

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 16/04/2021.

AMANDA SALVADOR BAPTISTA

“Metabolismo do nitrogênio de *Streptomyces clavuligerus* e seus efeitos sobre a produção de compostos bioativos”

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

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Baptista, Amanda Salvador
B222m Metabolismo do nitrogênio de *Streptomyces clavuligerus*
e seus efeitos sobre a produção de compostos bioativos /
Amanda Salvador Baptista. – Araraquara : [s.n.], 2019
116 f. : il.

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

1. Microbiologia industrial. 2. Tecnologia de
bioprocesso. 3. Metabolismo secundário. 4. Modelos
matemáticos. 5. Metabolismo microbiano. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

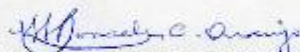
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Metabolismo do nitrogênio de *Streptomyces clavuligerus* e seus efeitos sobre a produção de compostos bioativos"

AUTORA: AMANDA SALVADOR BAPTISTA

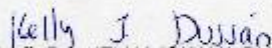
ORIENTADORA: MARIA LUCIA GONSALES DA COSTA ARAUJO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



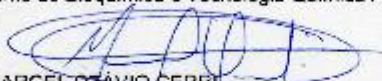
Prof.^a Dr.^a MARIA LUCIA GONSALES DA COSTA ARAUJO

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



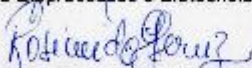
Prof.^a Dr.^a KELLY JOTHANA DUSSAN MEDINA

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



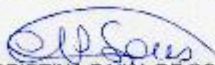
Prof. Dr. MARCEL OTÁVIO CERRI

Departamento de Biotecnologia e Bioprocessos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof.^a Dr.^a ROSINEIDE GOMES DA SILVA CRUZ

Departamento de Engenharia Química / Centro de Ciências Exatas e Tecnologia - UFSCar - São Carlos



Prof.^a Dr.^a CRISTINA PAIVA DE SOUSA

Departamento de Engenharia Química / Centro de Ciências Exatas e Tecnologia - UFSCar - São Carlos

Araraquara, 16 de abril de 2019

AMANDA SALVADOR BAPTISTA

Formação acadêmica/titulação

2015.2019 Doutorado em Biotecnologia em andamento.

Instituto de Química de Araraquara. UNESP, IQAR.UNESP, Brasil

Título: Metabolismo do nitrogênio de *Streptomyces clavuligerus* e seus efeitos sobre a produção de compostos bioativos

Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo

Bolsista da CAPES . Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2012.2015 Mestrado em Biotecnologia.

Instituto de Química de Araraquara. UNESP, IQAR.UNESP, Brasil

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

Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo

Bolsista da FAPESP. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

2009.2011 Graduação em Tecnologia em Biotecnologia.

Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP – Ribeirão Preto . SP

Formação Complementar

2015 Seminário Técnico de Cromatografia: HPLC - GC - PREPARAÇÃO DE AMOSTRA. (Carga horária: 8 h). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho. UNESP, Araraquara/SP.

2014. Introdução à Análise Proteômica. (Carga horária: 20h). Universidade Federal de Lavras.

2011. Limpeza e manutenção preventiva de micropipetas Eppendorf. Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP.

2010 .I Curso de Biossegurança: Conduta e Riscos. Universidade de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto.

2009 . Mini.curso Engenharia Genética: Clonagem Molecular e Expressão Gênica. IX Workshop de Genética. Instituto de Biociência Botucatu. Distrito de Rubião Junior, S/N. Botucatu S/P

Prêmios e títulos

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

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

LEITE, CARLA A.; CAVALLIERI, ANDRÉ P.; **BAPTISTA, AMANDA S.**; ARAUJO, MARIA L. G. C.. Dissociation of cephamycin C and clavulanic acid biosynthesis by 1,3-diaminopropane in *Streptomyces clavuligerus*. FEMS Microbiology Letters **JCR**, 2016.

CAVALLIERI, ANDRÉ P.; **BAPTISTA, AMANDA S.**; LEITE, CARLA A.; ARAUJO, MARIA L. G. C. A case study in Flux Balance Analysis: Lysine, a Cephamycin C precursor, can also increase Clavulanic Acid production. Biotechnology and Bioengineering, 2016.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

BAPTISTA, A. S.; CAVALLIERI, A. P. ; LEITE, C. A. ; ARAUJO, M. L. G. C. . DEMANDA ENERGÉTICA NA PRODUÇÃO DE BIOATIVOS EM LINHAGENS DE *STREPTOMYCES CLAVULIGERUS*. In: XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS e XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 2015, Fortaleza. XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS e XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 2015. v. 1. p. 33340-1-333406.

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

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

MILENA ALVES DE SOUZA; **AMANDA SALVADOR BAPTISTA**; MARIA LUCIA GONSALES DA COSTA ARAUJO. Investigação do teor de amônio de cultivos submersos de *Streptomyces clavuligerus* utilizando dois diferentes métodos analíticos. In: VI Congresso Científico da UNESP e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2016.

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

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

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

Patentes e registros

SOUZA, MILENA A.; **BAPTISTA, AMANDA S.**; SILVA, RICARDO M.; ARAUJO, MARIA L. G. C. . SISTEMA PARA REMOÇÃO E RECUPERAÇÃO TOTAIS DO AMÔNIO CONTIDO EM MATRIZES COMPLEXAS, SEU USO, E PROCESSO DE REMOÇÃO E RECUPERAÇÃO DE AMÔNIO CONTIDO EM MATRIZES COMPLEXAS. 2018, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180731033, título: "SISTEMA PARA REMOÇÃO E RECUPERAÇÃO TOTAIS DO AMÔNIO CONTIDO EM MATRIZES COMPLEXAS, SEU USO, E PROCESSO DE REMOÇÃO E RECUPERAÇÃO DE AMÔNIO CONTIDO EM MATRIZES COMPLEXAS". Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 09/11/2018

Eventos

Participação em eventos

30º Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Avaliador dos trabalhos apresentados na área de Exatas. 2018. (Congresso).

XXIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Avaliador dos trabalhos apresentados na área de Exatas. 2017. (Congresso).

1º Workshop de Inovação e Empreendedorismo do Instituto de Química - Unesp. 2016. (Outra).

XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - SINAFERM.DEMANDA ENERGÉTICA NA PRODUÇÃO DE BIOATIVOS EM LINHAGENS DE *STREPTOMYCES CLAVULIGERUS*. 2015. (Simpósio).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me dar sabedoria e resiliência para terminar esse trabalho.

A minha família, meus pais **Rubens Baptista** e **Maria Perciliana Salvador Baptista** e minha irmã **Amália Salvador Baptista** pelo amor incondicional e todo apoio e incentivo durante essa trajetória.

A **Profa Dra Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo** pela orientação, paciência, compreensão, experiências, conversas, e ensinamentos compartilhados.

Ao meu namorado **Renan Jeferson Paneco** pela compreensão, cuidado, amor e todo apoio nas horas difíceis e de baixa autoestima.

A **Milena Alves de Souza** a minha companheira de laboratório por toda ajuda durante os experimentos e por sua alegria contagiante de sempre.

Aos amigos **Carla** e **André** que sempre estavam à disposição para me socorrer.

Aos amigos do laboratório IPBEN **Bruna, Brenda** e **Guilherme** pela amizade e o café de todos os dias.

Aos amigos companheiros de jornada, **Andreza, Fernando, Hernan, Igrayne, Lucy, Mariana, Saidy** e **Suzy**, pelos momentos de distração e por sempre me acolherem nos momentos de dificuldade.

Aos técnicos, **Fátima, Gabriel** e **Zilda** por todo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

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

A **CAPES** pela bolsa concedida.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.”

