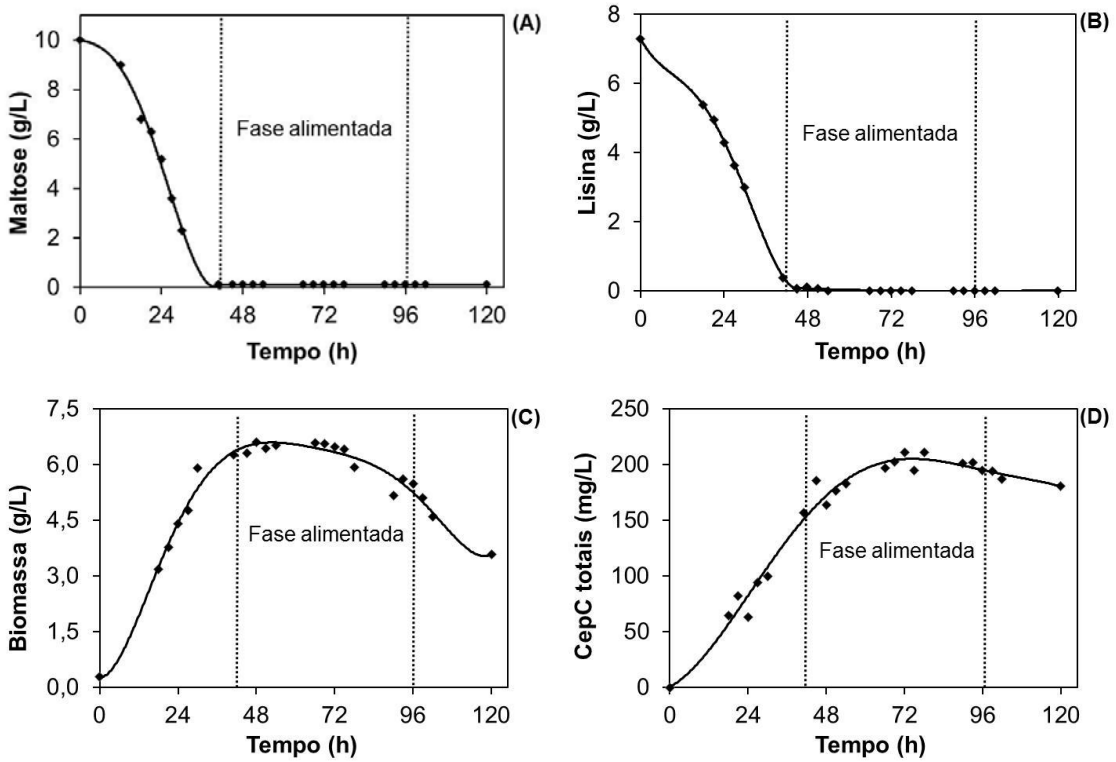
No primeiro cultivo operado de forma totalmente contínua adotaram-se as mesmas condições dos cultivos intermitentes em frascos agitados. Porém, reduziu-se a concentração inicial de lisina de 50 mM (9,1 $g.L^{-1}$) para 40 mM (7,3 $g.L^{-1}$), uma vez que análises indicaram que este aminoácido não havia sido consumido totalmente no início da etapa alimentada. A alimentação neste cultivo foi iniciada no instante em que se observou o esgotamento da fonte de C (42 horas), utilizando-se o meio descrito na Tabela 4.10.

O fornecimento constante da fonte de C minimizou a tendência de alternância de pH observada anteriormente. Análises de maltose durante a fase alimentada revelaram que a velocidade de consumo foi superior à velocidade de alimentação, uma vez que ainda se utilizou a mesma concentração de maltose no meio suplementar do modo intermitente e a mesma taxa de diluição. Todavia, obteve-se maior estabilidade de biomassa e produção de antibióticos durante a fase contínua em relação ao cultivo intermitente. Comparados cultivo anterior, os níveis máximos de CepC totais foram ao redor de 15% inferiores (Figuras 5.12 e 5.13), mantendo-se em torno de 200 $mg.L^{-1}$ entre 66 e 96 horas. Ainda, a biomassa média

entre 54 e 96 horas foi de 6,2 $g.L^{-1}$, ao passo que no cultivo intermitente atingiram-se valores entre 7 e 8 $g.L^{-1}$.

Todos os dados obtidos neste e nos cultivos subsequentes foram alisados e, funções polinomiais foram ajustadas aos valores experimentais de forma a minimizar flutuações dos dados (HISS, 2001). A partir dos dados alisados foram então calculadas as velocidades específicas de crescimento, consumo de substratos e formação de produtos, as quais serão discutidas a frente no item 5.4.5.

Figura 5. 13 – Perfis de maltose (A), lisina (B), biomassa (C) e CepC totais (D) obtidos em cultivo com C12.

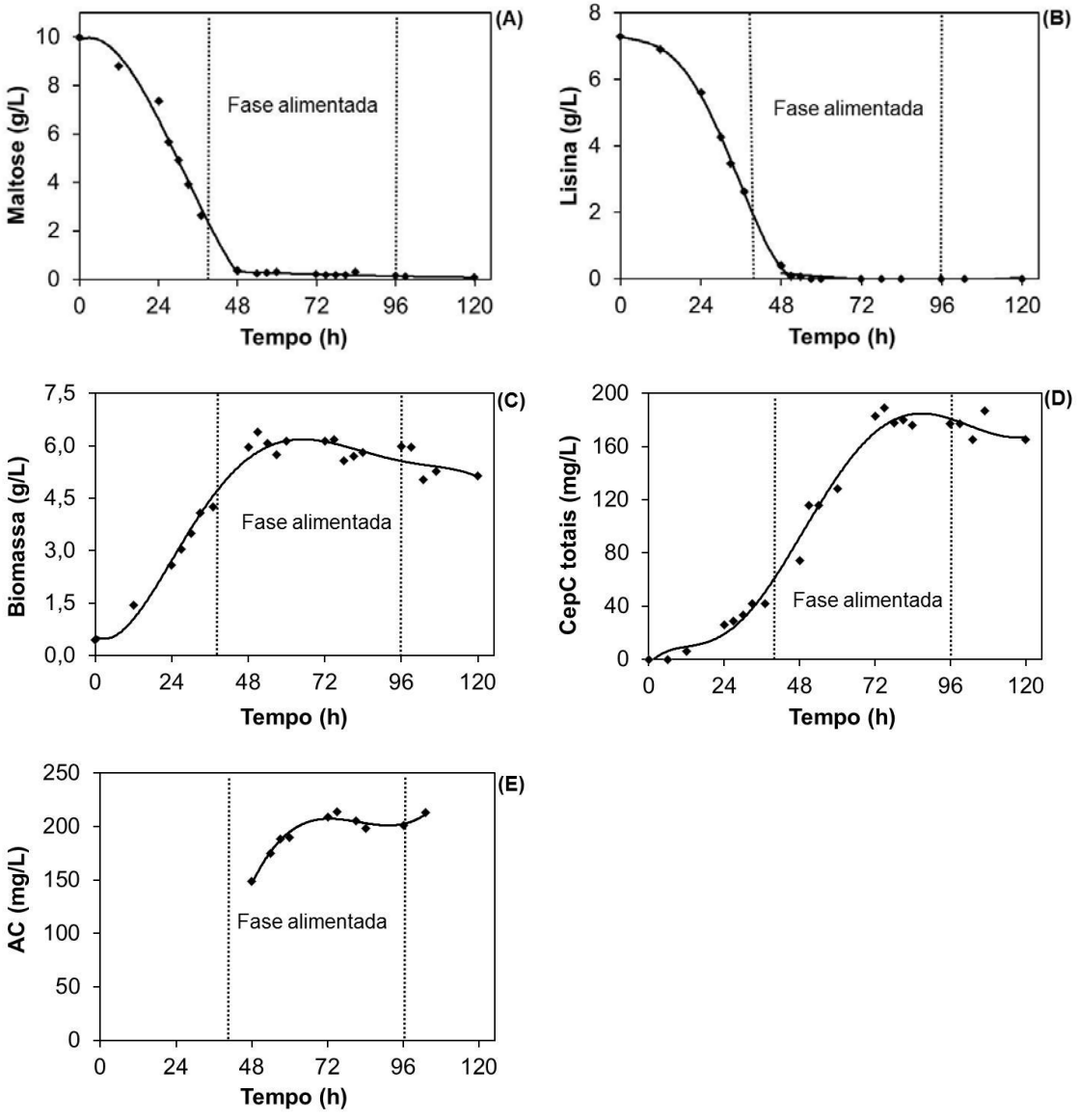


5.4.2. Cultivo C 13 com D=0,006 h^{-1}

Com objetivo de igualar a velocidade de consumo e de alimentação de maltose, um novo cultivo contínuo foi realizado. As concentrações das fontes de C (10 $g.L^{-1}$) e N (7,3 $g.L^{-1}$) iniciais foram as mesmas estabelecidas no cultivo anterior, bem como as suas concentrações no meio de alimentação (Tabela 4.10). A alimentação foi iniciada em 38 horas de cultivo, adotando-se uma taxa de diluição um pouco maior (D = 0,006 h^{-1}). Como pode ser observado na Figura 5.14, o perfil de produção foi semelhante ao obtido no cultivo com D=0,005 h^{-1}. Entretanto, neste a produção máxima de CepC totais foi ao redor de 180 $mg.L^{-1}$ (Figura 5.14), 10 % inferior em relação ao cultivo anterior, e a biomassa média manteve-se

em 5,9 $g.L^{-1}$. Neste cultivo, também foi analisada a produção de AC entre o período de 45 a 105 h, onde se verificou maior produção deste composto em relação à CefC, atingindo valores ao redor de 210 $mg.L^{-1}$. Outro ponto importante observado durante este cultivo foi que mesmo com o aumento da taxa de diluição ainda não foi possível igualar a velocidade de alimentação da fonte de C com a de consumo. Como efeito desta falta de C, observou-se, durante a fase alimentada, um leve declínio da biomassa. Para CefC, também observou-se um declínio da concentração total, porém após 72 horas de processo. A velocidade de alimentação inferior a de consumo de maltose provavelmente provocou a deterioração do processo. Desta forma, concluiu-se que seria necessário um maior aumento na vazão de alimentação para fornecer C suficiente para o micro-organismo.

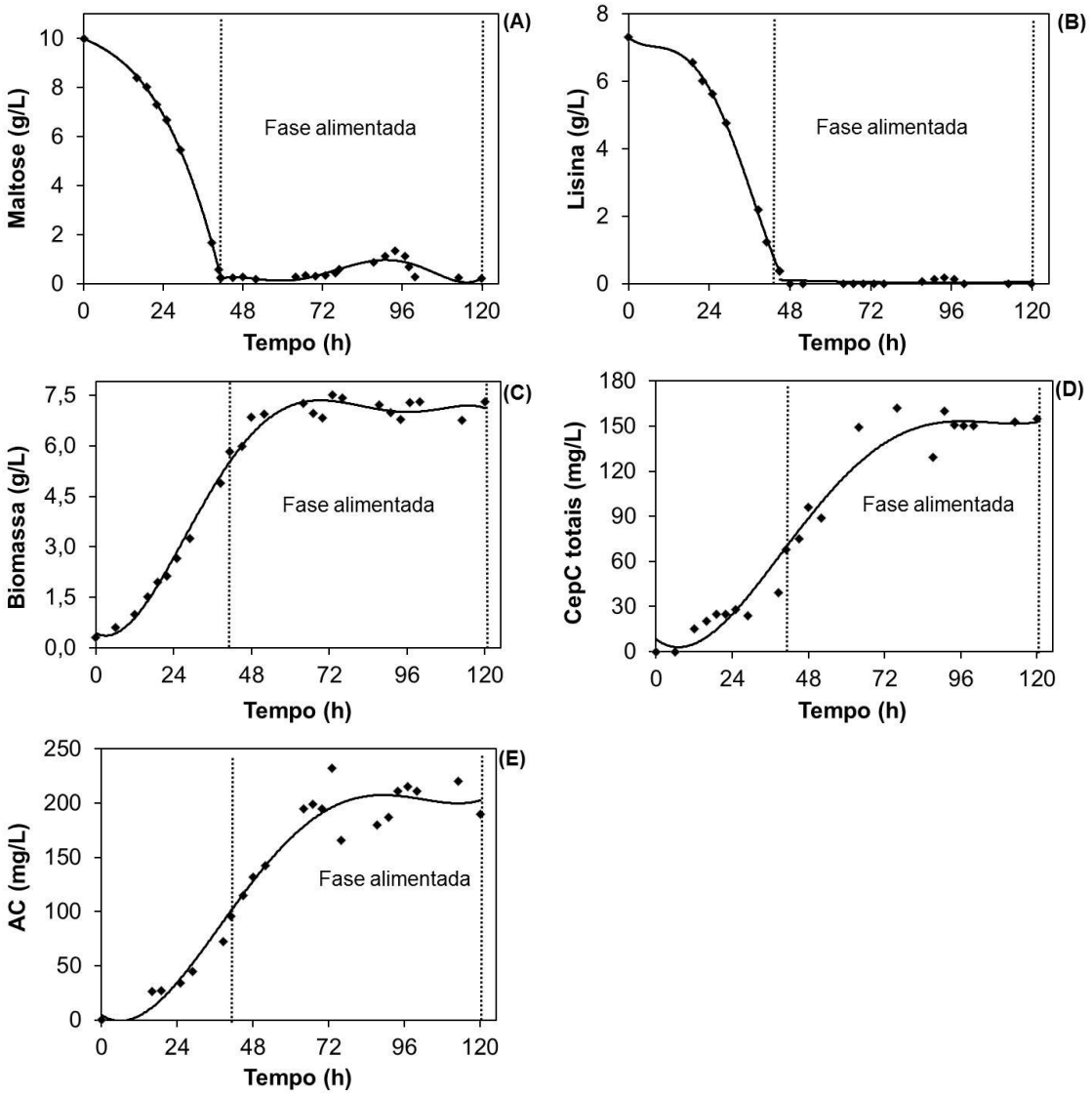
Figura 5. 14 – Perfis de maltose (A) , lisina (B), biomassa (C), CepC totais (D) e AC (E) no cultivo C13



5.4.3. Cultivo C14 com D=0,012 h^{-1}

Como já discutido anteriormente, o consumo e término da maltose nos meios estudados provocavam oscilações no pH. Tal comportamento foi então utilizado como parâmetro para medir a velocidade de consumo do açúcar e assim ajustar a vazão de alimentação. Com D estabelecido em 0,012 h^{-1}, a biomassa manteve-se estável ao redor de 7,1 $g.L^{-1}$, entre 70 e 120 horas de processo (Figura 5.15). A produção de CefC foi inferior em relação aos cultivos anteriores, permanecendo em torno de 150 $mg.L^{-1}$ após 72 horas (Figura5.15). Provavelmente, o aumento de D promoveu uma maior diluição do antibiótico, resultando em níveis menores quando comparado aos cultivos anteriores, onde a taxa de diluição foi menor. A produção de AC também permaneceu constante em valores ao redor de 200 $mg.L^{-1}$, após 85 horas de fermentação.