Marie Curie

Resumo

Streptomyces clavuligerus produz uma diversidade de compostos de interesse terapêutico, com destaque para os beta-lactâmicos ácido clavulânico (um inibidor de beta-lactamases) e o antibiótico cefamicinaC, e os não beta-lactâmicos holomicina e tunicamicina. A produção destes metabólitos secundários é extremamente influenciada pela natureza e/ou concentração da(s) fonte(s) de nitrogênio do meio. Por exemplo, lisina é precursor dos antibióticos beta-lactâmicos e sua presença em culturas de *S.clavuligerus* estimula, principalmente, a produção de cefamicinaC. Por outro lado, lisina também é consumido no metabolismo primário, gerando duas moléculas de glutamato. O presente trabalho propôs explorar as atuações individuais de lisina e glutamato exógenos no processo em batelada de produção de compostos bioativos. Para isto, realizaram-se cultivos submersos em batelada em meios quimicamente definidos contendo maltose como principal fonte de carbono e energia e lisina ou lisina+glutamato como fonte(s) de nitrogênio. Realizaram-se cultivos preliminares em frascos agitados iniciados em pH 6,8 ou pH 7,2. Independente do pH inicial, nos meios contendo somente lisina obtiveram-se as maiores concentrações de cefamicinaC ($\sim 140 \text{ mg.L}^{-1}$) e nos meios lisina+glutamato, além de cefamicina C (55 a 85 mg.L^{-1}) também houve a produção de holomicina (15 a 35 mg.L^{-1}). Esta última foi inesperada e inédita, pois a literatura tem afirmado que a produção de holomicina pela linhagem selvagem de *S.clavuligerus* é indetectável. Outra particularidade dos cultivos em lisina+glutamato foi o aumento acentuado de pH até 8,0, impedindo, assim, avaliar a atuação dos aminoácidos na produção de bioativos. Para eliminar a variação de pH e ao mesmo tempo investigar se a produção de holomicina havia sido desencadeada pela presença de glutamato e/ou justamente pelo aumento de pH, conduziram-se cultivos em biorreator convencional (5L vol. útil) com pH controlado em 6,8, valor usual em culturas submersas de *S.clavuligerus*, ou em pH 7,4, valor próximo do início da produção de holomicina em frascos agitados. Na condição lisina+glutamato em pH 6,8 obteve-se ca. 400 mg.L^{-1} de cefamicinaC, um valor de $gt3$ a 4 vezes maior que o obtido nas demais condições. Uma concentração de cefamicinaC desta ordem de grandeza obtida em meio sintético nunca foi relatada na literatura. Este resultado também sustenta a ideia de que glutamato exógeno pode promover maior disponibilização da lisina presente no meio no sentido do aumento da produção de cefamicinaC. Holomicina foi produzida somente nos meios controlados em pH 7,4 (50 a 100 mg.L^{-1}), independente da presença de glutamato. Concentrações desta ordem de grandeza têm sido reportadas apenas para mutantes de *S.clavuligerus* melhores produtores deste composto que apresentam, geralmente, danos genéticos associados à síntese de ácido clavulânico. Os dados obtidos em biorreator também foram comparados entre si por meio de estudos de modelagem e simulação, tanto do ponto de vista cinético como de distribuição de fluxos metabólicos. O modelo cinético refletiu bem o comportamento dos cultivos e as simulações do modelo metabólico indicaram que a produção de holomicina juntamente com a utilização de lisina como única fonte de nitrogênio, exigiu maior demanda energética. Os presentes resultados somam-se às evidências de que é possível configurar um ambiente artificial que simule condições necessárias e suficientes do ambiente natural do micro-organismo capazes de desencadear a produção de metabólitos secundários específicos.

Palavras chave: *Streptomyces clavuligerus*. Bioprocesso. Metabólito secundário. Modelagem matemática e simulação. Fluxos metabólicos

ABSTRACT

Streptomyces clavuligerus produces several compounds of therapeutic interest including the beta-lactam clavulanic acid (a powerful beta-lactamase inhibitor) and the antibiotic cephamycin C as well as the not beta-lactam holomycin and tunicamycin. The production of this secondary metabolites is extremely influenced by source and/or concentration of nitrogen in the culture media. For example, lysine is a precursor of the beta-lactam antibiotics and its presence in culture *S. clavuligerus* stimulates especially the production of cephamycin C. On the other hand, this microorganism also consumes lysine in the primary metabolism, generating two molecules of glutamate. The present work proposed to explore the individual performances of exogenous lysine and glutamate in the batch process of bioactive compounds production. For this purpose, submerged batch cultures were performed by using a chemically defined media containing maltose as the main source of carbon and energy coupled with lysine or lysine+glutamate as the main source(s) of N. Preliminary cultures were made in shake flasks initiated at pH 6.8 or pH 7.2. In the media containing only lysine were obtained the highest concentrations of cephamycin C (~ 140 mg.L⁻¹). Likewise, in the media with lysine+glutamate, in which were also obtained cephamycin C (55 to 85 mg.L⁻¹) and holomycin (15 to 35 mg.L⁻¹). The latter was unexpected and unpublished, since the literature has stated that the production of holomycin by the wild strain of *S. clavuligerus* is undetectable. Another peculiarity of the glutamate cultures was the sharp increase of pH to 8.0, thus preventing the evaluation regarding the action of amino acids in the production of bioactive. This problem was eliminated by conducting the cultures in a conventional bioreactor (5L) with pH controlled at 6.8, usual value in submerged cultures of *S. clavuligerus*, or at pH 7.4, value close to that was observed at the start of holomycin production in shake flasks. In the lysine+glutamate condition at pH 6.8 was obtained approximately 400 mg.L⁻¹ of cephamycin C, 3 to 4 times higher than other conditions. A concentration of cephamycin C of this order of magnitude obtained in synthetic medium has never been reported in the literature. This result also supports the idea that exogenous glutamate may promote greater availability of exogenous lysine leading to an increasing production of cephamycin C. Holomycin was produced only in the controlled media at pH 7.4 (50 to 100 mg.L⁻¹), independent of the presence of glutamate. Concentrations of this order of magnitude have been reported only for *S. clavuligerus* mutants, the best holomycin producers with genetic damage associated with CA synthesis. Moreover, the data obtained in bioreactor were also compared with each other by means of modeling and simulation studies, both by kinetic point of view and distribution of metabolic fluxes. The kinetic model well reflected the behavior of the culture mediums and the simulations of the metabolic models. It also indicated that the production of holomycin combined with the presence of lysine as the only source of N, demanded the highest energy demand. The present results add to the evidence that an artificially defined environment can simulate necessary and sufficient conditions of the natural environment of the microorganism capable of triggering the production of specific secondary metabolites.

Key-words: *Streptomyces clavuligerus*. Bioprocess. Secondary metabolite. Mathematical modeling and simulation. Metabolic flux.

Lista de Figuras

Figura 3.1: Diversidade de bioativos.	26
Figura 3.2: Distribuição dos antibióticos descobertos até 2001, de acordo com sua origem.	27
Figura 3.3: Estrutura química de compostos beta-lactâmicos: (1) Estrutura do ácido clavulânico, (2) Estrutura das penicilinas e (3) Estrutura das cefalosporinas.	34
Figura 3.4: Rota biossintética de ácido clavulânico.	36
Figura 3.5: Estrutura química da Cefamicina C.	36
Figura 3.6: Rota biossintética de Cefamicina C em <i>S. clavuligerus</i> e <i>N. lactamdurans</i>	38
Figura 3.7: Estrutura química da Holomicina.	39
Figura 3.8: Rota biossintética de Hol.	40
Figura 3.9: Esquema do sistema biológico microscópico.	41
Figura 3.10: Modelagem matemática do metabolismo celular a partir de representações de redes metabólicas construídas com base em (a) interações individuais; (b) restrições, incluindo a topologia da rede, estequiometria e reversibilidades das reações ou (c) mecanismos detalhados de reações. Resultados típicos obtidos com as análises esquematizados abaixo de cada estratégia: (a) "Nós" (círculos vermelhos) de interação da rede metabólica; (b) "Cone" de distribuição dos fluxos possíveis em uma rede construída a partir de rotas metabólicas; (c) Dinâmica da concentração dos componentes celulares.	46
Figura 4.1: Esporos de <i>S. clavuligerus</i> cultivados em meio proposto por Sánchez e Braña (1996).	49
Figura 4.2: Biorreator de bancada, tipo tanque agitado (News Brunswick, modelo Bioflo 2000, 5 L de volume útil).	51
Figura 4.3: Esquemas das etapas de cultivo de <i>S. clavuligerus</i>	52
Figura 4.4: Placa de bioensaio para determinação da concentração de CefC.	56
Figura 4.5: Esquema de extração líquido-líquido de Hol: Caldo de cultivo em que ocorreu a biossíntese de Hol (A) e Extração de Hol (B)	56
Figura 4.6: Analisador de gases BlueInOne.	57
Figura 5.1: Perfis de pH (A), crescimento celular (B), Log de Biomassa e a biossíntese de Hol no cultivo "L+G pH 7,2" (C), biossíntese de AC (D), biossíntese de CefC (E) e biossíntese de Hol (F) obtidos em cultivos em batelada (em frascos agitados, sem controle de pH) em meios sintéticos a 28°C com valores de pH inicial ajustados em 6,8 ou 7,2, contendo como fontes de nitrogênio: lisina+glutamato (meio L+G) ou lisina (meio Lisina)... ..	62
Figura 5.2: Batelada em meio "Lisina pH 6,8" a 28°C – Dados experimentais (cruz) e simulados (traço-dois pontos) de crescimento celular (Cx), de consumo maltose (Cmalt) e lisina (Clis), e de formação dos biocompostos cefamicina C (CcefC) e ácido clavulânico	

(CAC) de cultivo em batelada em biorreator convencional de bancada, com pH controlado em 6,8.	65
Figura 5.3: Batelada em meio "L+G pH 6,8" a 28°C – Dados experimentais (cruz) e simulados (traço-dois pontos) de crescimento celular (Cx), de consumo de glutamato (Cglut), maltose (Cmalt) e lisina (Clis), e de formação dos biocompostos cefamicina C (CcefC) e ácido clavulânico (CAC) de cultivo em batelada em biorreator convencional de bancada, com pH controlado em 6,8.	66
Figura 5.4: Batelada em meio "Lisina pH 7,4" a 28°C – Dados experimentais (cruz) e simulados (linha traço-dois pontos) de crescimento celular (Cx), de consumo maltose (Cmalt) e lisina (Clis), e de formação dos biocompostos holomicina (Chol), cefamicina C (CcefC) e ácido clavulânico (CAC) de cultivo em batelada em biorreator convencional de bancada, com pH controlado em 7,4.	67
Figura 5.5: Batelada em meio "L+G pH 7,4" a 28°C – Dados experimentais (cruz) e simulados (linha traço-dois pontos) de crescimento celular (Cx), de consumo de glutamato (Cglut), maltose (Cmalt) e lisina (Clis), e de formação dos biocompostos holomicina (Chol), cefamicina C (CcefC) e ácido clavulânico (CAC) de cultivo em batelada em biorreator convencional de bancada, com pH controlado em 7,4.	68
Figura 5.6: Perfis de evolução de íons amônio no caldo dos cultivos em biorreator a 28°C "L+G pH 6,8", "L+G pH 7,4" e "Lisina pH 7,4" utilizando a linhagem selvagem de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064.	76
Figura 5.7: Perfis de crescimento e evolução dos valores de pH nos cultivos de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em frascos agitados com pH inicial a 6,8: Formação de biomassa dos meios contendo lisina como fonte de N a 20°C e 28°C (A), Formação de biomassa dos meios contendo lisina e glutamato como fontes de N a 20°C e 28°C (B), Evolução do valor de pH dos meios contendo lisina como fonte de N a 20°C e 28°C (C) e Evolução do valor dos meios contendo lisina e glutamato como fontes de N a 20°C e 28°C (D).	78
Figura 5.8: Perfis de produção de biocompostos nos cultivos de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em frascos agitados com pH inicial a 6,8: Produção de CefC dos meios contendo lisina como fonte de N a 20°C e 28°C (A), Produção de CefC dos meios contendo lisina e glutamato como fontes de N a 20°C e 28°C (B), Produção de AC dos meios contendo lisina como fonte de N a 20°C e 28°C (C) e Produção de AC dos meios contendo lisina e glutamato como fontes de N a 20°C e 28°C (D).	80
Figura 5.9: Perfis de formação de NH_4^+ nos cultivos de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em frascos agitados com pH inicial a 6,8: Cultivos contendo lisina como fonte de N a 20°C e 28°C (A) e Cultivos contendo lisina e glutamato como fontes de N a 20°C e 28°C (B).	81

Figura 5.10: Perfis de secreção de proteína extracelular nos cultivos em batelada realizados em biorreator a 28°C: Meios de cultura compostos apenas por lisina como fonte de N (A), Meios de cultura compostos por lisina e glutamato como fontes de N (B).....	82
Figura 5.11: Perfis de evolução de CO ₂ nos cultivos em batelada realizados em biorreator a 28°C: "L+G pH 6,8" (A), "Lisina pH 7,4" (B) e "L+G pH 7,4".....	84
Figura 5.12: Mapa de distribuição dos principais fluxos durante a fase exponencial do cultivo "L+G pH 6,8" de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em biorreator (intervalo de 9 a 20 horas de cultivo).	91
Figura 5.13: Mapa de distribuição dos principais fluxos durante a fase exponencial do cultivo "L+G pH 6,8" de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em biorreator (intervalo de 20 a 30 horas de cultivo).	92
Figura 5.14: Mapa de distribuição dos principais fluxos durante a fase exponencial do cultivo "Lisina pH 7,4" de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em biorreator.	93
Figura 5.15: Mapa de distribuição dos principais fluxos durante a fase exponencial do cultivo "L+G pH 7,4" de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em biorreator.....	94

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Número aproximado de produtos naturais conhecidos até o ano de 2010.	28
Tabela 3.2: Empresas que cessaram ou continuam bioprospectando entre 2000 e 2013.	29
Tabela 3.3: Antibióticos e inibidores de beta-lactamases lançados entre 2000 e 2015.	30
Tabela 3.4: Medicamentos em teste clínico.	31
Tabela 4.1: Cultivos em frascos agitados utilizando a linhagem selvagem ATCC 27064 de <i>Streptomyces clavuligerus</i>	52
Tabela 4.2: Cultivos em biorreator tipo tanque agitado utilizando a linhagem selvagem ATCC 27064 de <i>Streptomyces clavuligerus</i>	52
Tabela 5.1: Parâmetros cinéticos referentes as fontes de C dos cultivos simulado em Scilab.	72
Tabela 5.2: Parâmetros cinéticos referentes a fonte de N dos cultivos simulado em Scilab.	73
Tabela 5.3: Parâmetros cinéticos referentes aos biocompostos produzido nos cultivos simulado em Scilab.	74
Tabela 5.4: Variações globais de consumo de substratos e formações de produtos durante a fase exponencial do cultivo "L+G pH 6,8" de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em biorreator. ...	86
Tabela 5.5: Variações globais de consumo de substratos e formações de produtos durante a fase exponencial do cultivo "L+G pH 6,8" de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em biorreator. ...	86
Tabela 5.6: Variações globais de consumo de substratos e formações de produtos durante a fase exponencial do cultivo "Lisina pH 7,4" de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em biorreator. .	86
Tabela 5.7: Variações globais de consumo de substratos e formações de produtos durante a fase exponencial do cultivo "L+G pH 7,4" de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em biorreator. ...	87
Tabela 5.8: Balanço de massa de Nitrogênio do cultivo "L+G pH 6,8" de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em biorreator.	95
Tabela 5.9: Balanço de massa de Nitrogênio do cultivo "Lisina pH 7,4" de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em biorreator.	96
Tabela 5.10: Balanço de massa de Nitrogênio do cultivo "L+G pH 7,4" de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064 em biorreator.	96

Lista de abreviaturas e siglas

a-ACG – alfa-acetoglutarato

AC – Ácido Clavulânico

Acetil-CoA – Acetil Coenzima A

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

ADP – Difosfato de adenosina

AEF - Análise de Equilíbrio de Fluxo

AFM – Análise de Fluxo Metabólico

AICAR – 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucléico

AMP – Monofosfato de adenosina

ATP – Trifosfato de adenosina

AVF – Análise de Via de Fluxos

C - Carbono

CA-P – Carbamoil Fosfato

CefC – Cefamicina C

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CTP – Trifosfato de citidina

DAC – deacetilcefalosporina C

DAOC – deacetoxicefalosporina C

dATP – Trifosfato de desoxiadenosina

dCTP – Trifosfato de desoxicitidina

dGTP – Trifosfato de desoxiguanosina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dTTP – Trifosfato de desoxitimidina