Figura 5. 15 - Perfis de maltose (A), lisina (B), biomassa (C), CepC totais (D) e AC (E) no cultivo C14



Importante destacar que neste cultivo o processo de alimentação foi prolongado até 120 horas, ao contrário dos processos anteriores, onde a alimentação foi finalizada em 96 horas. Com isto, foi possível obter maior período de estabilidade para as variáveis estudadas. Os dados obtidos nesta fermentação serviram ao estudo de fluxos metabólicos.

5.4.4. Cultivo C15 com D=0,013 h^{-1}

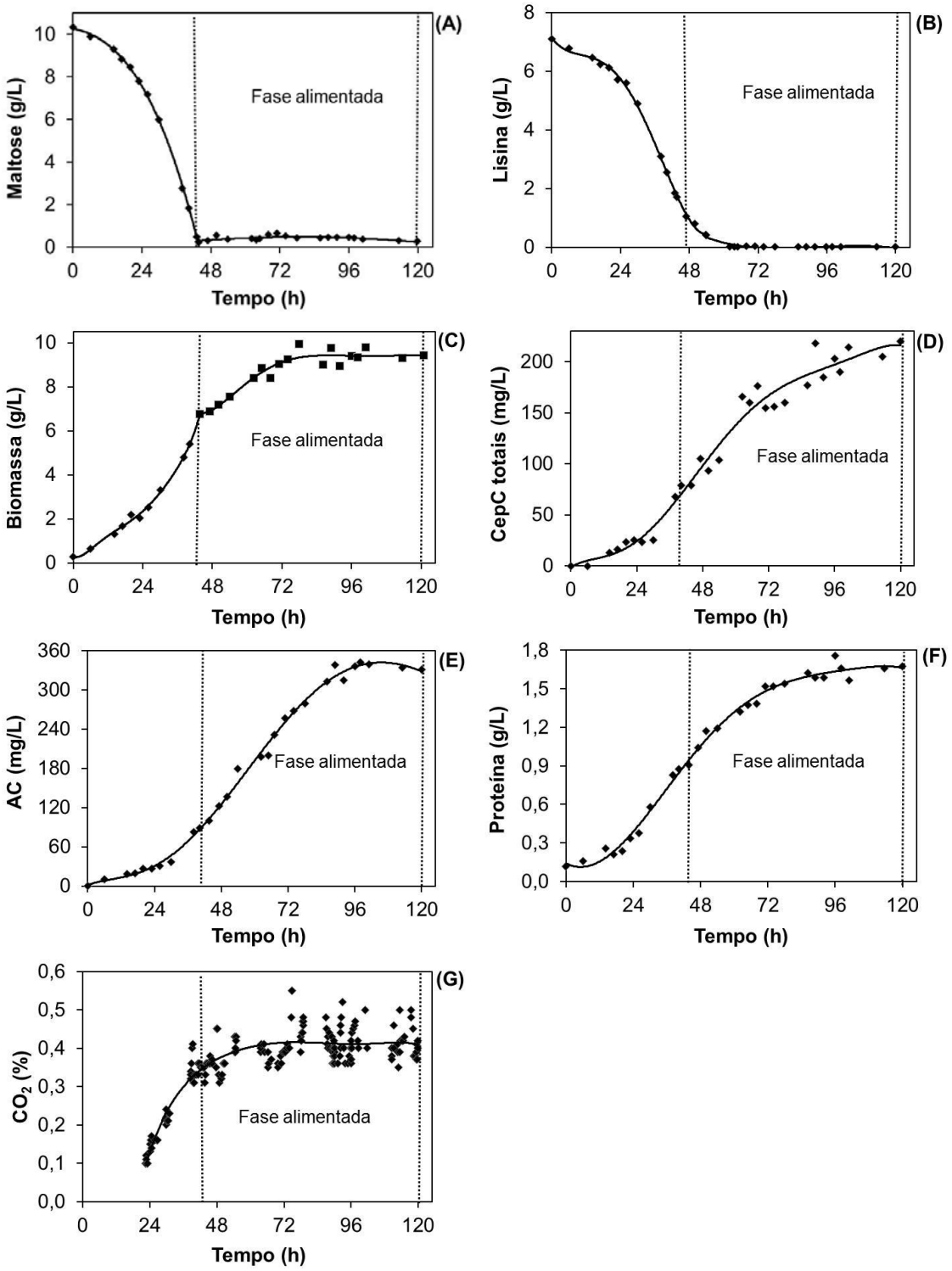
Um novo cultivo contínuo foi realizado, desta vez com D=0,013 h^{-1}, para aumentar o fornecimento de maltose. Iniciou-se o período de alimentação em 44 horas e estendeu-se até 120 horas. O intuito principal deste experimento foi medir um número maior de variáveis a fim de rastrear o máximo possível de C na rede estudada. Além das medidas anteriormente realizadas, neste cultivo avaliou-se também a concentração de proteínas totais no caldo fermentado e a concentração de CO_2 na saída de gases do reator.

Neste cultivo, houve estabilização da concentração celular após 72 horas, num valor médio de 9,4 $g.L^{-1}$ (Figura 5.16), o que representa um aumento de 32 % em relação ao cultivo C14. Seguindo a mesma tendência, as concentrações de CefC e AC atingiram valores máximos de 215 e 330 $mg.L^{-1}$ (Figura 5.16), respectivamente, que correspondem a aumentos de 43% e 65 % em relação a C14. Todavia, não houve estabilização da concentração de CefC, que se mostrou crescente até o final do processo.

No cultivo C15 optou-se por utilizar o meio de alimentação contendo todos os nutrientes utilizados no meio de produção. Esta condição deve ter contribuído para a obtenção de maiores concentrações de biomassa e de antibióticos. O pequeno aumento na taxa de diluição do cultivo C14 para o C15 provavelmente proporcionou uma alimentação mais eficiente, aumentando a disponibilidade de maltose, e também contribuiu para aumento das concentrações dos produtos formados.

Neste cultivo analisou-se a concentração de CO_2 na saída de gases do reator, a qual estabilizou-se em 0,4 % após 60 horas de cultivo. Esta estabilidade foi condizente com o consumo constante das fontes de C e energia. O perfil de proteína no caldo fermentativo durante este cultivo também foi determinado (Figura 5.16). Observou-se um aumento de proteínas externas até quase o fim da fermentação, embora na fase alimentada a velocidade de acúmulo tenha diminuído. Com o maior número de dados obtidos neste cultivo foi possível calcular a distribuição de fluxos em *S. clavuligerus* com maior precisão e também realizar um balanço de C.

Figura 5. 16 - Perfis de maltose (A), lisina (B), biomassa (C), CepC totais (D), AC (E), proteína externa (F) e CO_2 na saída de gases (G) no cultivo C14



5.4.5. Cálculo de velocidades específicas nos cultivos C12 a C15

Os perfis dos cultivos contínuos foram bem ajustados por funções polinomiais, as quais eliminaram as flutuações inerentes aos dados experimentais. Embora estas equações não

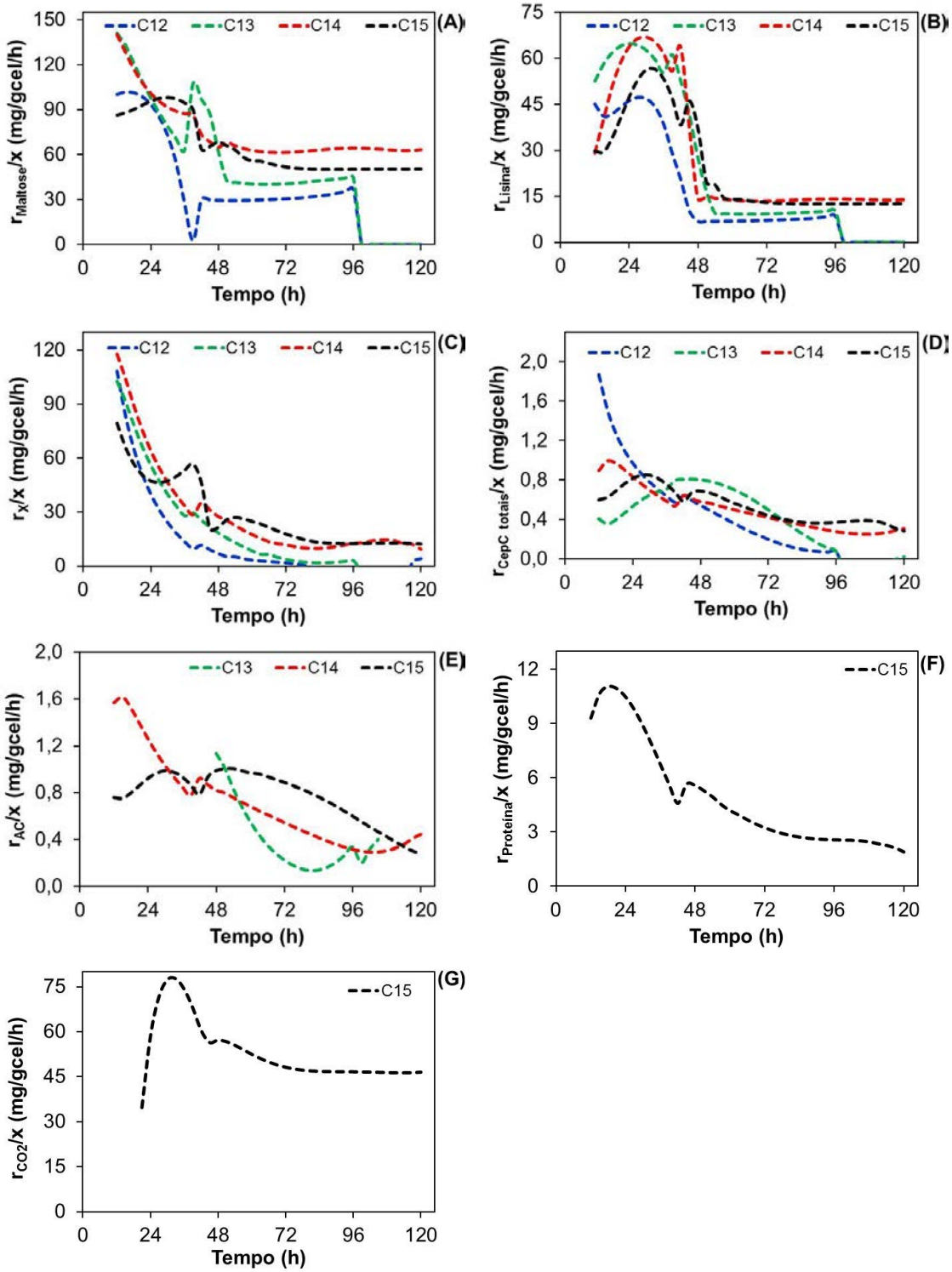
constituam modelos fenomenológicos, quando bem ajustadas permitem determinar velocidades representativas do processo fermentativo por meio do método geométrico para cálculo de derivadas proposto por Leduy e Zajic (1973), ainda hoje aplicado em bioprocessos (RODRIGUES et al., 2011). Para cálculo das velocidades durante a etapa alimentada utilizou-se a equações aplicadas ao cultivo contínuo, porém, com a exceção de que, no estado transiente, os valores das derivadas não foram igualados a zero, mas sim aos valores obtidos através do método proposto por Leduy e Zajic (1973). As velocidades específicas, expressas em $mg.g_{célula}^{-1}.h^{-1}$, estão apresentadas na Figura 5.17. Estes cálculos foram especialmente importantes para a obtenção de velocidades específicas da etapa contínua, as quais foram utilizadas nos estudos de fluxos metabólicos que serão apresentados adiante.

A análise da Figura 5.17 mostra claramente que as menores taxas de diluição empregadas (C12=0,005 h^{-1} e C13=0,006 h^{-1}) promoveram menores velocidades de formação de biomassa e de antibióticos. No cultivo C12, após 72 horas a velocidade específica de crescimento determinada pelo método proposto tornou-se negativa, indicando decréscimo da formação de células. Por outro lado, sob taxas de diluição de 0,012 (cultivo C14) e 0,013 h^{-1} (cultivo C15) observou-se estabilidade da velocidade de crescimento após 72 horas, em valores ao redor de 13 $mg.g_{célula}^{-1}.h^{-1}$. Portanto, nestes dois cultivos igualou-se a taxa de diluição à velocidade de crescimento (D=μ), comprovando que atingiram o estado estacionário. Ainda, estes resultados mostraram que o baixo fornecimento de maltose e lisina nos cultivos com menores valores de D não manteve a população microbiana viável durante o processo.

Comparando-se os cultivos C14 e C15 observa-se que a velocidade de crescimento de ambos é próxima. Entretanto, a velocidade de consumo de maltose é 25 % maior em C14. Uma vez que não houve carência de micronutrientes no cultivo C15, devido à composição do meio de alimentação, o micro-organismo pode ter sido mais eficiente na conversão dos substratos em produtos. A velocidade de produção de AC e CefC também aumentou em relação a C14, indicando que as biossínteses destes compostos podem ser mais susceptíveis à carência nutricional. De uma forma geral, os dados obtidos em ambos os cultivos entre 72 e 120 horas apresentaram relativa estabilidade. Assim, as velocidades específicas neste período foram utilizadas como restrição para a simulação do modelo metabólico construído. Por outro lado, devido a limitações do método de cálculo empregado, não foi possível obter velocidades específicas adequadas para utilização na simulação do modelo metabólico durante a etapa anterior à alimentação. Desta forma, durante esta etapa no cultivo C15, foram utilizadas as

variações globais de cada metabólito analisado como dados de entrada para simulação dos modelos.

Figura 5. 17- Perfis de velocidades especificas de consumo de maltose (A) e de lisina (B), e de formação de biomassa (C), CepC totais (D), AC (E), proteína externa (F) e CO_2 (G).



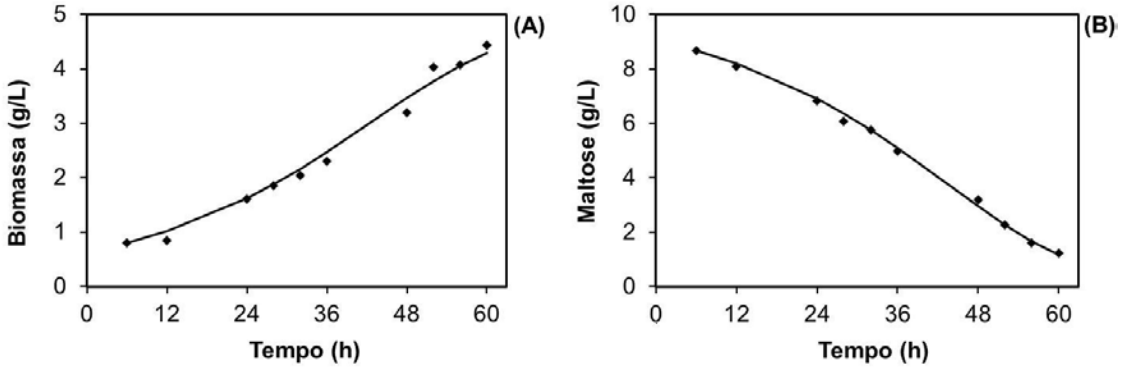
Como já mencionado, o estabelecimento de um meio quimicamente definido é condição essencial para o estudo de fluxos metabólicos. O meio desenvolvido no presente trabalho mostrou-se muito adequado para o cultivo de *S. clavuligerus* e para a produção de CefC, proporcionando a obtenção de dados em quantidade e qualidade suficientes para iniciar os trabalhos de estudo de fluxos em *S. clavuligerus*, tratados a seguir.

5.4.6. Cultivos C16 e C17: crescimento com Maltose como única fonte de C e com lisina como única fonte de C

O experimento C16 foi realizado para avaliar o crescimento de *S. clavuligerus* em maltose como única fonte de C. Para isto, lisina foi substituída por NH_4Cl como fonte de N. Para preparar o inóculo utilizou-se o mesmo meio dos cultivos contínuos, contendo maltose, lisina e glutamato, com o intuito de promover um crescimento em meio mais rico. Durante a fermentação principal, os dados obtidos até 6 horas foram desconsiderados, uma vez que análises indicaram que havia lisina residual proveniente do meio de inóculo. A partir deste período dados de biomassa e de maltose (Figura 5.18) possibilitaram o ajuste de um modelo cinético de crescimento segundo Monod (1949), com a estimativa dos valores de velocidade máxima de crescimento ($\mu_{máx}$), da constante de saturação (K_s) e também do coeficiente de rendimento de substrato a células ($Y_{x/s}$):

- $\mu_{máx\ M}$ – 0,065 (±0,005) h^{-1}
- $K_{s\ M}$ – 5,25 (±0,79) $g_{malt}.L^{-1}$
- $Y_{X/malt}$ – 0,46 (±0,01) $g_{maltose}/g_{célula}$

Figura 5. 18 – Perfis de Biomassa (A) e Maltose (B) para o cultivo C16, ajustados pelo modelo proposto por Monod (1949)

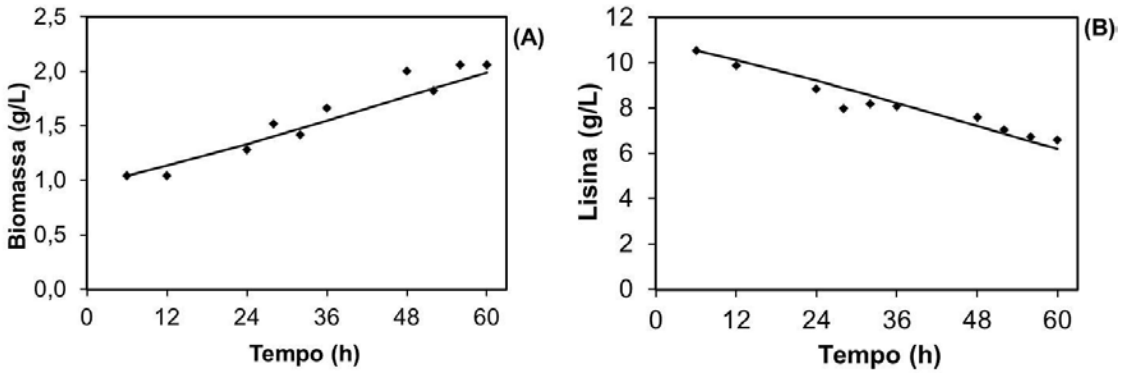


Paralelamente ao cultivo C16, outro experimento, C17, foi realizado com lisina como única fonte de C e N para verificar se *S. clavuligerus* crescia nesta condição em particular.

Novamente, utilizou-se o meio de inóculo contendo maltose, lisina e glutamato, descartando-se os dados até 6 horas de processo. Ao observar a Figura 5.19, nota-se que o micro-organismo cresceu, entretanto, menos do que em maltose com fonte de C. O modelo proposto por Monod (1949) ajustou-se a estes dados também, obtendo os seguintes valores para:

- $\mu_{máx\ L}$ – 0,080 (±0,019) h^{-1}
- $K_{s\ L}$ – 47,57 (±5,70) $g_{lis}.L^{-1}$
- $Y_{X/lis}$ – 0,21 (±0,02) $g_{lisina}/g_{célula}$

Figura 5. 19 - Perfis de Biomassa (A) e Lisina (B) para o cultivo C17, ajustados pelo modelo proposto por Monod et al. (1949)



Nas Figuras 5.18 e 5.19 é possível observar o bom ajuste do modelo aos dados obtidos. A utilização de lisina ou maltose como fonte de C sustentou o crescimento de *S. clavuligerus*, embora o rendimento a células no açúcar seja claramente maior. Além disso, a constante de saturação para o processo em lisina foi maior, indicando que a afinidade do micro-organismo é muito maior pela maltose. De uma maneira geral, açúcares são melhor metabolizados como fonte de C e energia, o que é condizente com os resultados obtidos. Todavia, lisina pode atuar como uma fonte secundária de C para *S. clavuligerus* e o modelo metabólico proposto para o estudo de fluxos deve levar este comportamento em consideração. Quando se compara o cultivo C16 com cultivos onde ambos compostos foram utilizados, C7 a C15, observa-se maior crescimento da biomassa em menor tempo nestes últimos. Comportamento semelhante foi observado por Wentzel et al. (2012), onde a combinação de um açúcar e um aminoácido mostrou-se mais eficiente em prover energia e precursores para a síntese celular de *Streptomyces coelicolor*.

5.5. Construção do modelo metabólico para *S. clavuligeurs*

5.5.1. Considerações gerais

Baseado em literatura de referência bioquímica, tais como livros, artigos e bases de dados, um modelo descrevendo apropriadamente o metabolismo de *S. clavuligerus* foi proposto. O modelo inicial era composto por 116 reações e 120 metabólitos. A simplificação deste modelo resultou em um mais compacto com 78 reações e 81 metabólitos, sendo 10 externos e 71 internos.

O modelo contempla 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. Ainda, estão propostas a síntese de CefC e AC (Figura 3.6). As vias de Entner-Doudoroff para glicólise e ciclo do glioxilato não foram relatadas para *S. clavuligerus* (BUSHELL et. al, 2006) e, portanto, não constam no modelo.

5.5.2. Metabolismo do C

Para todos os modelos maltose foi assumida como a fonte principal de C e energia. O transporte de maltose é realizado por uma bomba de hidrogênio, envolvendo o consumo de 1 ATP por molécula de açúcar e a excreção de um átomo de hidrogênio (VAN LEEUWEN et al., 1992; WESTHUIS et al., 1993). A oxidação completa deste açúcar, já descontado o custo para transporte, gera um total de 63 ATPs, o que equivale a 175 $milimols_{ATP}.g_{maltose}^{-1}$. O modelo utilizado também considera o uso de lisina como uma fonte de C auxiliar. O catabolismo da lisina foi proposto via cadaverina aminotransferase (CAT) conforme relatado na literatura (MADDURI et al., 1989; ANTONIO et al., 2012). Nesta via, a molécula do aminoácido é submetida a dois processos de descarboxilação, gerando duas moléculas de Acetil-coenzima A, as quais são metabolizadas através do ciclo de Krebs. A oxidação completa da lisina produz 32 ATPs, o que é igual a 175 $milimols_{ATP}.g_{lisinae}^{-1}$, ou seja, a mesma quantidade gerada pela oxidação de maltose. No modelo proposto, apenas estes dois compostos podem ser utilizados como fonte de C.

5.5.3. Metabolismo do N

O modelo contempla o crescimento em lisina ou NH_4^+ como fonte de N. Para crescimento em NH_4^+, a via de assimilação proposta foi a GS-GOGAT. No metabolismo de

lisina via cadaverina aminotransferase (CAT), todo N da lisina é transaminado para α-cetoglutarato, dando origem a glutamato. A eliminação do N foi proposta sob a forma de NH_3, por meio do catabolismo do glutamato ou do ciclo da uréia. No caso da eliminação via glutamato, este aminoácido é convertido em α-cetoglutarato e NH_3, e a energia liberada pela quebra da ligação é armazenada na coenzima reduzida NADPH. Por outro lado na eliminação de N por meio do ciclo da uréia ocorre uma descarboxilaçao com desperdício da energia de ligação e, portanto, durante os processos de simulação atenção deve ser tomada para evitar que este se torne um ciclo fútil. Apesar de incomum em procariotos, as enzimas responsáveis pela formação deste ciclo foram relatadas em *S. clavuligerus* (BASCARÁN et al., 1983; DE LA FUENTE et al., 1996)

5.5.4. Síntese da biomassa

A composição macromolecular da biomassa encontra-se descrita na Tabela 5.4. O teor de proteínas, RNA e DNA foi baseado em estudos desenvolvidos com *S. coelicolor* por Shahab et al. (1996). Quanto ao conteúdo de lipídeos, foram extraídas informações de Karandikar et al. (1997), que também estudaram *S. coelicolor*. Olukoshi et al. (1994) afirmaram que espécies de *Streptomyces* acumulam triacilgliceróis como fontes de C para a síntese de antibióticos, fato este que dá suporte à hipótese do presente trabalho do maior teor de lipídeos na composição celular. Por fim, assumiu-se que o restante da biomassa foi composto por carboidratos.

A proposição dos precursores necessários para síntese de proteínas (Tabela 5.5) e material genético (Tabela 5.6) foi baseada em Stephanopoulos et al. (1998). Para a composição de lipídeos, assumiu-se como ácido graxo médio o palmítico, com 16 átomos de C (BUSHELL et al., 2006). Por fim, considerou-se que a síntese de carboidratos presentes nas células foi derivada de monômeros de glicose menos uma molécula de água. Nestas condições, os teores de C e N na biomassa foram de 53,2% e 8,9%, respectivamente, correspondente a uma razão C:N de aproximadamente 6:1. Para o modelo metabólico proposto, deve-se considerar todos os coeficientes em base milimolar para a obtenção de 1 g de células, ou em base molar o resultado será 1000 g de células.

Tabela 5. 4 – Composição macromolecular da biomassa

Componente	Composição (% - massa/massa)	MM (g/gmol)	Coeficiente estequiométrico	mg/g biomassa
Proteína	45,6	109	4,187	456
RNA	9,8	323	0,303	98
Lipídeos	20,0	256	0,781	200
Carboidratos	20,2	162	1,247	202
DNA	4,4	310	0,142	44

Tabela 5. 5 - Composição da proteína média.

	Composição (% molar)
Alanina	9,6
Arginina	5,5
Asparagina	4,5
Aspartato	4,5
Cisteína	1,7
Glutamato	4,9
Glutamina	4,9
Glicina	11,5
Histidina	1,8
Isoleucina	5,4
Leucina	8,4
Lisina	6,4
Metionina	2,9
Fenialanina	3,5
Prolina	4,1
Serina	4,0
Treonina	4,7
Triptofano	1,1
Tirosina	2,6
Valina	7,9

Tabela 5. 6 – Composição do RNA e DNA.