FAD – Dinucleotídeo de flavina-adenina

GA-3-P – Gliceraldeído- 3- fosfato

GDP – Difosfato de guanosina

Glu - Glutamato

GTP- Trifosfato de guanosina

HOCDAC – 7-hidroxi-carbamoil-deacetilcefalosporina C

Hol - Holomicina

I – Irreversível

L+G – Condição de meio de cultura composta por Lisina e Glutamato

LAT - Lisina aminotransferase

Lis - Lisina

MOPS - Ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico

N - Nitrogênio

NAD – Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina

NADP – Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina-fosfato

NH₃ - Amônia

NH₄⁺ - Amônio

OAA - Oxaloacetato

OCDAC – orto-carbamoil-deacetilcefalosporina C

OPA – orto-phtalaldeído

PenG – Penicilina G

PenN – Penicilina N

PEP - Fosfoenolpiruvato

R - Reversível

RNA – Ácido ribonucléico

SUCC-COA – Succinil-Coenzima A

Tun - Tunicamicina

UTP – Uridina trifosfato

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Considerações Gerais	23
2	OBJETIVO GERAL	24
2.1	Objetivos específicos	24
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1	Biocompostos microbianos	25
3.2	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	32
3.3	Ácido Clavulânico.....	33
3.4	Biossíntese de Ácido clavulânico	35
3.5	Cefamicina C.....	36
3.6	Biossíntese de Cefamicina C	37
3.7	Holomicina	39
3.8	Influência das condições de cultivo no metabolismo secundário	41
3.9	Modelagem Matemática	44
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1	Micro-organismos.....	48
4.2	Meios de Cultura	48
4.3	Condições gerais do processo fermentativo	50
4.4	Métodos Analíticos	53
4.4.1	Coleta de amostras, armazenagem do sobrenadante e determinação de biomassa.....	53
4.4.2	Determinação das concentrações dos substratos	53
4.4.3	Determinação da concentração de proteína extracelular.....	54
4.4.4	Determinação da concentração de íons amônio.....	54
4.4.5	Determinação da concentração de Ácido Clavulânico.....	54
4.4.6	Determinação da concentração de Cefamicina C.....	55

4.4.7	Determinação da concentração de Holomicina	56
4.4.8	Análise de CO ₂	57
4.5	Modelagens Matemáticas	57
4.5.1	Estimativa de parâmetros dos processos fermentativos.....	57
4.5.2	Simulação dos modelos metabólicos.....	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Cultivos em frascos agitados	59
5.2	Cultivos em biorreator	64
5.3	Modelo cinético	71
5.4	Formação de íons amônio nas culturas	75
5.5	Secreção de Proteínas.....	81
5.6	Evolução de CO ₂	82
5.7	Reações do modelo metabólico	85
5.8	Distribuições de fluxos metabólicos e Balanços de massa para o Carbono	85
5.9	Balanços de material para o Nitrogênio (N)	95
6	CONCLUSÕES	98
7	REFERÊNCIAS.....	100
8	APÊNDICE A- Reações bioquímicas do modelo metabólico de <i>S. clavuligerus</i>	
	112	

1 INTRODUÇÃO

Durante algumas décadas após a descoberta dos primeiros antibióticos, criou-se o conceito de que as doenças infecciosas causadas por micro-organismos patogênicos haviam permanecido em um passado distante. No entanto, com o surgimento de bactérias patogênicas multirresistentes, as doenças voltaram a ser uma grande ameaça à saúde humana. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) têm relatado cerca de 440 mil novos casos anuais de infecções por bactérias resistentes, com mais de 150 mil mortes (ZHU et al., 2014a). Com o aumento do número de bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos conhecidos, tornou-se urgente a exploração de novos micro-organismos para a produção de compostos mais eficientes (WIETZ et al, 2010). Geralmente micro-organismos filamentosos constituem a principal fonte de metabólitos secundários, produzindo cerca de 90% de todos os antibióticos conhecidos. A classe dos antibióticos beta-lactâmicos é, ainda hoje, uma das mais utilizadas terapeuticamente (TORTORA et al., 2010) devido à alta especificidade e toxicidade relativamente baixa de seus compostos (BRAKHAGE, 1998). Penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas são exemplos de beta-lactâmicos produzidos por fungos filamentosos ou bactérias pertencentes aos actinomicetos utilizados para a produção de compostos semi-sintéticos de amplo espectro de ação antibiótica.

O gênero *Streptomyces*, pertencente aos actinomicetos, é responsável por aproximadamente dois terços de todos os biocompostos descobertos (TORTORA et al., 2010; TIWARI e GUPTA, 2012). Um exemplo é *Streptomyces clavuligerus*, uma importante espécie industrial que produz múltiplos biocompostos, dos quais vários já foram isolados e caracterizados. Dentre esses metabólitos, dois compostos beta-lactâmicos são produzidos industrialmente: o ácido clavulânico (AC) e o antibiótico cefamicina C (CefC). Além destes compostos, *S. clavuligerus* produz outras vinte clavamas, várias com atividade antifúngica, e os antibióticos não-beta lactâmicos tunicamicina (Tun) e holomicina (Hol). A diversidade produtiva de *S. clavuligerus* tem feito desta espécie um excelente modelo para o estudo das complexas relações entre mecanismos controladores e biossínteses de múltiplos metabólitos secundários (FUENTE et al, 2002).

AC é um potente inibidor de beta-lactamases e atua em sinergia com penicilinas e cefalosporinas, bloqueando o sítio ativo destas enzimas sintetizadas

por bactérias resistentes protegendo, assim, a atividade dos antibióticos. Um exemplo desta importante combinação é Clavulin[®] (clavulanato de potássio e amoxicilina) (DOMINGUES et al, 2010). CefC é estruturalmente semelhante à cefalosporina C, a qual é produzida somente por fungos filamentosos (CRUZ et al, 2004), porém, possui maior resistência a beta-lactamases por apresentar um radical metoxi na posição 7alfa que confere maior estabilidade ao sistema bicíclico de anéis dos beta-lactâmicos (BUSSARI et al, 2009). Tun é produzida por várias espécies de *Streptomyces* e consiste de uma mistura de dez ou mais homólogos de nucleosídeos que interferem na formação de glicoproteínas em bactérias e eucariotos. Hol é um antibiótico da classe das pirroínas (ditiolopirrolona), bem conhecido por inibir a síntese de RNA polimerase de bactérias que adquiriram resistência a rifamicina. Tem sido demonstrado que Hol também apresenta propriedades citotóxicas em células de mamíferos e contra células cancerígenas (LI e WALSH, 2010).

O metabolismo do nitrogênio é um ponto chave na biossíntese de bioativos em *S. clavuligerus*. Sabe-se que a biossíntese de CefC inicia-se com a formação do raro aminoácido ácido alfa-aminoadípico, através da desaminação da lisina, a qual é catalisada pela enzima lisina aminotransferase (LAT). A reação seguinte é a formação do tripeptídeo L-alfa-aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (ACV), por meio da junção dos aminoácidos ácido alfa-aminoadípico, cisteína e valina, reação esta catalisada pela enzima ACV sintetase (LIRAS, 1999). Dados da literatura têm indicado que a adição de lisina ao meio de cultivo de *S. clavuligerus* induz aumentos de até seis vezes na produção de antibiótico relativamente à produção obtida com meios não suplementados com lisina (LIRAS e MARTÍN, 2005; ANTONIO et al, 2012; LEITE et al., 2013). Outros compostos nitrogenados, tais como diaminas, também podem exercer um efeito positivo sobre a produção deste antibiótico (LEITE et al, 2013). Por sua vez, o aminoácido arginina é precursor de AC, cuja síntese inicia-se com a condensação de uma molécula de glicerol com uma molécula do aminoácido arginina (FUENTE et al., 2002). Estudos demonstraram que a adição de ornitina (aminoácido precursor da arginina) pode promover aumentos significativos na produção de AC (DOMINGUES et al., 2010). Quanto à biossíntese de Hol, pouco se sabe sobre sua origem, não havendo relatos na literatura acerca da influência da composição do meio sobre a sua produção. Entretanto, acredita-se que a síntese

deste composto inicie-se com a condensação de duas moléculas de cisteína (LI e WALSH, 2010). Relatos disponíveis na literatura têm mostrado que a capacidade produtiva de Hol na linhagem selvagem é insignificante (FUENTE et al., 2002; LIRAS, 2014). Ainda, os resultados apresentados, entre outros já obtidos no laboratório de Bioprocesso, têm comprovado a marcante influência de fontes de nitrogênio na produção de biocompostos por *S. clavuligerus* ATCC 27064.

A importância e a complexidade de *S. clavuligerus* têm feito desta espécie um excelente modelo para o estudo das complexas relações entre mecanismos reguladores e biossínteses de múltiplos metabólitos secundários. Com o avanço das *ômicas* das ciências biológicas (genômica, proteômica, metabolômica), o comportamento deste micro-organismo tem sido investigado em diferentes níveis de detalhamento fornecendo um número cada vez maior de informações do seu metabolismo celular.