RNA	
Base nitrogenada	**Composição (% molar)**
Adenosina	25,6
Uridina	26,2
Guanosina	28,6
Citidina	19,6
DNA	
Base nitrogenada	**Composição (% molar)**
Desoxiadenina	24,5
Desoxitimidina	25,5
Desoxiguanidina	24,5
Desoxicitidina	25,5

5.5.5. Reações do modelo metabólico

A seguir encontram-se listadas todas as reações do modelo simplificado que foi construído. As equações estão balanceadas apenas para C, N, oxigênio e energia, sendo que demais constituintes tais como Fósforo, Hidrogênio e H_2O foram omitidos. As letras I e R à frente das reações indicam se a reação é reversível ou irreversível

METABOLISMO DE *S. CLAVULIGERUS*

Reação	CATABOLISMO DO ACETATO	Rev/Irrev
0	Acetato + ATP = Acetil-Coa + AMP	**I**
	CATABOLISMO DO GLUTAMATO	
1	Glutamato + NADP = α-cetoglutarato + NADPH + NH3	**I**
	VIA GLICOLÍTICA	
2	Maltose + 3 ATP = 2 Glicose-6-P + 3 ADP	**I**
3	Glicose-6-P = Frutose-6-P	**R**
4	Frutose-6-P + ATP = ADP + 2 Gliceraldeído-3P	**I**
5	Gliceraldeído-3-P + NAD + ADP = Fosfoenolpiruvato + NADH + ATP	**R**
6	Fosfoenolpiruvato + ADP = Piruvato + ATP	**I**
7	Piruvato + NAD = NADH + CO2 + Acetil-CoA	**I**
	VIA DAS PENTOSES-FOSFATO	
8	Glicose-6-P + 2 NADP = Ribulose-5-P + CO2 + 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-cetoglutarato + CO2 + NADPH	**I**
14	α-cetoglutarato + NAD = Succinil-CoA + NADH + CO2	**I**
15	Succinil-CoA + GDP = Succinato + GTP	**R**
16	Succinato + FAD = Fumarato + FADH2	**R**
17	Fumarato + NAD = Oxaloacetato + NADH	**R**
	REAÇÃO ANAPLERÓTICA	
18	Fosfoenolpiruvato + CO2 = oxaloacetato	**I**

	BIOSSÍNTESE DE AMINOÁCIDOS	
	Lisina	
19	Aspartato-4-semialdeído + Glutamato + Piruvato + Succinil-COA + NADPH = Lisina + α-cetoglutarato + Succinato + NADP + CO2	**I**
	Glutamina	
20	Glutamato + NH3 + ATP = Glutamina + ADP	**I**
	Aspartato	
21	Oxaloacetato + Glutamato = Aspartato + α-cetoglutarato	**I**
	Asparagina	
22	Aspartato + Glutamina + ATP = Asparagina + Glutamato + ADP	**I**
	Serina	
23	Gliceraldeído-3-P + Glutamato + NAD = Serina + α-cetoglutarato + NADH	**I**
	Arginina	
24	2 Glutamato + Acetil-COA + ATP + NADPH = Ornitina+ ADP + NADP + Acetato + α-cetoglutarato	**I**
25	2 ATP + CO2 + Glutamina = Carbamoil-P + 2 ADP + Glutamato	**I**
26	Ornitina + Carbamoil-P + Aspartato+ ATP = Arginina + Fumarato + AMP	**I**
	CICLO DA URÉIA	
27	Arginina = Ornitina + Uréia	**I**
28	Uréia = 2 NH3 + CO_2	**I**
	Treonina e Metionina	
29	Aspartato + ATP + NADPH = Aspartato-4-semialdeído + ADP + NADP	**I**
30	Homoserina + ATP = Treonina + ADP	**I**
31	Homoserina + Succinil-COA+ Cisteína +N5-metiltetrahidrofolato = Metionina + Succinato + Piruvato + Tetrahidrofolato + NH3	**I**
	Isoleucina	
32	Treonina + Piruvato + NADPH + Glutamato = Isoleucina + α-cetoglutarato + NADP + CO2 + NH3	**I**
	Leucina e Valina	
33	2 Piruvato + NADPH = α-cetoisovalerato + CO2 + NADP	**I**
34	α-cetoisovalerato + Acetil-CoA+ Glutamato + NAD = Leucina + α-cetoglutarato + CO2 + NADH	**I**
35	α-cetoisovalerato + Glutamato = Valina + α-cetoglutarato	**I**
	Fenilalanina, Tirosina e Triptofano	
36	2 Fosfoenolpiruvato + Eritrose-4-P + NADPH + ATP = Corismato + ADP + NADP	**I**
37	Corismato + Glutamato = Fenilalanina + α-cetoglutarato + CO2	**I**
38	Corismato + Glutamato + NAD = Tirosina + α-cetoglutarato + CO2 + NADH	**I**

39	Corismato + Glutamina + Fosforribosilpirofosfato + Serina = Triptofano + CO2 + Gliceraldeído-3-P + Glutamato + Piruvato	**I**
	Prolina	
40	Glutamato + ATP + 2 NADPH = Prolina + ADP + 2 NADP	**I**
	Alanina	
41	Piruvato + Glutamato = Alanina + α-cetoglutarato	**I**
	Glicina	
42	Serina + Tetrahidrofolato = Glicina + N5-N10-Metilenotetrahidrofolato	**I**
	Cisteína	
43	Serina + Acetil-COA + 4 NADPH + 2 ATP = Cisteína + Acetato+ 4 NADP + ADP + AMP	**I**
	Histidina	
44	Ribose-5P + ATP = Fosforribosilpirofosfato + AMP	**I**
45	Fosforibosilpirofosfato + ATP + Glutamina + 2 NAD = Histidina + α-cetoglutarato + AICAR + 2NADH	**I**
	ENERGIA DE MANUTENÇÃO	
46	ATP = ADP + ENERGIA DE MANUTENÇÃO	**I**
	BIOSSÍNTESE DE UNIDADES C1	
47	Tetraidrofolato + CO2 + 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 + CO2	**I**
	BIOSSÍNTESE DE BASE NITROGENADAS	
	Adenina, Guanina, Desoxiadenina e Desoxiguanina	
51	Fosforribosilpirofosfato + 2 Glutamina + Aspartato + CO2 + 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**

	Uridina, Citidina, desoxicitidina e desoxitimina	
59	Aspartato + Carbamoil-P + Fosforribosilpirofosfato + 2 ATP + NAD = UTP + CO2 + 2 ADP + NADH	**I**
60	UTP + ATP + Glutamina = CTP + ADP + Glutamato	**I**
61	CTP + NADPH = dCTP + NADP	**I**
62	UTP +2 NADPH + N5,N10-Metilenotetraidrofolato + 2 ATP = dTTP + 2 NADP + Tetraidrofolato + 2 ADP	**I**
	BIOSSÍNTESE DE CARBOIDRATOS	
63	Glicose-6-P + ATP = CARBOIDRATO + ADP	**I**
	Nota:CARBOIDRATO equivale a 162 g/gmol	
	BIOSSÍNTESE DE LIPÍDEOS	
64	8 Acetil-COA + 7 ATP + 14 NADPH = LIPÍDEO + 7 ADP + 14 NADP	**I**
	Nota: LÍPÍDEO (PALMITATO) equivale a 256 g/gmol	
	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	**I**
	Nota: PROTEÍNA equivale a 108,9 g/gmol	
	BIOSSÍNTESE DE RNA	
66	0,256 ATP + 0,262 UTP + 0,286 GTP + 0,196 CTP + 0,4 ATP = RNA + 0,4 ADP	**I**
	Nota: RNA equivale a 323 g/gmol	
	BIOSÍNTESE DE DNA	
67	0,245 dATP + 0,245 dTTP + 0,255 dGTP + 0,255 dCTP + 1,4 ATP = DNA + 1,4 ADP	**I**
	Nota: DNA equivale a 310 g/gmol	

	BIOSSÍNTESE DE CEFAMICINA C	
68	Lisina + NAD + Cisteína + Valina + 4 α-cetoglutarato + Carbamoil-P + N5-Metiltetraidrofolato + 5 ATP + 4 O_2 = **CEFAMICINA C** + Glutamato + 3 Succinato + Tetraidrofolato + 4 AMP + ADP + NADH + 3 CO_2	**I**
	BIOSSÍNTESE DE ÁCIDO CLAVULÂNICO	
69	Arginina + Gliceraldeído-3-P + ATP + 3 α-cetoglutarato + NADPH + 3 O2 = **ÁCIDO CLAVULÂNICO** + AMP + 3 CO_2 + 3 Succinato + Uréia + NADP + NH3	**I**
	BIOMASSA	
	Considerando: 45,6 % Proteína **9,8 % RNA** **20,0% Lipídeos** **20,2 % Carboidratos** **4,4 % DNA**	
70	4,187 PROTEÍNA + 0,303 RNA + 0,781 LIPÍDEO + 1,247 CARBOIDRATO + 0,142 DNA = **BIOMASSA (g)**	**I**
	REAÇÕES PARA CONVERSÃO DE COENZIMAS REDUZIDAS EM ATP	
71	FADH2 + 1,5 ADP + 0,5 O2 = FAD + 1,5 ATP	**I**
72	NADH + 2,5 ADP + 0,5 O2 = NAD +2,5 ATP	**I**
73	NADPH + 2,5 ADP + 0,5 O2 = NADP + 2,5 ATP	**I**
	REAÇÃO COMPLEMENTAR SÍNTESE DE LISINA	
74	Aspartato-4-semialdeído + NADPH = Homoserina + NADP	**I**
	CATABOLISMO DA LISINA	
75	Lisina + 2 α-cetoglutarato + 3 NAD + FAD + ATP = 2 Glutamato + 2 Acetil-COA + 2 CO2 + FADH2 + 3 NADH+ ADP	**I**
	REAÇÃO GOGAT	
76	Glutamina + α-cetoglutarato + NADPH = 2 Glutamato + NADP	**I**
	TRANSPORTE LISINA	
77	Lisinae + ATP = Lisina + ADP	**I**

5.6. Estudo de fluxos metabólicos

A quantidade de C, N e O na entrada do programa (na forma de substratos) deve ser igual à quantidade destes elementos na saída do programa (na forma de produtos), de forma a garantir que não existam erros quanto à estequiometria do modelo. Este parâmetro foi verificado para validar o modelo proposto.

Para o estudo de fluxos metabólicos utilizou-se como base de cálculo 100 mmols de maltose, com a finalidade de proporcionar uma visualização mais apropriada das distribuições dos fluxos.

5.6.1. Distribuição de fluxos considerando maltose como única fonte de C

No primeiro processo de simulação foi estabelecido como função objetivo a maximização do valor de biomassa para que pudesse ser calculado o máximo rendimento de maltose a células, assumindo NH_4^+ como fonte de N. Trata-se apenas de um cálculo teórico, onde o máximo da fonte de C é direcionado à construção de células em detrimento da produção de biocompostos de interesse e até mesmo da manutenção celular. A solução obtida para tal função objetivo foi denominada Solução 1 e encontra-se exposta abaixo.

Solução 1: 100,000 Maltose + 144,320 NH_4^+ + 217,067 O_2 --> 290,801 Energia + 19,442 Biomassa + 338,407 CO_2
Função objetivo: Maximização da biomassa

Como pode ser visto na Solução 1, para cada 100 mmols de maltose consumidos ocorre a formação de 19,4 g de biomassa. Deve-se lembrar de que, considerando-se os coeficientes estequiométricos em base mmolar, o valor de biomassa é obtido em gramas. Portanto temos que:
- assumindo a massa molecular da maltose como 360 $g.gmol^{-1}$ (considerando-se que maltose hidratada foi utilizada como reagente)
- 100 mmol de maltose = 36 g

$Y_{X/S\ máx} = 19,4\ g\ /36\ g$
$\mathbf{Y_{X/S\ máx} = 0,54\ g.g^{-1}}$

O valor de $Y_{x/s}$ para os dados obtidos no cultivo C16, onde maltose e NH_4Cl foram as fontes de C e N, respectivamente, foi estimado em 0,46. Nota-se que entre o valor teórico, calculado pelo modelo, e o valor real, existe uma diferença, provavelmente porque parte do C foi direcionado para produtos, tais como proteínas e antibióticos, bem como para a manutenção celular. Porém, ambos os valores de rendimento a células, real e teórico, estão próximos, indicando a adequação do modelo ao metabolismo de *S. clavuligerus*.

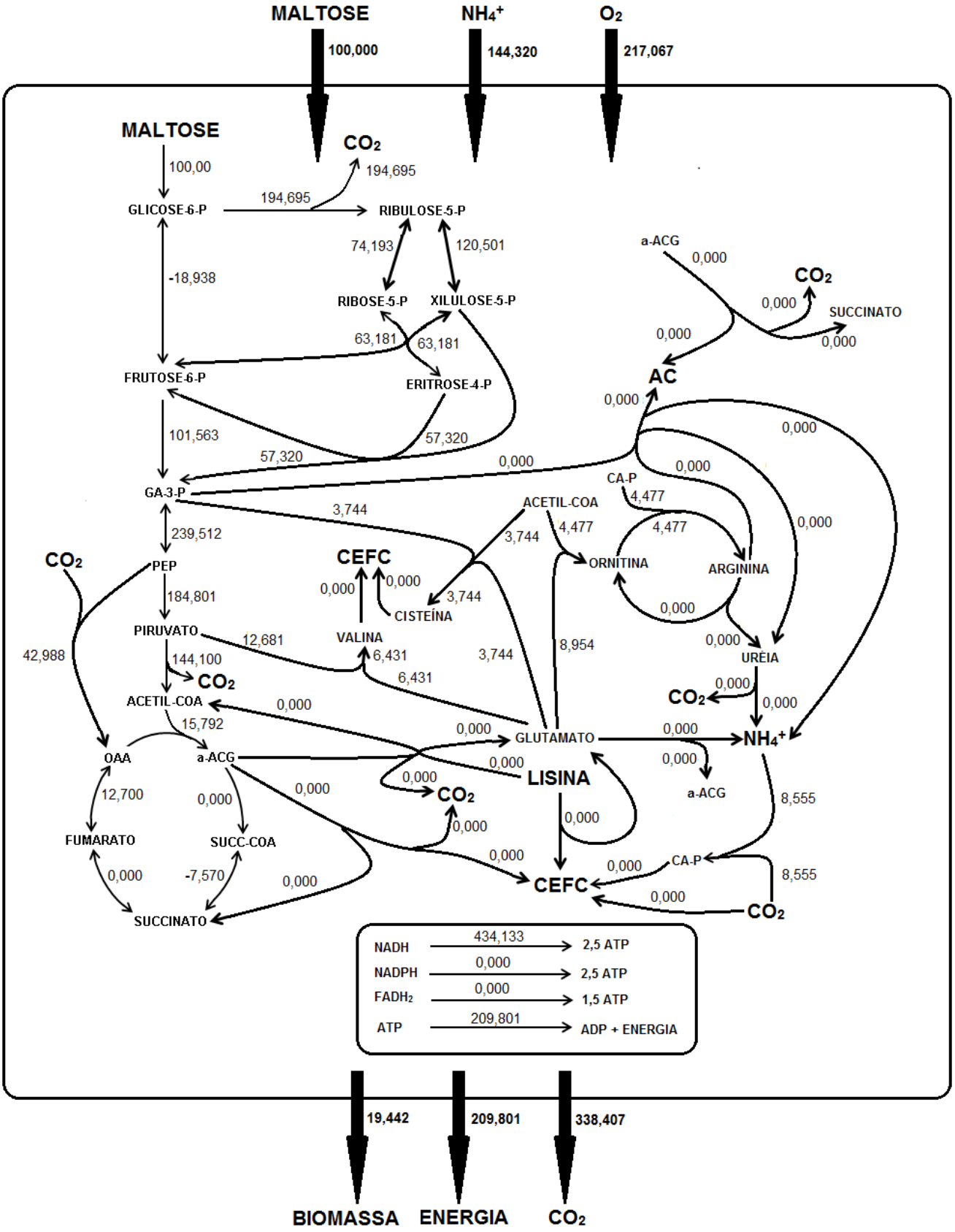
A distribuição dos principais fluxos no processo de simulação visando ao máximo rendimento celular é apresentada na Figura 5.20. Ainda, os dados de biomassa e consumo de maltose obtidos no cultivo C16 foram utilizados como dados de restrição para outro processo de simulação, apresentado na Figura 5.21. A função objetivo estabelecida para esta segunda simulação foi a maximização da produção de energia, que deve ser interpretada como a energia liberada na quebra de uma molécula de ATP em ADP. Desta forma, assumiu-se que todo o C não direcionado à síntese celular fosse oxidado para a produção de energia.