Progressos no sentido de se obter altas concentrações de um composto bioativo específico têm sido resultantes de investimentos contínuos da indústria farmacêutica em programas de melhoramento de linhagens. Intervenções em regiões específicas do genoma têm sido, muitas vezes, apenas parcialmente bem sucedidas devido à resistência natural do micro-organismo em criar estruturas de controle que redirecionem fluxos do metabolismo primário para o secundário. Por outro lado, o aumento da produção de determinado biocomposto, mesmo por linhagens não manipuladas geneticamente, pode, como mencionado anteriormente, ser promovido pela presença e/ou concentração de determinados nutrientes no meio de cultivo. Para isto, é fundamental traçar estratégias bem definidas para a realização dos bioprocessos de produção aliadas a um conhecimento profundo do metabolismo de *S. clavuligerus*.

Ferramentas de modelagem matemática e de simulação têm sido utilizadas desde a década de 1970 para prever o comportamento microbiano e propor estratégias de otimização. A partir da década de 1990, com o desenvolvimento da Engenharia Metabólica, foram surgindo novas alternativas de modelagem, dentre as quais a análise da distribuição de fluxos metabólicos tem ocupado um papel importante. Nesta metodologia, a construção de modelos estequiométricos representativos do metabolismo do organismo e sua análise permitem identificar gargalos que afetam a biossíntese de um composto de interesse. Com isto, é

possível propor mudanças na partição dos fluxos que conduzam a aumentos na produção e, assim, planejar formas para concretizar estas mudanças, com o auxílio de ferramentas da Biologia Molecular e/ou da Engenharia de Bioprocessos (STEPHANOPOULOS, 1998).

1.1 Considerações Gerais

Desde a descoberta de *Streptomyces clavuligerus*, há cerca de 40 anos, têm sido acumuladas muitas informações referentes a esta espécie e seus importantes metabólitos secundários. Ainda assim, a complexidade de seu metabolismo tem sido sempre um desafio a se superar quando o objetivo é aumentar a produção de um composto bioativo em particular. Um destaque entre os metabólitos secundários de *S. clavuligerus* é a CefC, um antibiótico beta-lactâmico utilizado como matéria prima para a produção de cefalosporinas semissintéticas. A produção deste biocomposto foi o objetivo principal do presente trabalho, porém, como os genes regulatórios de produção de CefC fazem parte do mesmo "cluster" onde se situam os genes regulatórios de produção de AC, um importante inibidor de beta-lactamases, dados deste biocomposto também foram considerados no presente trabalho. Os cultivos foram realizados no modo batelada e foram utilizados meios quimicamente definidos que permitiram a comparação do comportamento dos processos por meio de modelagem matemática, tanto cinética como sob a abordagem de análise de distribuição de fluxos metabólicos.

6 CONCLUSÕES

Conclusões mais importantes do presente trabalho:

- os dados experimentais de formação de células, CO₂, compostos bioativos e proteínas e de consumo de substratos permitiram propor um modelo cinético que refletiu bem o comportamento dos cultivos realizados em biorreator nas quatro diferentes condições ("L+G pH 6,8", "L+G pH 7,4", "Lisina pH 6,8", "Lisina pH 7,4").

- em decorrência do bom ajuste do modelo cinético aos dados experimentais, os estudos de modelagem e simulação evidenciaram que Glu foi a fonte de C e energia preferencial de *S. clavuligerus* independente do pH dos cultivos.

- o cultivo "L+G pH 6,8" foi o mais favorável tanto para o desenvolvimento celular como para a obtenção da maior produção de CefC (3 a 4 vezes maior que nas outras condições), podendo-se concluir que nesta condição a presença de Glu promoveu uma maior disponibilização de Lis, que seria consumida no metabolismo primário, para a produção do antibiótico; este comportamento não foi observado em "L+G pH 7,4", provavelmente em virtude da produção de Hol.

- Hol foi produzida somente nas condições controladas em pH 7,4, independente da composição da fonte de N, de forma que a presença de Glu não foi determinante para a produção de Hol, como se havia cogitado inicialmente.

- as concentrações de Hol obtidas no presente trabalho são inéditas, pois a literatura tem afirmado que a produção deste composto pela linhagem selvagem é indetectável; além disto os valores de concentração aqui obtidos foram da mesma ordem de grandeza das relatadas na literatura para mutantes de *S. clavuligerus* super produtores desse biocomposto.

- cultivos em frascos agitados a 20°C mostraram que a formação de NH₄⁺ foi retardada, no entanto isto não refletiu positivamente na produção dos compostos bioativos, sendo as maiores produções observadas a 28°C;

- os balanços de N demonstraram que as maiores porcentagens de N nos cultivos foram originadas de NH₄⁺.

- os balanços de C realizados e utilizados como restrição para simulação de fluxos metabólicos apresentaram relação entre saída e entrada de C nos processos próximo de 1, comprovando a precisão dos métodos de análise empregados para consumo de substrato e formação de produtos e subprodutos;

- o estudo de distribuição de fluxos evidenciou a maior demanda energética exigida nos cultivos em que a produção de Hol foi detectada, sendo a condição “Lisina pH 7,4” a que demonstrou maior necessidade de energia;

- os maiores valores de gasto energético resultantes nas simulações de distribuição de fluxos provavelmente estão associados à toxicidade que Hol exerce sobre o micro-organismo;

7 REFERÊNCIAS

- AHARONOWITZ, Y.; DEMAINE, A. L. Carbon catabolite regulation of Cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 14, p. 159-164, 1978.
- ALEXANDER, D. C.; BRUMLIK, M. J.; LEE, L.; JENSEN, S. E. Early cephamycin biosynthetic genes are expressed from a polycistronic transcript in *Streptomyces clavuligerus*. **J Bacteriol**, v. 182, n. 2, p. 348-356, 2000.
- ÁLVAREZ-ÁLVAREZ, R.; RODRÍGUEZ-GARCIA, Y.; MARTÍNEZ-BURGO, Y.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Transcriptional Studies on a *Streptomyces clavuligerus* oppA2 Deletion Mutant: N-Acetylglucyl-Clavaminic Acid is an Intermediate of Clavulanic Acid Biosynthesis. **Appl Environ Microbiol**, v. 84, ed. 22, p. 1-17, 2018.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water & waste water**. 21 st ed. Washington, DC, 2005.
- ANTONIO, T; BELLÃO, C.; CORRÊA, T.; CAVALLIERI, A. P.; BADINO, A. C.; ARAUJO, M. L. G. C. Evaluation of Different Media for Production of Cephalosporins by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 **Braz Arch Biol Technol**, in press, v. 55, n. 6, 2012.
- AWAD, H. M.; EL-SHAHED, K. Y. I ; AZIZ, R.; SARMIDIA, M. R.; EL-ENSHAY, A. Antibiotics as Microbial Secondary Metabolites: Production and Application. **Jurnal Teknologi**. v. 59, p. 101-111, 2012.
- BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Nat Prod Rep**, v. 14, n. 4, p. 329-333, Aug., 1997.
- BAILEY, J. E. Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. **Biotechnol Progr**, v. 14, p. 8-20, 1998.
- BALLOWS, A. **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria; ecophysiology, isolation identification, applications**. 2nd. ed, New York: Springer-Verlag, 1992. v.1.
- BAPTISTA, A.S **Monitoramento de cultivos submersos de linhagens de *Streptomyces clavuligerus* para a quantificação de distribuição de fluxos metabólicos**. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) . Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.
- BEAM to fight antimicrobial resistance. **Nat Biotechnol**, v.33, p. 889–889, 2015.
- BELLÃO, C., ANTONIO, T., ARAUJO, M.L.G.C., BADINO, A.C. Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* under different fed-batch conditions, **Braz J Chem Eng**, v. 30, p. 257-266, 2013.

BERDY, J. Bioactive Microbial Metabolites – A Personal View. **J. Antibiot.**, v. 58, ed. 1, p. 1-26, 2005.

BERDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **J Antibiot**, v. 65, p. 385-397, 2012.

BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M., ARAUJO, M. L. G. C., HOKKA, C. O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochem Eng J**, v. 23, p. 31-36, Mar. 2005.

BIBB, M. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Curr Opin Microbiol**, v. 8, ed. 2, p. 208-215, 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.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**. CRC Press. ed. 2. 1997. 187 p.