Observa-se claramente que a via das pentoses-fosfato é muito ativa em ambas as distribuições, pois esta via produz NADPH, coenzima importante nas vias anabólicas de formação de componentes direcionados ao crescimento celular. Por outro lado, no Ciclo de Krebs, o fluxo é menor, indicando que a produção de energia foi desfavorecida em função do crescimento. Para um máximo rendimento celular, esta via metabólica deixou de funcionar como um ciclo, permanecendo apenas algumas reações. A partir dos dados reais e dos obtidos por meio do processo de simulação (Solução 2) para o cultivo C16, foi possível estimar o consumo energético médio de 1,9 mmol de $ATP.g_{célula}^{-1}.h^{-1}$. Este valor foi obtido tendo como função objetivo a maximização da energia de manutenção e assumindo que biomassa e energia são os únicos produtos resultantes de maltose, ou seja, é o valor máximo para energia de manutenção.

Solução 2: 100,000 Maltose + 124,085 NH_4^+ + 354,881 O_2 -->1144,550 Energia + 16,716 Biomassa + 459,208 CO_2

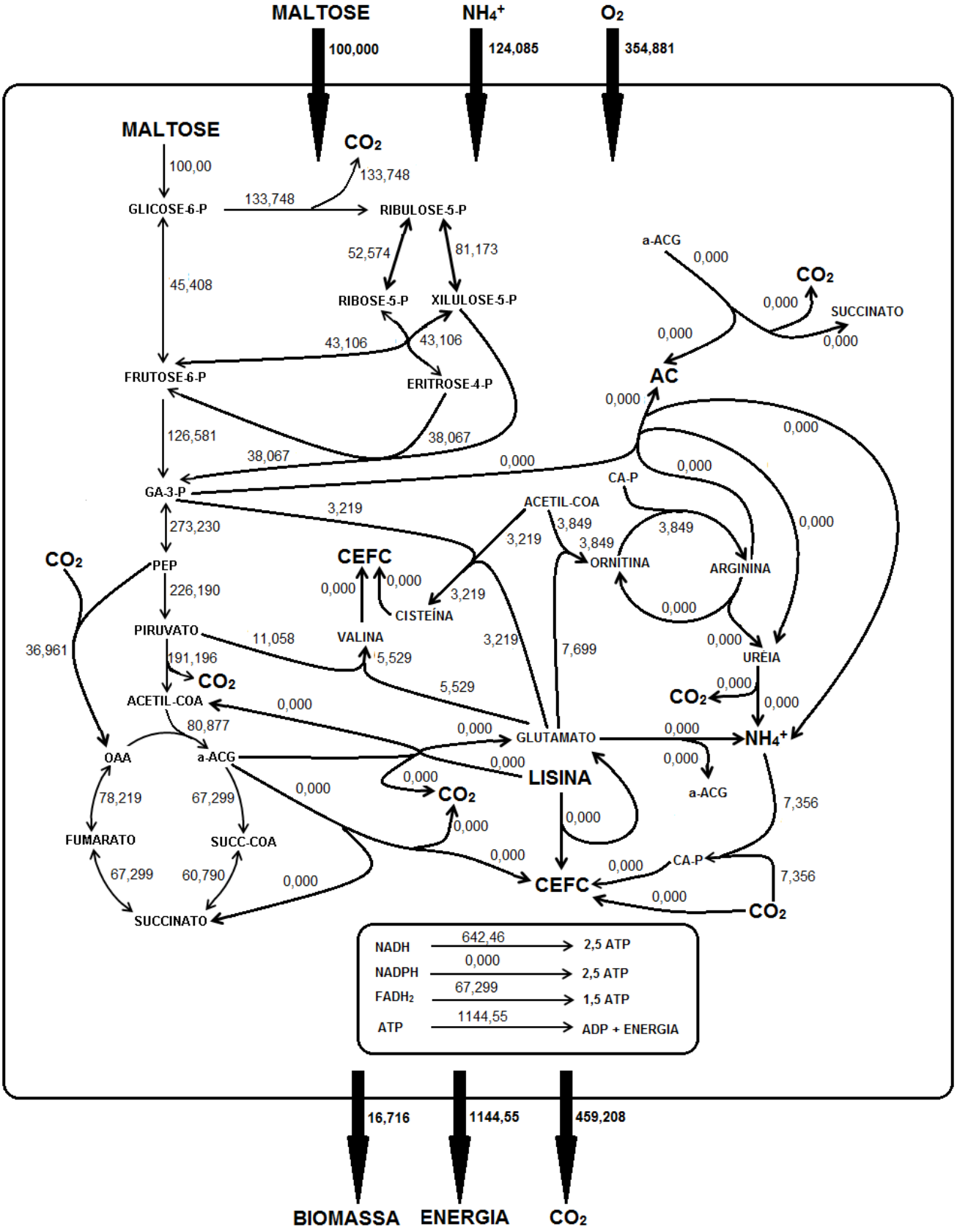
Função objetivo: Maximização da energia

Figura 5. 20 - Mapa de distribuição dos principais fluxos objetivando maximização da biomassa.



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

Figura 5. 21 - Mapa de distribuição dos principais fluxos no cultivo C16.


MALTOSE
NH4+
O2
100,000
124,085
354,881
MALTOSE
100,00
CO2
133,748
GLICOSE-6-P
133,748
RIBULOSE-5-P
52,574
81,173
45,408
RIBOSE-5-P
XILULOSE-5-P
43,106
43,106
FRUTOSE-6-P
ERITROSE-4-P
126,581
38,067
38,067
GA-3-P
273,230
PEP
226,190
PIRUVATO
36,961
191,196
CO2
ACETIL-COA
80,877
OAA
a-ACG
78,219
67,299
FUMARATO
SUCC-COA
67,299
60,790
SUCCINATO
CEFC
0,000
0,000
CISTEÍNA
VALINA
11,058
5,529
3,219
3,219
ACETIL-COA
3,849
3,849
3,219
ORNITINA
3,849
ARGININA
0,000
0,000
UREIA
CA-P
0,000
0,000
0,000

5.6.2. Distribuição de fluxos no cultivo C14

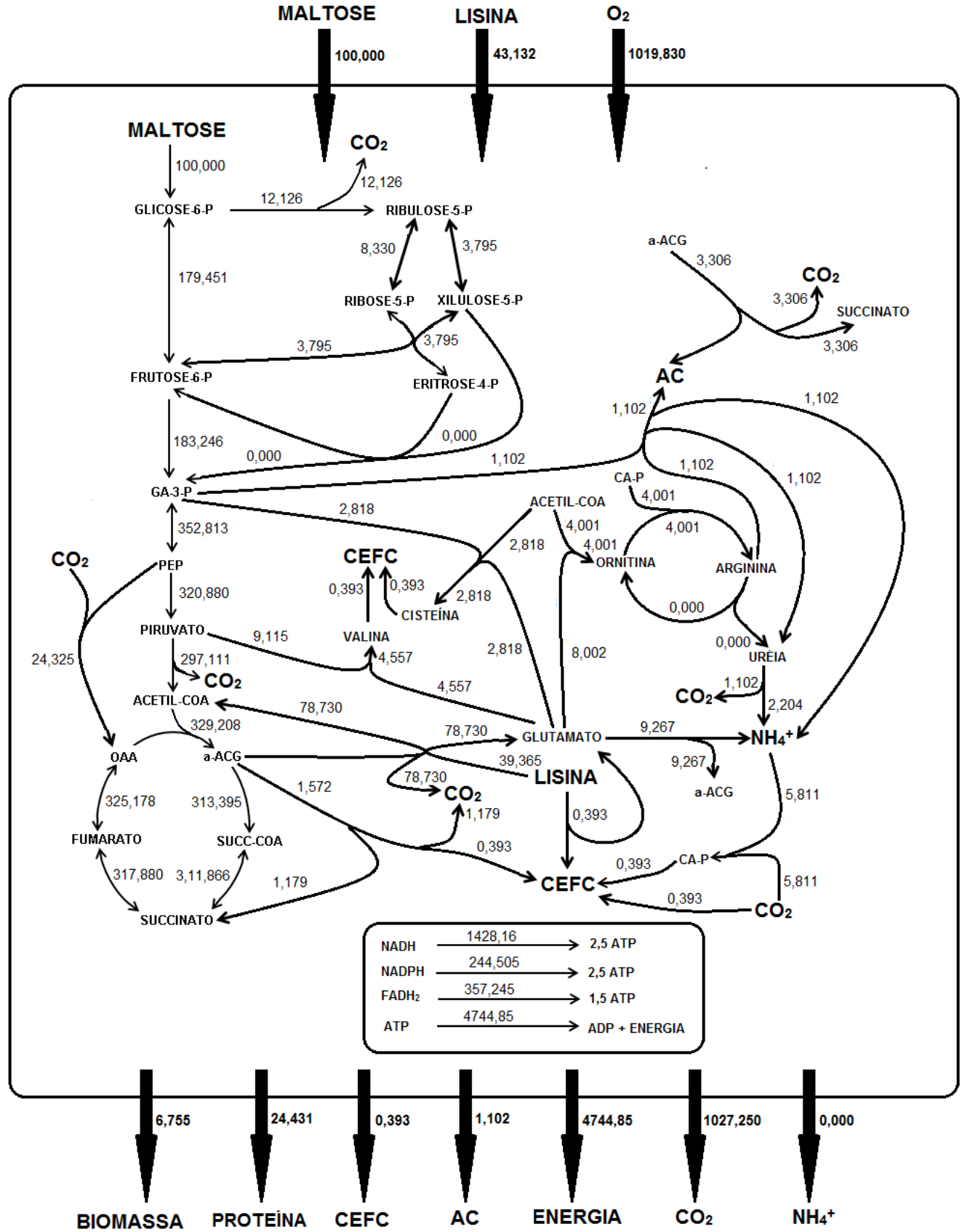
Os dados de consumo de substratos e formação de produtos obtidos durante o período alimentado do cultivo C14 (D=0,012 h^{-1}) foram utilizados para simular o modelo metabólico, com base nas médias de velocidades específicas entre 72 e 120 horas, período no qual se observou maior estabilidade da concentração celular (Tabela 5.7).

Tabela 5. 7 – Cultivo C14: Médias de velocidades específicas e valores de fluxos normalizados.