BODE, E. ; BRACHMAN, A. O.; KEGLER, C.; SIMSEK, R.; DAUTH, C.; ZHOU, Q.; KAISER, M.; KLEMMT, P.; BODE, H.B. Simple "On-Demand" Production of Bioactive Natural Products. **Chem Bio Chem**, v. 16, p. 1115-1119, 2015.

BRAKHAGE, A. A. Molecular regulation of β -Lactam biosynthesis in filamentous fungi. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, p. 547- 585, 1998.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Microbiol.**, v. 11, p. 21-31, 2013

BRAKHAGE, A.A.; SCHROECH, V. Fungal secondary metabolites- Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genet Biol.**, v. 48, p. 15-22, 2011.

BRAÑA, A. F.; PAIVA, N.; DEMAİN, A. L. Pathways and regulation of ammonium assimilation in *Streptomyces clavuligerus*. **J Gen Microbiol**, v. 132, p. 1305-1317, 1986.

BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J. D.; READING, C.; ROBINSON, G. N. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. **J Antibiot**, v. 29, n. 6, p. 668-669, June 1976.

BUSHELL, M. E.; FRYDAY, A. The application of materials balancing to the characterization of sequential secondary metabolite formation in *Streptomyces cattleya* NRRL 8057. **J Gen Microbiol**, v. 129, p. 1733-1741, 1983.

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.

BUSSARI, B.; SURVASE, S. A.; SAUDAGAR, P. S.; SINGHAL, R. S. An integrated approach for production of cephamycin C using *Streptomyces clavuligerus* NT4:

sequential optimization of production medium and effect of amino acids. **Curr Trends Biotechnol Pharm**, v. 3, p. 372-384, 2009.

BUTLER, M. S.; BLASKOVICH, M. A. T.; COOPER, M. A. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. **J Antibiot**, p. 1-22, 2016.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: VANDAMME, E. J. (Ed.). **Biotechnology of industrial antibiotics**. New York: Marcel Dekker, 1984, p. 3.31.

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

CAVALLIERI, A. P.; BAPTISTA, A. S.; LEITE, C. A.; ARAUJO, M. L. G. C. A case study in flux balance analysis: Lysine, a cephamycin C precursor, can also increase clavulanic acid production. **Biochem Eng J**, v. 112, p. 42-53, Aug. 2016.

CHALLINOR, V.L.; BODE, H.B. Bioactive natural products from novel microbial sources. **Ann NY Acad Sci**, v. 1354, p. 82-97, 2015.

CHATER, K. F. Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, p. 761-768, 2006.

CHEN G, LI B, LI J, WEBSTER J. Dithiolopyrrolone derivatives useful in the treatment of proliferative disease. WO03080624. Depósito: 26 Mar. 2002. Concessão: 02 Out. 2003

CHEN, X.S.; LI, S. ; LIAO, L.J. ; REN, X.D. ; LI, F.; TANG, L.; ZHANG , J.H. ; MAO, Z. G.. Production of ϵ -poly-L-lysine using a novel two-stage pH control strategy by *Streptomyces* sp. M-Z18 from glycerol. **Bioprocess Biosyst. Eng.** v. 34, n. 5, p. 561–567, 2011.

CHU, Y. -W.; RENNO, D. e SAUNDERS, G. Extracellular pH affects regulation of the pcbAB gene in *Penicillium chrysogenum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 47, ed. (3), p. 250–254, 1997.

COQUE, J.J.R., LIRAS, P., LÁIZ, L., AND MARTÍN, J.F. A gene encoding lysine 6-aminotransferase, which forms the β -lactam precursor α -aminoadipic acid, is located in the cluster of cephamycin biosynthetic genes in *Nocardia lactamdurans*. **J Bacteriol**, v.173, p. 6258–6264, 1991.

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. **Biochem Eng J**, v. 69, p. 1-7, 2012.

COVERT, M.W.; FAMILI, I.; PALSSON, B.Ø .Identifying constraints that govern cell behavior: a key to converting conceptual to computational models in biology?. **Biotechnol Bioeng**, v. 84, p. 763–772, 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drugs leads. **Biochim Biophys Acta gen**, v. 1830, p. 3670 – 3695, 2013.

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

CUI, H. X.; LI, F. C.; YAN, B. L.; SHAABEN, K.; QIN, S.; LAATSCH, H. Streptomyces sp.M095 from Jiaozhou bay produces inhibitory-fungal antibiotic, holomycin. **Chinese J Mar Drugs**, v. 25, p.11-15, 2006.

DAI, Z.; NIELSEN, J. Advancing metabolic engineering through systems biology of industrial microorganisms. **Curr Opin Biotechnol**, v. 36, p. 8-15, 2015.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D.A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochem Rev**, v. 14, p. 299-315, 2015.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug Discovery: 80 years of progress. **J Antibiot**, v. 62, p. 5-16, 2009.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their Discovery. **J Ind Microbial Biotechnol**, v. 41, p. 185-201, 2014.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Involvement of nitrogen-containing compounds in β -lactam biosynthesis and its control. **Crit Rev Biotechnol**, v. 26, n. 2,

DESAI, R. P.; LEAF, T.; WOO, E.; LICARI, P. Enhanced production of heterologous macrolide aglycones by fed-batch cultivation of *Streptomyces coelicolor*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.28, n. 5, p. 297–301, 2002.

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

ELKINS, J. M.; CLIFTON, I. J.; HERNANDEZ, H.; DOAN, L. X.; HEWITSON, K. S. Oligomeric structure of proclavaminic acid amidino hydrolase: evolution of a hydrolytic enzyme in clavulanic acid biosynthesis. **Biochemical Journal**, v. 366, p. 423-434, 2002.

ELSON, S. W.; OLIVER, R. S.; BYCROFT, B. W.; FARUK, E. A. Studies on the biosynthesis of clavulanic acid III. Incorporation of DL-[3,4-¹³C₂] glutamic acid. **J of Antibiot**, v. 35, n. 1, p. 81-86, 1982.

ESPESO, E.A.; TILBURN, J.; ARST HN, J.R. e PEÑALVA, M.A. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. **EMBO J**, v. 12, p. 3947–3956, 1993.

ETTLINGER, L.; GÄUMANN, E.; HÜTTER, R.; KELLER-SCHIERLEIN, W.; KRADOLFER, F.; NEIPP, L.; PRELOG, V.; ZÄHNER, H. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, Holomycin. Helvetica. **Chimica Acta**, v. 42, p. 563-569, 1959.

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

FELDMAN, R. M. R.; GUNAWARDENA, U.; URANO J.; MEINHOLD, P.; ARISTIDOU, A.; DUNDON, C. A.; SMITH, C. Yeast organism producing isobutanol at a high yield. US8455239B2. Depósito: 27 Jan. 2011. Concessão: 4 Jun. 2013.

FONSECA, G. A. **Efeito da temperatura e de concentração de amônio na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***. 2018. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.

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

FUENTE DE LA, 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. **J Bacteriol**, v. 184, p. 6559-6565, 2002.

FUENTE DE LA, J.L.; RUMBERO, A.; MARTÍN, J.A.; LIRAS, P. D-1-Piperideine-6-carboxylate dehydrogenase, a new enzyme that forms α -amino adipate in *Streptomyces clavuligerus* and other cephamycin C-producing actinomycetes. **Biochem J**, v. 327, p. 59–64, 1997.

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

GEORGOPAPADAKOU, N. H. β -lactamase inhibitors: evolving compounds for evolving resistance targets. **Exp Opin Investig Drugs**, v. 13, p. 1307–1318, 2004.

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

GOMBERT A. K.; NIELSEN, J. Mathematical of metabolism. **Curr Opin Biotechnol**, v. 11, p. 180-186, 2000.

GRASSO, L. L.; MARTINO, D. C.; ALDUINA, R. Production of antibacterial compounds from Actinomycetes. In: DHANASEKARAN, D.; JIANG, Y. . **Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications**. 2016. cap. 7, p. 179-198.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

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

HEIFETZ A, KEENAN RW, ELBEIN, AD. Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc: dolichyl phosphate GlcNAc-1-phosphate transferase. **Biochem**, v. 18, p. 2186–2192, 1979.

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

INAMINE, E.; BIRNBAUM, J. **Production of cephamycin C by fermentation**. Merck & Co., Inc., Rahway, N.J. GB1466055. Depósito: 11 Dez. 1974. Concessão: 2 Set. 1975.

JENSEN, S. E. e PARADKAR, A. S. Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v. 75, p. 125–133, 1999.

JENSEN, S. E., ELDER, K. J., AIDOO, K. A. e PARADKAR, A. S. Enzymes catalyzing the early steps of clavulanic acid biosynthesis are encoded by two sets of paralogous genes in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 720–726, 2000.

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

KHALEELI, N., LI, R. F. & TOWNSEND, C. A. Origin of the b-lactam carbons in clavulanic acid from an unusual thiamine pyrophosphate mediated reaction. **J Am Chem Soc**, v. 121, p. 9223–9224, 1999.

KHANNAPHO, C.; ZHAO, H.; BONDE, B. K.; KIERZEK, A. M.; AVIGNONE-ROSSA, C. A.; BUSHELL, M.E. Selection of objective function in genome scale flux balance analysis for process feed development in antibiotic production. **Meta Eng**, v. 10, ed. 5, p. 227-233, 2008.

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*. **Biotechnol Progr**, v. 15, p. 1020-1027, 1999.

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

KNORR, A. L.; JAIN, R; SRIVASTAVA, R. Bayesian-based selection of metabolic objective functions. **Bioinformatics**, v. 23, p. 351-357, 2007.

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

LEITE, C. A.; CAVALLIERI, A. P.; ARAUJO, M. L. G. C. Enhancing effect of lysine combined with other compounds on cephamycin C production in *Streptomyces clavuligerus*. **BMC Microbiol**, v. 13, p. 1-11, 2013.

LEITE, C. A.; CAVALLIERI, A. P.; BAPTISTA, A. S.; ARAUJO, M. L. G. C. Dissociation of cephamycin C and clavulanic acid biosynthesis by 1,3-

diaminopropane in *Streptomyces clavuligerus*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 363, ed. 1, p. 1-7, 2016.

LEWIS, N. E.; NAGARAJAN, H.; PALSSON, B.O. Constraining the metabolic genotype–phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods. **Nat Rev Micro**, v. 10, p. 291–305, 2012.

LI, B.; WALSH, C. T. Identification of the gene cluster for the dithiolopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. **PNAS** (Proc Natl Acad Sci USA), v. 107, n. 46, p. 19731-19735, 2010.

LING, L. L.; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A.J., SPOERING, A. L.; ENGLES, I.; CONLON, B. P.; MUELLER, A.; SCHÄBERLE, T. F.; HUGHES, D. E.; EPSTEIN, S.; JONES, M.; LAZARIDES, L.; STEADMAN, V. A.; COHEN, D. R.; FELIX, C. R.; FETTERMAN, K. A.; MILLETT, W. P.; NITTI, A. G.; ZULLO, A. M.; CHEN, CHAO e LEWIS, K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, p. 455-459, 2015.

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

LIRAS, P. Holomycin, a dithiolopyrrolone compound produced by *Streptomyces clavuligerus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.98, n.3, p. 1023-1030, 2014.

LIRAS, P.; GOMEZ-ESCRIBANO, J. P.; SANTAMARTA, I. Regulatory mechanisms controlling antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 35, n. 36, p. 667–676, 2008.

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, v. 18, p. 149-164, 2005.

LITZKA, O.; PAPAGIANNPOLOU, P.; DAVIS, M. A.; HYNES, M. J.; BRAKHAGE, A. A. The penicillin regulator PENR1 of *Aspergillus nidulans* is a HAP-like transcriptional complex. **Eur J Biochem**, v. 251, p. 758-767, 1998.

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

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

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

MARTIN J.F.; DEMAINE A.L . Control of antibiotic biosynthesis. **Microbiol Rev**, v. 44, p. 230-251, 1980.

MARTÍN, J. F.; ALEGRE, M. T. Extrachromosomal genetic elements that control specific enzymes involved in antibiotic biosynthesis: possible involvement of an intracellular pleiotropic effector. In: BOJALIL, L. F.; ORTIZ-ORTIZ, L.; YAKOLEFF, V. (Ed.). **Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes**. Orlando: Academic Press, Inc., p. 273-280, 1984.

MARTÍN, J. F.; CASQUEIRO, J.; KOSALKOVA, K.; MARCOS, A. T.; GUTÉRREZ, S. Penicillin and cephalosporin biosynthesis: Mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 21-31, 1999.

NAGARAJAN, R.; BOECK, L. D.; GORMAN, M.; HAMILL, R. L.; HIGGENS, C. E.; HOEHN, M. M.; STARK, W. M.; WHITNEY, J. G. Beta-lactam antibiotics from *Streptomyces*. **J Am Chem Soc**, v. 93, p. 2308-2310, 1971.

NAKAMURA, C. E.; WHITED, G. M.: Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. **Curr Opin Biotechnol**, v. 14, p. 454-459, 2003.

NARAYANA, K. J. P.; VIJAYALAKSHMI, M. Optimization of Antimicrobial Metabolites Production by *Streptomyces albidoflavus*. **Res J Pharmacol**, v. 2, ed.1, p. 4-7, 2008.

NEWMAN, D. J. ; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, ed. 3, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NICHOLSON, N. H.; BAGGALEY, K. H.; CASSELS, R.; DAVISON, M.; ELSON, S. W.; FULSTON, M.; TYLER, J. W.; WORONIECKI, S. R. Evidence that the immediate biosynthetic precursor of clavulanic acid is its N-aldehyde analog. **J Chem Soc Chem Commun**, v. 11 p.1281–1282, 1994.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Curr Opin Biotechnol**, v. 22, ed. 4, p. 552-558, 2011.

OKAMURA, K.; SOGA, K.; SHIMAUCHI, Y.; ISHIKURA, T. Holomycin and N-propionyl-holothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. **J Antibiot**, v. 30, p.334-336, 1977.

OLIVEIRA, J. H. H. L.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Ácido clavulânico e cefamicina C: Uma perspectiva da biossíntese e mecanismo de ação. **Quim Nova**, v. 32, n. 8, p. 2142-2150, 2009.

OMSTEAD, D. R.; HUNT, G. H.; BUCKLAND, B. C. Commercial production of cephamycin antibiotics. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive biotechnology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 3, cap. 9, p. 187-210.

PADDON, C. J.; WESTFALL, P. J.; PITERA, D. J.; BENJAMIN, K.; FISHER, K.; MCPHEE, D.; LEAVELL, M. D.; TAI, A.; MAIN, A.; ENG, D.; POLICHUK, D. R.; TEOH, K. H.; REED, D. W.; TREYNOR, T.; LENIHAN, J.; FLECK, M.; BAJAD, S.; DANG, G.; DENGROVE, D.; DIOLA, D.; DORIN, G.; ELLENS, K. W.; FICKES, S.; GALAZZO, J.; GAUCHER, S. P.; GEISTLINGER, T.; HENRY, R.; HEPP, M.;

HORNING¹, T.; IQBAL, T.; JIANG¹, H.; KIZER¹, L.; LIEU¹, B.; MELIS¹, R. D.; MOSS¹, N.; REGENTIN, R.; SECREST¹, S.; TSURUTA, H.; VAZQUEZ, R.; WESTBLADE, L. F.; XU, L.; YU, M.; ZHANG, Y.; ZHAO, L.; LIEVENSE, J.; COVELLO, P. S.; KEASLING, J. D.; REILING, K. K.; RENNINGER, N. S.; NEWMAN, J. D. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. **Nature**, v. 496, p. 528-532, 2013.

PALMER, J. M.; KELLER, N. P. Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter?. **Curr Opin Microbiol**, v. 13, p. 431-436, 2010.

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

PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. The Renaissance of Natural product as Drugs Candidates. **Science**, v. 310, ed. 5747, p. 451-453, 2005.

PEREZ-REDONDO, R., RODRIGUEZ-GARCIA, A., MARTIN, J. F. & LIRAS, P. The *claR* gene of *Streptomyces clavuligerus*, encoding a LysR-type regulatory protein controlling clavulanic acid biosynthesis, is linked to the clavulanate-9-aldehyde reductase (*car*) gene. **Gene**, v. 211, p. 311–321, 1998.

PITLIK J, TOWNSEND CA. The fate of [2, 3, 3-²H₃, 1, 2-¹³C₂] D, L-glycerate in clavulanic acid biosynthesis. **J Chem Soc Chem Commun**, p. 225–6, 1997

PRICE, N. P. J.; TSVETANOVA, B. Biosynthesis of the tunicamycins: a review. **J Antibiot**, v. 60, n. 8, p. 485-491, 2007.