Metabólito	Velocidade		Fluxo normalizado
	$mg.g_{célula}^{-1}.h^{-1}$	$mmol.g_{célula}^{-1}.h^{-1}$	
Maltose	63,24	0,1757	100,000
Lisina	13,84	0,0758	43,132
Biomassa	11,87	0,0119	6,755
CefC	0,31	0,0007	0,393
AC	0,39	0,0019	1,102

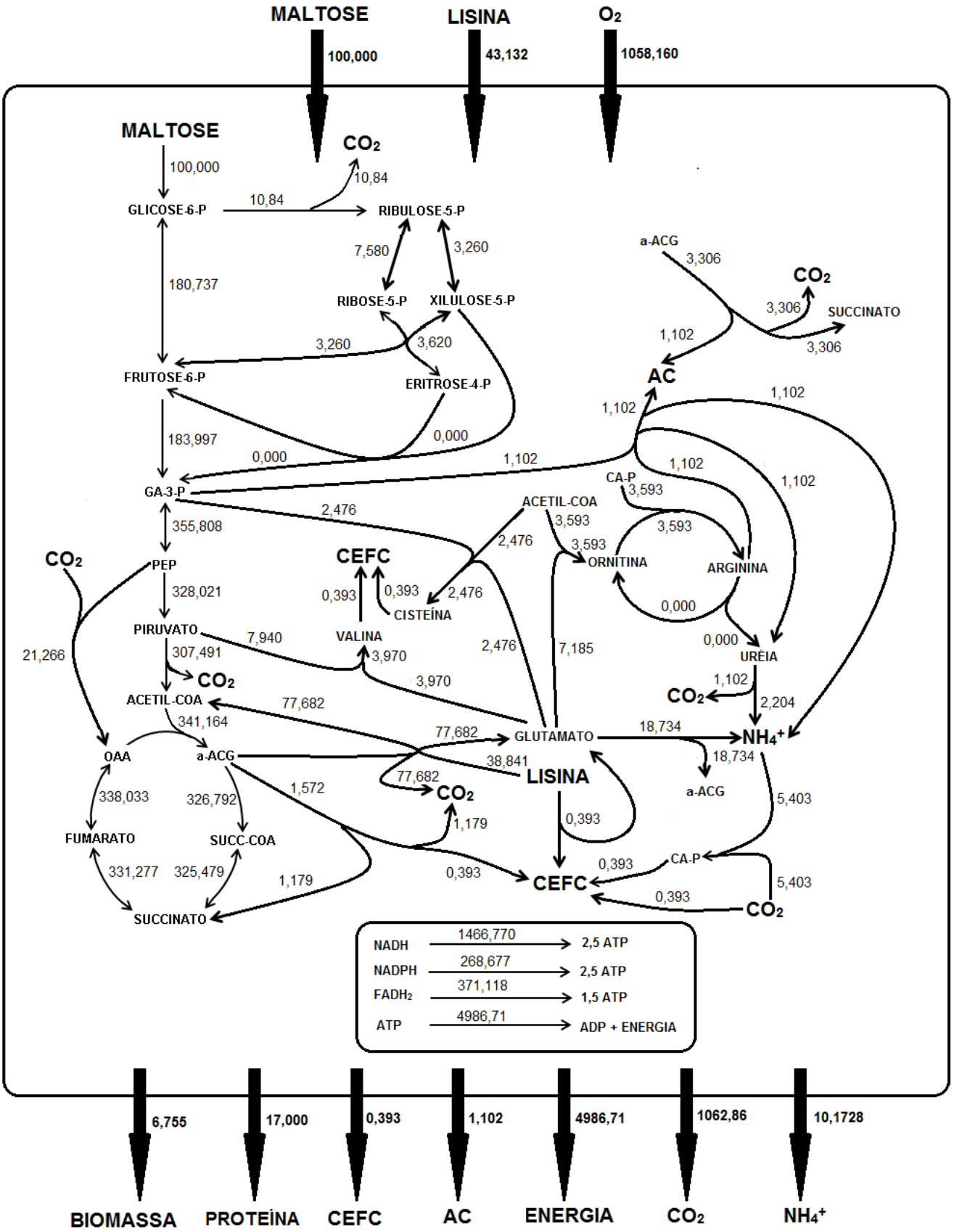
Como não havia dados da concentração de proteína extracelular para este cultivo, dois estudos de distribuição de fluxos foram realizados: um em que se maximizou a produção de produção de proteína (Solução 3) e um em que se restringiu um rendimento de proteína sobre maltose semelhante ao obtido no cultivo C15 (Solução 4). Nas duas distribuições de fluxos obtidas (Figuras 5.22 e 5.23) observou-se que a maior parte do C foi metabolizada através do ciclo de Krebs, ou seja, as fontes de C foram direcionadas para a produção de energia. De forma contrária, ocorreram baixos fluxos pela via das pentoses-fosfato, indicando menor produção de massa celular. A partir dos dados gerados pelas duas simulações do modelo metabólico calculou-se a demanda por O_2 em 1,79 mmol de $O_2.g^{-1}.h^{-1}$ para a solução com maximização da proteína extracelular, e em 1,86 mmol de $O_2.g^{-1}.h^{-1}$ para a condição com restrição na produção de proteína de acordo com C15. O custo de manutenção celular foi estimado em 8,3 mmol $ATP.g_{célula}^{-1}.h^{-1}$ e em 8,8 mmol $ATP.g_{célula}^{-1}.h^{-1}$ para as Soluções 3 e 4, respectivamente. A diferença entre estes dois cenários em termos de energia de manutenção e consumo de O_2 é pequena, indicando que o gasto energético para a produção de proteínas foi baixo. Portanto, ainda que os valores de produção de proteínas diferissem dos utilizados para as simulações realizadas, a demanda de O_2 e energia de manutenção permaneceria aproximadamente a mesma. Com relação ao metabolismo do N, os resultados das simulações indicaram que aumentos na produção de proteína implicariam em maior eficiência no aproveitamento deste elemento e menor excreção de íons amônio.

Figura 5. 22 - Mapa de distribuição dos principais fluxos no cultivo C14, maximizando a secreção de proteína.



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

Figura 5. 23 - Mapa de distribuição dos principais fluxos no cultivo C14, com secreção de proteína externa baseada em dados do cultivo C15



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

Solução 3: 100,000 Maltose + 43,132 Lisina + 1019,830 O_2 --> 4744,850 Energia + 6,755 Biomassa + 0,393 CefC + 1,102 AC + 24,431 Proteína+ 1027,250 CO_2

Função objetivo: Maximização da produção de proteína

Solução 4: 100,000 Maltose + 43,132 Lisina + 1058,160 O_2 --> 4986,710 Energia + 6,755 Biomassa + 0,393 CefC + 1,102 AC + 17,000 Proteína+ 10,173 NH_4^+ + 1062,860 CO_2

Função objetivo: Maximização da energia

5.6.3 Distribuição de fluxos no cultivo C15

No cultivo C15 (D=0,013 h^{-1}), além de todas as variáveis monitoradas no cultivo C14 foram medidas as concentrações de proteína no caldo e CO_2 na saída de gases do reator, possibilitando prever a distribuição de fluxos com maior precisão. Duas simulações foram realizadas: uma com dados obtidos antes da fase alimentada (Tabela 5.8) e outra na etapa de alimentação (Tabela 5.9). No caso da etapa exponencial de crescimento utilizaram-se as variações globais de consumo de substratos e de formação de produtos no período compreendido entre 22,5 e 43,5 horas; estratégia esta também utilizada por Goel et al. (2003). Para simular os dados da fase contínua utilizaram-se as médias de velocidade específica para cada um dos metabólitos, entre 72 horas e 120 horas. Novamente, todos os dados foram normalizados, com base de cálculo para a maltose de 100 mmols. Os resultados obtidos para dados da fase não alimentada estão apresentados na Solução 5 e na Figura 5.24, e os resultados para fase contínua encontram-se na Solução 6 e na Figura 5.25.

A demanda por O_2, calculada a partir dos resultados de simulação, foi estimada em 8,85 mmol de $O_2.g^{-1}.h^{-1}$ para a fase exponencial, valor muito próximo ao obtido por Baptista-Neto et al. (2000) que calcularam em 8 mmol de $O_2.g^{-1}.h^{-1}$ durante o crescimento de *S. clavuligerus*. Isto reforça a viabilidade do modelo, por meio do qual foi possível prever de forma muito precisa este parâmetro. Com os resultados de simulação, ainda foi possível estimar a demanda por O_2 durante a fase contínua em 1,33 mmol de $O_2.g^{-1}.h^{-1}$. O valor elevado durante a fase exponencial é justificado pela alta necessidade energética para síntese de células. Os fluxos direcionados à produção de biomassa sofreram uma redução de 50% na passagem da fase exponencial para a contínua, como se observa por meio das Figuras 5.24 e 5.25, respectivamente. Comparando-se a fase estacionária deste cultivo com a do C14, observa-se um aumento de 41% dos fluxos direcionados à biomassa em C15. Como já discutido anteriormente, este cultivo parece ter sido mais eficiente na conversão de produtos em substratos, uma vez que foi alimentado com meio completo. Além disto, observou-se um

aumento na velocidade específica de consumo de lisina da ordem de 15 % em C15, sugerindo que este conjunto de fatores tenha melhorado a conversão de maltose em biomassa.

Analisando-se os fluxos pela via das pentoses-fosfato nas fases de pré-alimentação e contínua do cultivo C15, observa-se que houve uma redução de aproximadamente 60% durante esta última. Isto porque na fase de crescimento, como esperado, a demanda por precursores para síntese de biomassa, principalmente NADPH, é maior (figuras 5.24 e 5.25). Entretanto, os fluxos por esta via do cultivo em batelada C16, contendo maltose como única fonte de C (Figura 5. 21), foram cerca de 400% superiores aos da fase exponencial de C15. Provavelmente o consumo de lisina em C15, gerando elevada concentração de Acetil-CoA, ativou o ciclo de Krebs, o qual também pode atuar fornecendo NADPH por meio da conversão de isocitrato em α-cetoglutarato. Embora existam duas formas da enzima isocitrato desidrogenase que catalisa esta reação, uma NAD+ dependente e uma NADP+ dependente, o modelo metabólico para *S. clavuligerus* considerou a segunda forma, baseando-se em um estudo com *Streptomyces avermitlis* (WANG et al., 2011).

Os fluxos através do ciclo de Krebs aumentaram em torno de 50% na fase contínua em relação à exponencial. Embora tenha ocorrido aumento da atividade deste ciclo, não houve grande variação de energia direcionada à manutenção celular, que foi calculada em 6,3 mmol $ATP.g_{célula}^{-1}.h^{-1}$ para a fase exponencial e em 6,0 mmol $ATP.g_{célula}^{-1}.h^{-1}$ para a fase alimentada. Segundo dados coletados por Stephanopoulos et. al., (1998) (pg. 74) a energia de manutenção pode sofrer uma variação muito ampla entre organismos e depende de condições do cultivo. Estes autores citam valores de 1 a 18,9 mmols de $ATP.g^{-1}_{célula}.h^{-1}$, suportando, assim, ao dados obtidos neste trabalho. Em C14, quando se considerou rendimento máximo da produção de proteínas, o valor estimado para manutenção celular foi 38% superior ao obtido em C15. Ainda, para um rendimento de proteína em C14 semelhante ao obtido em C15, a necessidade energética seria 46% superior. Mais uma vez observou-se maior eficiência em C15, onde a demanda energética para manutenção foi menor. Ainda, o valor máximo estimado para energia de manutenção em C16 foi de 1,9 mmol $ATP.g_{célula}^{-1}.h^{-1}$, ou seja, bem inferior aos obtidos nos cultivos com maltose e lisina como fontes de C. Este foi um comportamento interessante, pois esperava-se que no meio com duas fontes de C o gasto energético fosse menor, já que se trata de um meio que poderia suprir de forma mais eficiente as necessidades de C da célula. Talvez a maior velocidade de crescimento em C15 tenha resultado em maior necessidade energética quando comparado ao cultivo C16.

Com relação aos fluxos para CefC em C15, poucas alterações ocorreram entre a fase exponencial e a fase contínua. Contudo, ao analisar os fluxos para AC, observou-se um

aumento de aproximadamente 20% durante a fase contínua. Os rendimentos de bioativos obtidos em C15 foram maiores quando comparados ao cultivo C14, uma vez que se observaram aumentos médios nos fluxos para CefC e AC de 52% e 93%, respectivamente. De um modo geral, o cultivo em C15 foi mais eficiente tanto do ponto de vista do metabolismo primário como do metabolismo secundário, uma vez que houve maior conversão de substratos em produtos associada a uma menor demanda energética.

A partir dos dados obtidos em C15, um balanço de C foi realizado para avaliar a relação entre a entrada de C na forma de substratos e a saída na forma de produtos. Para a fase exponencial, esta relação foi de 91,5% e, para a fase contínua, de 86,2%. Acredita-se que durante a fase contínua a presença de produtos de degradação, de metabólitos secundários e de carboidratos extracelulares foi responsável pela diferença encontrada entre a entrada e a saída de C.

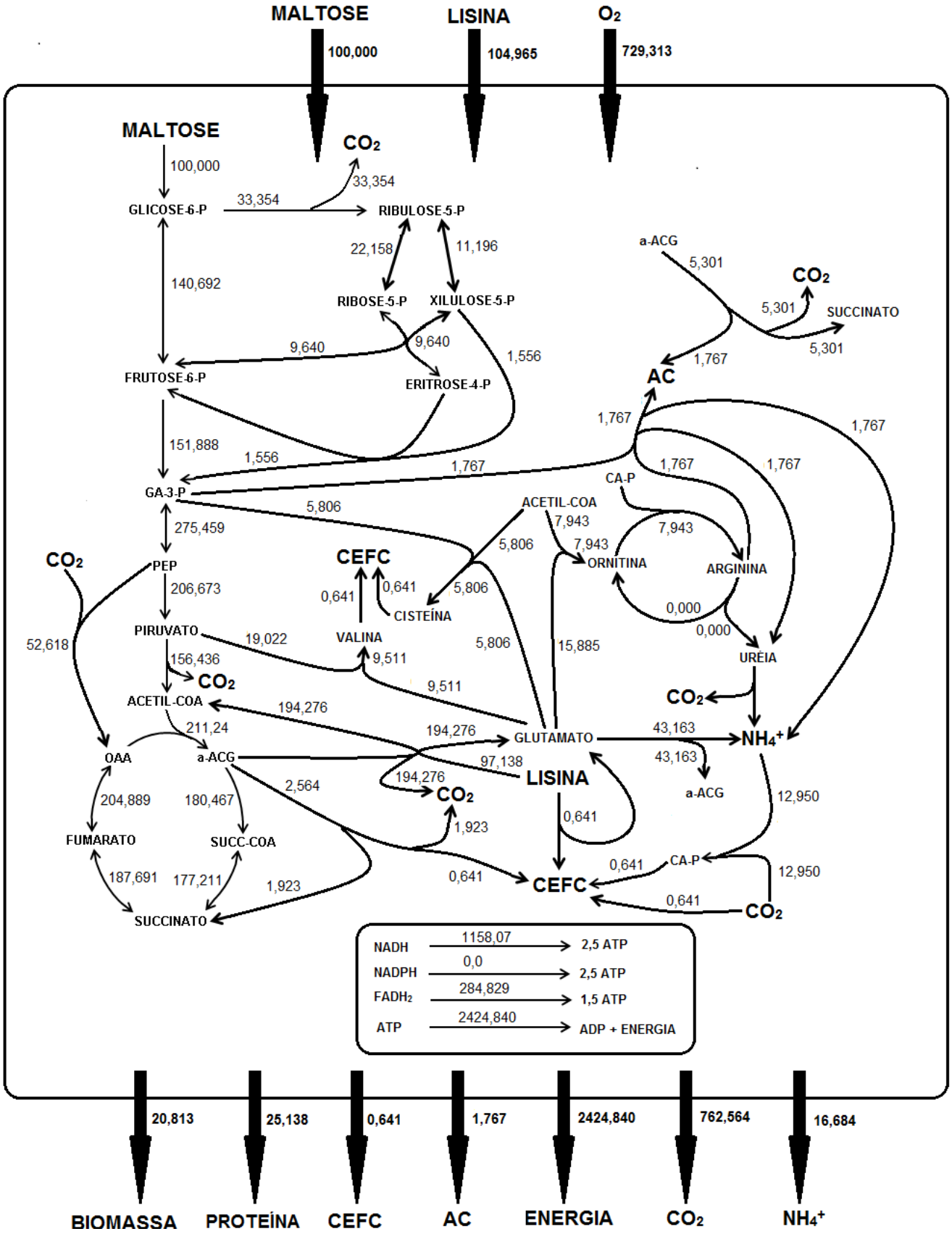
Tabela 5. 8 – Variações globais de consumo de substratos e formações de produtos durante a fase exponencial do cultivo C15

Metabólito	Variação global			Fluxo normalizado
	$g.L^{-1}$	$mmol.L^{-1}$	g de $C.L^{-1}$	
Maltose	7,68	21,333	3,072	100,000
Lisina	4,09	22,393	1,611	104,965
Biomassa	4,44	4,440	2,361	20,813
CefC	0,061	0,137	0,026	0,641
AC	0,075	0,377	0,036	1,767
Proteína	0,584	5,363	0,308	25,138
CO_2	5,68	129,182	1,551	605,540

Tabela 5. 9 – Média das velocidades específicas de consumo de substratos e formações de produtos durante a fase contínua do cultivo C15

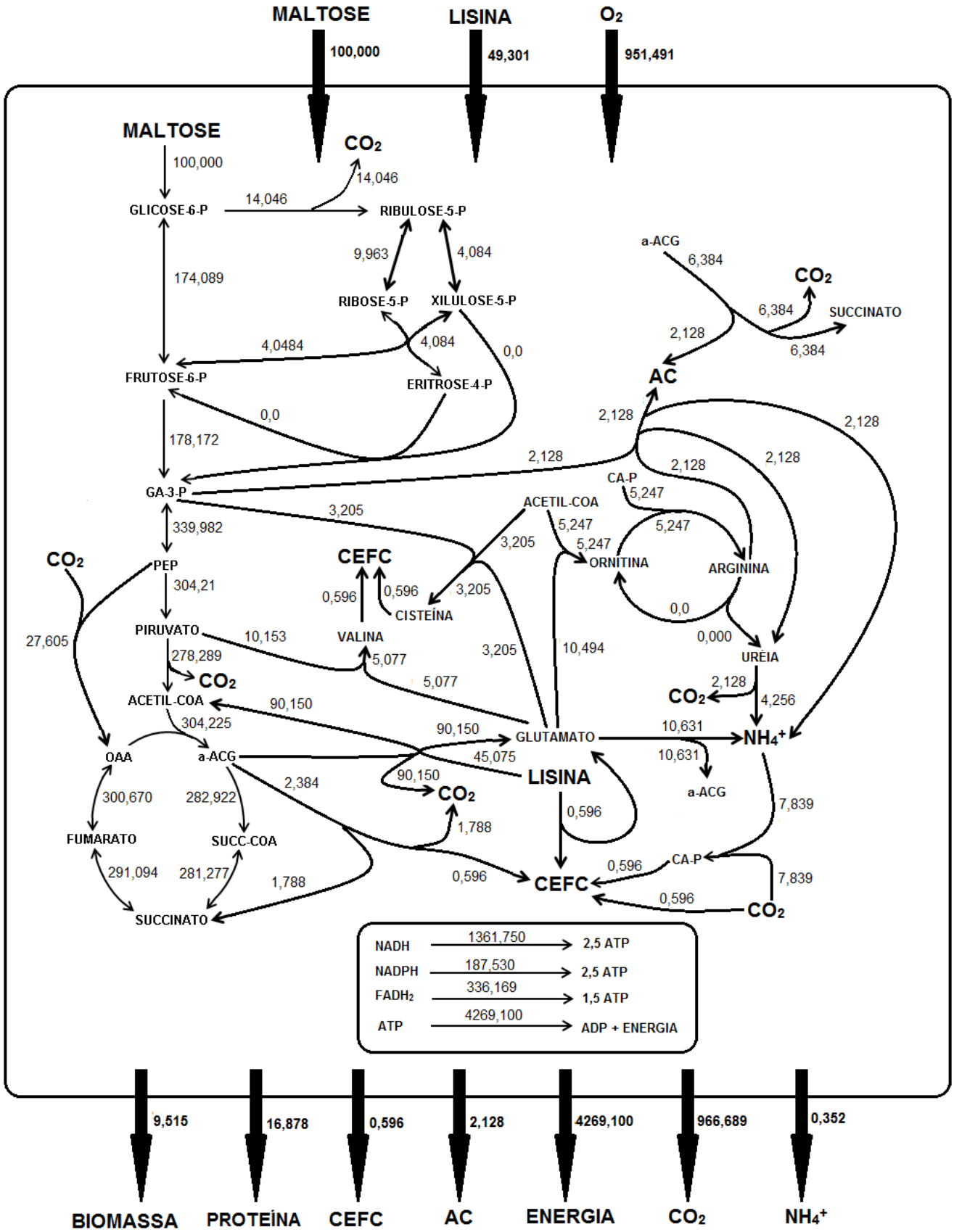
Metabólito	Velocidade			Fluxo normalizado
	$mg.g_{célula}^{-1}.h^{-1}$	$mmol.g_{célula}^{-1}.h^{-1}$	mg de $C.g_{célula}^{-1}.h^{-1}$	
Maltose	50,421	0,140	20,168	100,000
Lisina	12,612	0,069	4,969	49,301
Biomassa	13,327	0,013	7,089	9,515
CefC	0,372	0,001	0,160	0,596
AC	0,593	0,003	0,286	2,128
Proteína	2,574	0,024	1,359	16,878
CO_2	46,763	1,063	12,766	758,829

Figura 5. 24 - Mapa de distribuição dos principais fluxos durante a fase exponencial do cultivo C15.



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

Figura 5. 25 - Mapa de distribuição dos principais fluxos durante a fase contínua do cultivo C15



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

Solução 5: 100,000 Maltose + 104,965 Lisina + 729,313 O_2 --> 2424,840 Energia + 20,813 Biomassa + 0,641 CefC + 1,767 AC + 25,138 Proteína + 16,684 NH_4^+ + 762,564 CO_2
Função objetivo: Maximização da energia

Solução 6: 100,000 Maltose + 49,301 Lisina + 951,491 O_2 --> 4269,100 Energia + 9,515 Biomassa + 0,596 CefC + 2,128 AC + 16,878 Proteína + 0,352 NH_4^+ + 966,689 CO_2
Função objetivo: Maximização da energia

5.6.4. Distribuição de fluxos visando aumento da produção de CefC

Baseado nos dados de consumo de maltose e lisina obtidos na fase contínua de C15, um novo processo de simulação visando aumentos nos rendimentos de produção de CefC foi realizado (Solução 7 e Figura 5.26). Para isto utilizaram-se algumas das ferramentas para melhoria de linhagens (*in silico*) disponíveis no programa Optflux. O objetivo foi vislumbrar possibilidades de alteração no metabolismo, sejam elas por meio de engenharia genética ou manipulações no bioprocesso, em busca do aumento da produção de CefC. Por meio desta simulação foi previsto um aumento de 920% no rendimento de CefC em relação ao obtido em C15, acompanhado de uma redução de 26% no crescimento. Não foram observadas diferenças significativas com relação à produção de proteínas e de energia. No entanto, na solução obtida não houve excreção de N sob a forma de amônio. Com uso de tais ferramentas de simulação, uma lista de reações que deveriam ter seus fluxos zerados foi criada:

- **19** - Aspartato-4-semialdeído + Glutamato + Piruvato + Succinil-COA + NADPH = Lisina + α-cetoglutarato + Succinato + NADP + CO_2
- **27** - Arginina = Ornitina + Uréia
- **28** - Uréia = 2 NH_3 + CO_2
- **48** - N-10-Formiltetraidrofolato + NADPH = N5,N10-Metilenotetraidrofolato + NADP
- **50** - N-10-Formiltetraidrofolato + NADP = Tetraidrofolato + NADPH + CO_2
- **69** - Arginina + Gliceraldeído-3-P + ATP + 3 α-cetoglutarato + NADPH + 3 O_2 = ÁCIDO CLAVULÂNICO + AMP + 3 CO_2 + 3 Succinato + Uréia + NADP + NH_3
- **76** - Glutamina + α-cetoglutarato + NADPH = 2 Glutamato + NADP

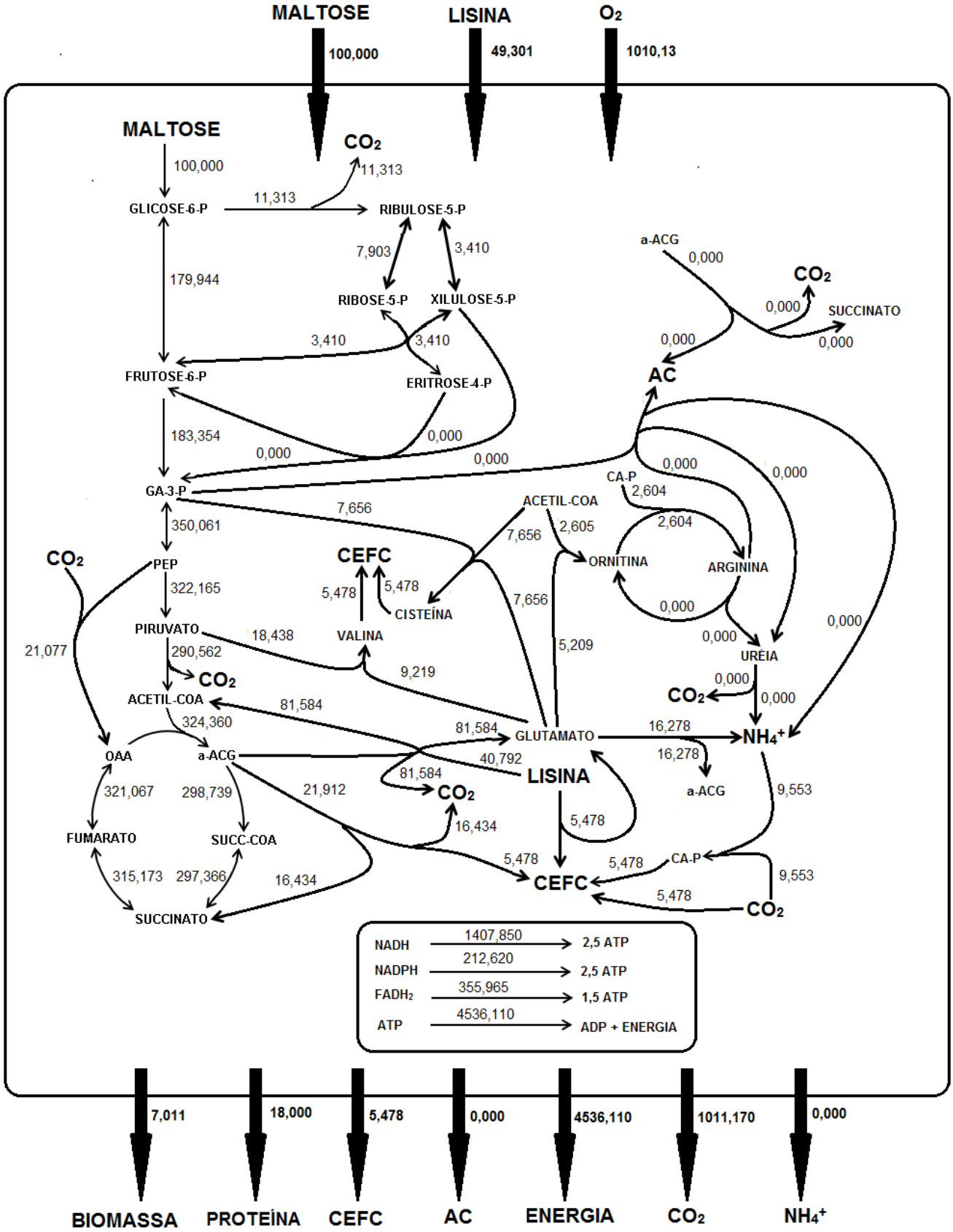
Como pode ser notado, a maioria das reações que deveriam ser bloqueadas estão relacionadas aos fluxos de N, tais como algumas associadas ao ciclo da uréia e à biossíntese de AC. Também é proposto que as reações de síntese de lisina (19) e de glutamato a partir de glutamina (76) sejam eliminadas. Entretanto, acredita-se que estes gargalos já tenham sido contornados pela adição de lisina aos meios de cultura que, assim, tornou estas duas vias menos ativas. Ainda, é sugerido pelo processo de simulação o bloqueio de duas reações ligadas ao metabolismo das unidades de 1 C (reações 48 e 50), responsáveis por suprir o metabolismo celular com unidades de um C utilizadas em reações de metilação. Parte da reação de metoxilação da posição 7-α da estrutura da CefC é realizada por este sistema.