PRICE, N.D.; REED, J.L.; PALSSON, B.Ø. Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. **Nat Ver Microbiol**, v. 2, p. 886–897, 2004.

QIN, Z.; BAKER, A. T.; RAAB, A.; SHENG, H.; WANG, T.; YU, Y.; JASPARS, M.; SECOMBES, C. J.; DENG, H. The fish pathogen *Yersinia ruckeri* produces holomycin and uses an RNA methyltransferase for self-resistance. **Biol Chem**, v. 288, n. 21, p. 14688-14697, 2013.

RAJNISZ, A; GUSPIEL, A.; POSTEK, M.; ZIEMSKA, J.; LASKOWSKA, A.; RABCZENKO, D.; SOLECKA, J. Characterization and Optimization of Biosynthesis of Bioactive Secondary Metabolites Produced by *Streptomyces* sp. 8812. **Pol J Microbiol**, v. 65, n. 1, p. 51-61,

ROBLES-REGLERO, V.; SANTAMARTA, I.; ÁLVAREZ-ÁLVAREZ, R.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. **J Biotechnol**, v. 163, n. 1, p. 69-76, 2013.

RODRIGUES, K. C. S. **Estudo da influência do pH e da temperatura na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em biorreator convencional**. 2015. 69 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias para o

Desenvolvimento Sustentável) – Universidade Federal de São José Del Rei, Ouro Branco, 2015.

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

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTIN, J. F. Utilization of ornithine and arginine as specific precursors of clavulanic acid. **Appl Environ Microbiol**, v. 52, p. 892-897, 1986.

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

SÁNCHEZ, C.; QUINTERO, J. C; OCHOA, S. Flux balance analysis in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnol Progr**, v. 1, p. 1-11, 2015.

SANCHEZ, S.; CHAVEZ, A.; FORERO, A.; GARCÍA-HUANTE, Y.; ROMERO, A.; SÁNCHEZ, M.; ROCHA, D.; SÁNCHEZ, B.;ÁVALOS, M.; GUZMÁN-TRAMPE, S.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R.; LANGLEY, E.; RUIZ, B. . Carbon source regulation of antibiotic production. **J Antibiot**, v.63, p.442-459, 2010.

SANCHEZ, S.; DEMAINE, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme Microb Technol**, v. 31, p. 895-906, 2002.

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

SCHUETZ, R.; KUEPFER, L.; SAUER, U. Systematic evaluation of objective functions for predicting intra cellular fluxes in *Escherichia coli*. **Mol Syst Biol**, v. 3, p. 119-134, 2007.

SIMPKIN, V. L.; RENWICKL, M. J.; KELLY, R.; MOSSIALOS, E. Incentivising innovation in antibiotic drug Discovery and development: progress, challenges and next steps. **J Antibiot**, v. 70, p. 1087-1096, 2017.

SOUZA, M. A. **Investigação sobre associações entre fonte de nitrogênio e produção de compostos bioativos por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos submersos**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

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

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

STEPHANOPOULOS, G. Metabolic fluxes and metabolic engineering. **Metab Eng**, v. 1, p. 1-11, 1998.

STEPHANOPOULOS, G. Metabolic fluxes and metabolic engineering. **Metab Eng**, v. 1, p. 1-11, 1999.

TEODORO, J. C.; BAPTISTA.NETO, A.; ARAUJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Influence of glycerol and ornithine feeding on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Braz J Chem Eng**, v. 27, n. 4, p. 499-506, 2010.

THIRKETTLE JE, BALDWIN JE, EDWARDS J, GRIFFIN JP, SCHOFIELD CJ. The origin of the β -lactam carbons of clavulanic acid. **J Chem Soc Chem Commun**, p. 1025–1026, 1997.

TIWARI, K.; GUPTA, R. K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. **Crit Rev Biotechnol**, v. 32, p. 108-132, 2012.

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

TOWNSEND CA, HO MF. Biosynthesis of clavulanic acid: origin of C5 unit. **J Am Chem Soc**, v. 107, p. 1065–6, 1985.

TRINH, C. T.; THOMPSON, R. A. Elementary Mode Analysis: A Useful Metabolic Pathway Analysis Tool for Reprogramming Microbial Metabolic pathways. In: WANG, X.; CHEN, J.; QUINN, P. **Reprogramming Microbial Metabolic Pathways**. 2012.cap. 2, p. 21-42.

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

UMEZAWA, H . Trends in antibiotic research and its expanded area. Antibiotics and low molecular weight immunomodifiers. **Japan Antibiotics Research Association**, p. 1-15, 1982.

VALENTINE B.P.; BAILEY C.R.; DOHERTY A.;MORRIS J.;ELSON S.W.;BAGLEY K.H.;NICHOLSON, N. H. Evidence that arginine is later metabolic intermediate than ornithine in the biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. **J. Chem Soc Chem Commun**, p.1210–1211, 1993.

VILLADSEN, J.; NIELSEN, J.; LIDÉN, G. Biochemical reaction networks. In: **Bioreaction Engineering Principles**, Ed. Springer, p. 151-215, 2011.

VOELKER F.;ALTABA, S. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in '*Streptomyces pristinaespiralis*'. **Microbiol**, v. 147, p. 2447-2459, 2001.

VOIT, E. O. The best models the metabolismo. **WIREs Syst Biol Med**, v. 9, ed. 1391, p. 1-26, 2017.

WALKER, M. C.; DONK, W. A. The many roles of glutamate in metabolism. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 43, p. 419-430, 2016.

WEI, Z.; XU, C.; WANG, J.; LU, F.; BIE, X.; LU, Z. Identification na characterization of *Streptomyces flavogriseus* NJ-4 as a novel producer of actinomycin D and holomycin. **PeerJ**, p. 1-19, 2017.

WIECHERT, W. Modeling and simulation: tools for metabolic engineering. **J. Biotechnol**, v. 94, p. 37–63, 2002.

WIETZ, M.; MANSSON, M.; GOTFREDSEN, C.,H.; LARSEN, T. O.; GRAM, L. Antibacterial Compounds from Marine Vibrionaceae Isolated on a Global Expedition. **Mar Drugs**, v. 8, p. 2946-2960, 2010.

WOHLLEBEN, W.; BERA, A.; MAST, Y.; STEGMANN, E. Regulation of secondary metabolites of actinobacteria. In: WINK, J.; MOHMMADIPANAH, F.; HAMED, J. **Biology and Biotechnology of Actinobacteria**. 2017.cap. 8, p. 2-49.

WRIGHT, G. D. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug Discovery. **Can J Microbiol**, v. 60, p. 147-154, 2014.

XUE, Z.; SHARPE, P.L.; HONG, S.P, YADAV, N.S.; XIE, D.; SHORT, D.R.; DAMUDE, H.G.; RUPERT, R.A.; SEIP, J.E.; WANG, J.; POLLAK, D.W.; BOSTICK, M.W.; BOSAL, M.D.; MACOOL, D.J.; HOLLERBACH, D.H.; ZHANG, H.; ARCILLA, D.M.; BLEDSOE, S.A.; CROKER, K.; MCCORD, E.F.; TYREUS, B.D.; JACKSON, E.N.; ZHU, Q. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. **Nat Biotechnol**, v.31, p. 734-740, 2013.

YIM, H.; HASELBECK, R.; NIU, W.; PUJOL-BAXLEY, C.; BURGARD, A.; BOLDT, J.; KHANDURINA, J.; TRAWICK, J. D.; OSTERHOUT, R. E.; STEPHEN, R.; ESTADILLA, J.; TEISAN, SY.; SCHREYER, H. B.; ANDRAE, S.; YANG, T. H.; LEE, S. Y.; BURK, M. J.; VAN DIEN, S. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. **Nat Chem Biol**, v. 7, p. 445-452, 2011.

ZAKRZEWSKI, P.; MEDEMA, M. H.; GEVORGYAN, A.; KIERZEK, A. M.; BREITLING, R.; TAKANO, E. MultiMetEval: comparative and multi-objective analysis of genome-scale metabolic models. **PLoS One**, v. 7, p. 1-9, 2012.

ZHU, H.; SANDIFORD, S. K.; VAN WEZEL, G. P. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 41, p. 371-386, 2014a.

ZHU, X.; TAN Z, X.U .H.; CHEN, J.; TANG, J.; ZHANG, X. Metabolic evolution of two reducing equivalent-conserving pathways for high-yield succinate production in *Escherichia coli*. **Metab Eng**, v. 24, p. 87-96, 2014b.