5.6.5. Cultivo C18: glutamato e lisina como fontes de N

A degradação de uma molécula de lisina via cadaverina leva à produção de duas moléculas de glutamato. Uma vez que aumentos na produção de CefC exigiriam mudanças significativas no metabolismo de N, um novo cultivo foi proposto, onde lisina e glutamato foram as fontes de N. Esperava-se, desta forma, que o glutamato atuasse suprindo a demanda de N pelo metabolismo primário e que a metabolização de lisina via cadaverina diminuísse, aumentado sua disponibilidade para a biossíntese de CefC. Neste experimento em batelada, utilizaram-se maltose na concentração de 10 $g.L^{-1}$, como fonte de C principal, lisina a 9,2 $g.L^{-1}$ e glutamato a 9,4 $g.L^{-1}$. Embora fosse esperado um aumento na produção de CefC com esta nova composição de meio, o micro-organismo comportou-se de maneira totalmente diferente da esperada. Holomicina, que normalmente é produzida em baixas concentrações pela linhagem selvagem, passou a ser produzido em níveis próximos a 100 $mg.L^{-1}$. Com isto, o crescimento foi reduzido, uma vez que holomicina aparentemente apresentou toxicidade para *S. clavuligerus*.

Estes resultados reafirmaram que o metabolismo de *S. clavuligerus* é extremamente complexo e susceptível a alterações no ambiente. Fato este que se, por um lado foi negativo, por não surtir o efeito esperado com relação à produção de CefC, foi benéfico do ponto de vista de melhoria da produção de Holomicina. Desta forma, conclui-se que estudos de fluxos aliados a estratégias bem delineadas de cultivo podem fornecer informações muito abrangentes com relação ao metabolismo microbiano e levar a avanços nos processos de produção de bioativos.

Figura 5. 26 - Mapa de distribuição dos principais fluxos visando aumentos nos rendimentos de CefC



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

Solução 7: 100,000 Maltose + 49,301 Lisina + 1010,13 O_2 --> 4536,110 Energia + 7,011 Biomassa + 5,478 CefC + 18,000 Proteína + 1011,170 CO_2

6. CONCLUSÕES

O trabalho realizado permitiu os seguintes avanços dentro do estudo da distribuição de fluxos em *S. clavuligerus*:

- Estabelecimento de um meio quimicamente definido, ideal à obtenção de dados em quantidade e qualidade suficientes para serem utilizados na simulação do modelo metabólico de *S. clavuligerus*.
- Proposição de um modelo metabólico para *S. clavuligerus* que se adequou aos dados obtidos em vários cultivos realizados no meio de cultura estabelecido.
- Valores de respiração e energia de manutenção comprovaram a viabilidade do modelo e a confiabilidade das soluções alcançadas; estes valores foram obtidos por meio de cálculos efetuados com base nas soluções de distribuição de fluxos das simulações do modelo, utilizando os dados dos cultivos C14 e C15.
- Estudos *in silico* demonstraram que altos rendimentos de CefC poderiam ser alcançados por meio de mudanças no metabolismo do N e consequente diminuição de amônia excretada.
- Proposição de nocautes relacionados ao metabolismo do N e na via de unidades de um C relacionadas ao tetraidrofolato para construção de mutantes melhores produtores de CefC. Neste caso, o micro-organismo deveria crescer menos, de forma que os fluxos fossem desviados no sentido da produção de antibióticos.
- Aliando-se estudos de fluxos e manipulações do bioprocesso é possível a obtenção de informações-chave do metabolismo microbiano em busca de melhorias na produção de bioativos.

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.* **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 2, p. 348-356, 2000.

ANTONIO, T.; BELLÃO, C.; CORRÊA, T.; CAVALLIERI, A. P.; BADINO, A. C.; ARAUJO, M. L. G. D. C. Evaluation of different media for the production of cephalosporins by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 6, p. 819-825, 2012.

BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Natural Product Reports**, v. 14, n. 4, p. 309-333, 1997.

BAPTISTA NETO, A.; GOUVEIA, E. R.; BADINO, A. C.; HOKKA, C. O. Phenomenological model of the clavulanic acid production process utilizing *Streptomyces clavuligerus*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n. 4/7, p. 809-818, 2000.

BASCARÁN, V.; HARDISSON, C.; BRAÑA, A. F. Regulation of nitrogen catabolic enzymes in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of General Microbiology**, v. 9, p. 2465-2474, 1989.

BECKER, S. A.; FEIST, A. M.; MO, M. L.; HANNUM, G.; PALSSON, B. O.; HERRGARD, M. J. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox. **Nature Protocols**, v. 2, n. 3, p. 727-738, 2007.

BIGNELL, D. R. D.; TAHLAN, K.; COLVIN, K. R.; JENSEN, S. E.; LESKIW, B. K. Expression of *ccaR*, encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is dependent on *bldG*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1529-1541, 2005.

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 β-Lactam biosynthesis in filamentous fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 547- 585, 1998.

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

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. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 149-157, 2006.

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.

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

DE LA FUENTE, J.; MARTIN, J.; LIRAS, P. New type of hexameric ornithine carbamoyltransferase with arginase activity in the cephamycin producers *Streptomyces clavuligerus* and *Nocardia lactamdurans*. **Biochemical Journal**, v. 320, p. 173-179, 1996.

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

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Involvement of nitrogen-containing compounds in β-lactam biosynthesis and its control. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 67-82, 2006.

ELANDER, R. P. Industrial production of β-lactam antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 5/6, p. 385-392, 2003.

FANG, A.; KEABLES, P.; DEMAIN, A. L. Unexpected enhancement of *β*-lactam antibiotic formation in *Streptomyces clavuligerus* by very high concentrations of exogenous lysine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 705-709, 1996.

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. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 12, p. 6808-6814, 1989.

GOEL, A.; FERRANCE, J.; JEONG, J.; ATAAI, M. M. Analysis of metabolic fluxes in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 6, p. 686-696, 1993.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HIGGENS, C. E.; KASTNER, R. E. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a beta-lactam antibiotic producer. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 21, p. 326-331, 1971.

HISS, H.; GOMBERT, A. K. Cinética de processo fermentativo. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, cap. 6, p. 93-122.

HOLMES, D. Report urges controversial 'delinkage' to foster new antibiotics. **Nature Medicine**, v. 20, n. 4, p. 320-320, 2014.

KARANDIKAR, A.; SHARPLES, G. P.; HOBBS, G. Differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) under nitrate-limited conditions. **Microbiology**, v. 143, n. 11, p. 3581-3590, 1997.

KENIG, M.; READING, C. Holomycin and an antibiotic (MM 19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 32, n. 6, p. 549-554, 1979.

KHETAN, A.; MALMBERG, L. H.; KYUNG,Y. S.; SHERMAN,D. H.; HU, W. S. Precursor and cofactor as a check valve for cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Biothecnology Progress**, v. 15, p. 1020-1027, 1999.

KLAMT, S.; SAEZ-RODRIGUEZ, J.; GILLES, E. D. Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer. **BMC Systems Biology**, v. 1, n. 1, 2007.

KLAMT, S.; STELLING, J.; GINKEL, M.; GILLES, E. D. FluxAnalyzer: exploring structure, pathways, and flux distributions in metabolic networks on interactive flux maps. **Bioinformatics**, v. 19, n. 2, p. 261-269, 2003.

LEDUY, A.; ZAJIC, J. E. A geometrical approach for differentation of an experimental function at a point: applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 4, p. 805-810, 1973.

LEE, D. Y.; YUN, H.; PARK, S.; LEE, S. Y. MetaFluxNet: the management of metabolic reaction information and quantitative metabolic flux analysis. **Bioinformatics**, v. 19, n. 16, p. 2144-2146, 2003.

LEE, J. M.; GIANCHANDANI, E. P.; PAPIN, J. A. Flux balance analysis in the era of metabolomics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 7, n. 2, p. 140-150, 2006.

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 Microbiology**, v. 13, p. 1-11, 2013.

LI, B.; WALSH, C. T. Identification of the gene cluster for the dithiolopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 46, p. 19731-19735, 2010.

LI, J.; YANG, Y.; CHU, J.; HUANG, M.; LI, L.; ZHANG, X.; WANG, Y.; ZHUANG, Y.; ZHANG, S. Quantitative metabolic flux analysis revealed uneconomical utilization of ATP and NADPH in *Acremonium chrysogenum* fed with soybean oil. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 9, p. 1119-1129, 2010.

LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 109-124, 1999.

LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*. In: BARREDO, J. L. **Microbial processes and products**. New York: Humana Press, 2005. v. 18, p. 149-164.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. A rapid method for quantifying small amounts of protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1959.

MADDURI, K.; STUTTARD, C.; VINING, L. C. Lysine catabolism in *Streptomyces spp*. is primarily through cadaverine: beta-lactam producers also make alpha-aminoadipate. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 1, p. 299-302, 1989.

MALMBERG, L. H.; HU, W. S. Kinetic analysis of cephalosporin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus.* **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 8, p. 941-947, 1991.

MALMBERG, L. H.; HU, W. S.; SHERMAN, D. H. Effects of enhanced lysine ε-aminotransferase activity on cephamycin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus.* **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 198-205, 1995.

MALMBERG, L. H.; HU, W. S; SHERMAN, D. H. Precursor flux control through targeted chromosomal insertion of the Lysine 6-aminotransferase (lat) gene in cephamycin C biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 6916-6924, 1993.

MARTIN, J. F. New aspects of genes and enzymes for β-lactam antibiotic biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 1-15, 1998.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 371-394, 1949.

NIELSEN, J. **Physiology engineering aspecto of *Penicillium chrysogenum***. Lyngby: Polyteknisk Forlag, 1995. 223 p.

OLIVEIRA, J. H.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M.; TRSIC, M. Clavulanic acid and cephamicin c: a perspective of the biosynthesis, isolation and action mechanism. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2142-2150, 2009.

OLUKOSHI, E. R.; PACKTER, N. M. Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. **Microbiology**, v. 140, n. 4, p. 931-943, 1994.

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, cap. 9, p. 187-210.

PARADKAR, A. Clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*: biogenesis, regulation and strain improvement. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, n. 7, p. 411-420, 2013.

PEDERSEN, H.; CARLSEN, M.; NIELSEN, J. Identification of enzymes and quantification of metabolic fluxes in the wild type and in a recombinant *Aspergillus oryzae* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 11-19, 1999.

PÉREZ-REDONDO, R.; SANTAMARTA, I.; BOVENBERG, R.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. The enigmatic lack of glucose utilization in *Streptomyces clavuligerus* is due to inefficient expression of the glucose permease gene. **Microbiology**, v. 156, n. 5, p. 1527-1537, 2010.

PFEIFFER, T.; NU, J. C.; MONTERO, F.; SCHUSTER, S. Metatool: for studying metabolic networks. **Bioinformatics**, v. 15, n. 3, p. 251-257, 1999.

PRUES, D. L.; KELLETT, M. A. New clavam antibiotic from *Streptomyces clavuligerus.* **Journal of Antibiotics**, v. 20, p. 208-212, 1983.

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 Systems Biology**, v. 4, n. 1, p. 45, 2010.

RODRIGUES, M. S.; FERREIRA, L. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. de. Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation and biomass composition with and without pH control.**Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6587-6592, 2011.

ROKEM, J. S.; LANTZ, A. E.; NIELSEN, J. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1262-1287, 2007.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Dissociation of cephamicin and clavulânico acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 318-325, 1984.

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

SHAHAB, N.; FLETT, F.; OLIVER, S. G.; BUTLER, P. R. Growth rate control of protein and nucleic acid content in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and *Escherichia coli* B/r. **Microbiology**, v. 142, n. 8, p. 1927-1935, 1996.

SCHILLING, C. H.; SCHUSTER, S.; PALSSON, B. O.; HEINRICH, R. Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post-genomic era. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 3, p. 296-303, 1999.

SCHUSTER, S.; DANDEKAR, T.; FELL, D. A. Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 53-60, 1999.

STEPHANOPOULOS, G. Metabolic fluxes and metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, 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.

STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. **Metabolic engineering**: principles and methodologies. San Diego: Academic Press, 1998. 725 p.

TERZER, M.; STELLING, J. Elementary flux modes-state-of-the-art implementation and scope of application. **BMC Systems Biology**, v. 1, p. P2, 2007. Suppl. 1.

THYKAER, J.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of β-lactam production. **Metabolic Engineering**, v. 5, p. 56-69, 2003.

TIWARI, K.; GUPTA, R. K. Rare *actinomycetes*: a potential storehouse for novel antibiotics. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, p. 108-132, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2010. 812 p.

TRINH, C. T.; WLASCHIN, A.; SRIENC, F. Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 5, p. 813-826, 2009.

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. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 6, p. 602-618, 2000.

VAN LEEUWEN, C. C. M.; WEUSTHUIS, R. A.; POSTMA, E.; VAN DEN BROEK, P. J. A.; VAN DIJKEN, J. P. Maltose/proton co-transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Comparative study with cells and plasma membrane vesicles. **Biochemical Journal**, v. 284, p. 441-445, 1992.

VARMA, A.; PALSSON, B. O. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. **Biotechnology**, v. 12, p. 994-998, 1994.

WANG, A.; CAO, Z. Y.; WANG, P.; LIU, A. M.; PAN, W.; WANG, J.; ZHU, G. P. Heteroexpression and characterization of a monomeric isocitrate dehydrogenase from the multicellular prokaryote *Streptomyces avermitilis* MA-4680. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 6, p. 3717-3724, 2011.

WENTZEL, A.; BRUHEIM, P.; OVERBY, A.; JAKOBSEN, O. M.; SLETTA, H.; OMARA, W. A. M.; HODGSON, D. A.; ELLINGSEN, T. E. Optimized submerged batch fermentation strategy for systems scale studies of metabolic switching in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **BMC Systems Biology**, v. 6, n. 1, p. 59, 2012.

WEUSTHUIS, R. A.; HENDRIK W. A.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 3102-3109, 1993.

WIECHERT, W. ^{13}C metabolic flux analysis. **Metabolic Engineering**, v. 3, n. 3, p. 195-206, 2001.

WRIGHT, J.; WAGNER, A. The systems biology research tool: evolvable open-source software. **BMC Systems Biology**, v. 2, n. 1, p. 55, 2008.