

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

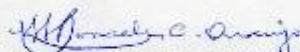
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: AMANDA SALVADOR BAPTISTA

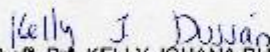
ORIENTADORA: MARIA LUCIA GONSALES DA COSTA ARAUJO

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



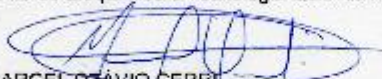
Prof.^a Dr.^a MARIA LUCIA GONSALES DA COSTA ARAUJO

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



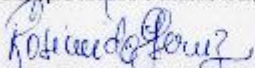
Prof.^a Dr.^a KELLY JOTHANA DUSSAN MEDINA

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



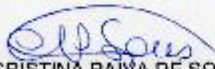
Prof. Dr. MARCEL OTÁVIO CERRI

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / 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 Extras, 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 $\text{ca. } 400 \text{ mg.L}^{-1}$ de cefamicinaC, um valor de $\text{gt } 3$ 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.

2 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho propôs explorar as atuações individuais dos aminoácidos lisina e glutamato exógenos no processo em batelada de produção de CefC.

Este objetivo foi atingido com o cumprimento das seguintes atividades.

2.1 Objetivos específicos

- a) Foram realizados cultivos preliminares em frascos agitados em meios quimicamente definidos variando-se a composição dos aminoácidos glutamato e lisina;
- b) Cultivos submersos foram realizados em biorreator empregando as melhores condições de cultivo em frascos agitados para a produção de CefC;
- c) Foram realizados balanços, de N com intuito de comparar a porcentagem de N entre as variáveis analisadas e de C para distribuição de fluxos metabólicos;
- d) Foi simulado o modelo metabólico de *S. clavuligerus*, utilizando a metodologia de análise de equilíbrio de fluxos metabólicos, para comparar os processos em biorreator;
- e) Foi proposto e simulado um modelo matemático para comparar o comportamento cinético dos cultivos em biorreator;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

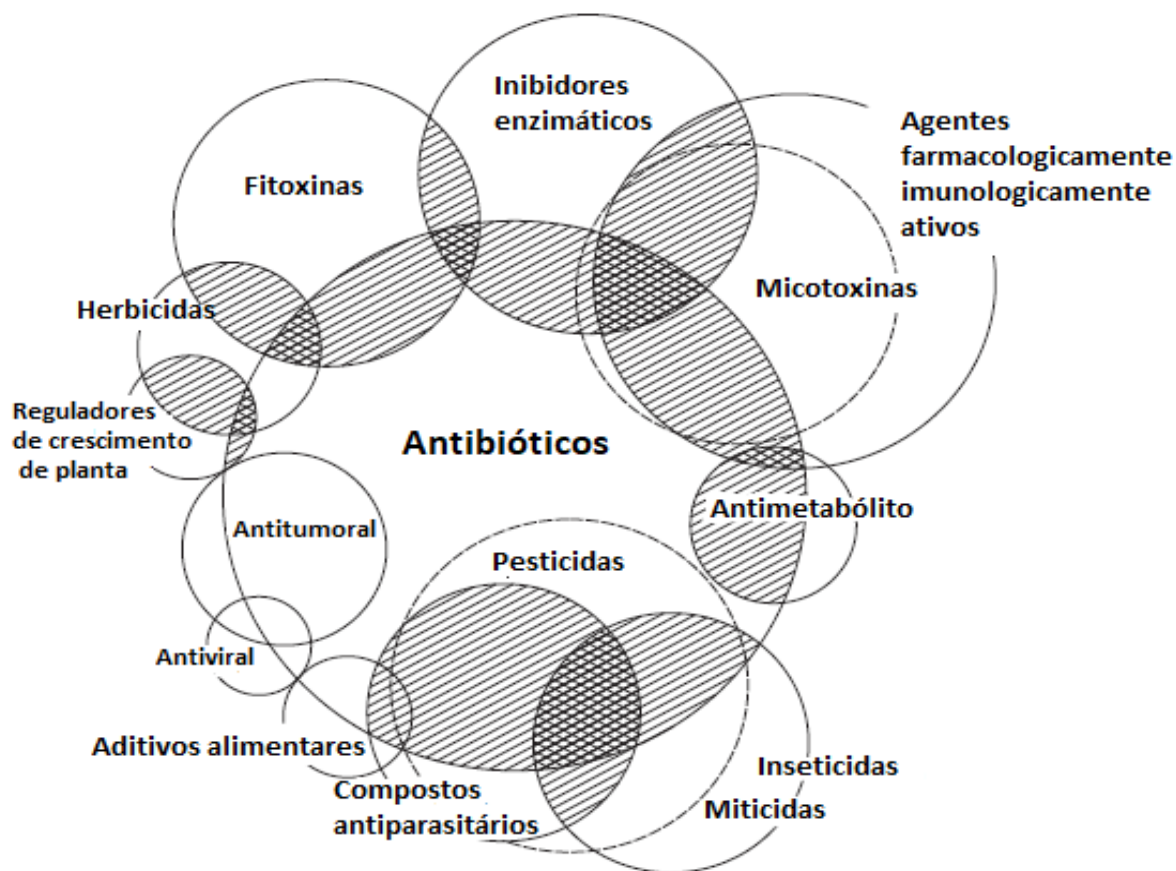
3.1 Biocompostos microbianos

Nos últimos 60 anos o uso de compostos com bioatividade tem contribuído para melhorar a saúde humana, a partir da produção de produtos que auxiliam em tratamentos terapêuticos, que podem amenizar e até mesmo curar certos tipos de enfermidades (NEWMAN et al., 2012; CRAGG e NEWMAN 2013). Hoje sabemos que estes compostos extremamente complexos são denominados metabólitos secundários, produzidos por muitos organismos vivos, como os micro-organismos.

O metabolismo secundário não é um processo essencial para o desenvolvimento dos organismos, porém, favorece a sobrevivência destes no seu ambiente natural (MARTIN e DEMAINE, 1980). Estes metabólitos são biossintetizados pelos micro-organismos a bilhões de anos, deste modo, muitas pesquisas em torno da função destes compostos já foram realizadas. A real importância da biossíntese para os micro-organismos ainda não está completamente elucidada, mas sabe-se que estes biocompostos são utilizados como sinais químicos para inibir a concorrência microbiana (BRAKHAGE et al., 2013; CHALLINOR e BODE, 2015).

Estes compostos possuem uma vasta diversidade de estruturas químicas (Figura 3.1), tendo diversas aplicações industriais. A variedade de metabólitos secundários inclui antitumorais, antifúngicos, imunossuppressores, inseticidas, herbicidas, pigmentos, inibidores de beta-lactamases, uma infinidade de antibióticos e muitos outros (NEWMAN e CRAGG, 2007; BRAKHAGE e SCHROECKH, 2011; GRASSO et al., 2016).

Figura 3.1: Diversidade de bioativos.



Fonte: Berdy, (2012).

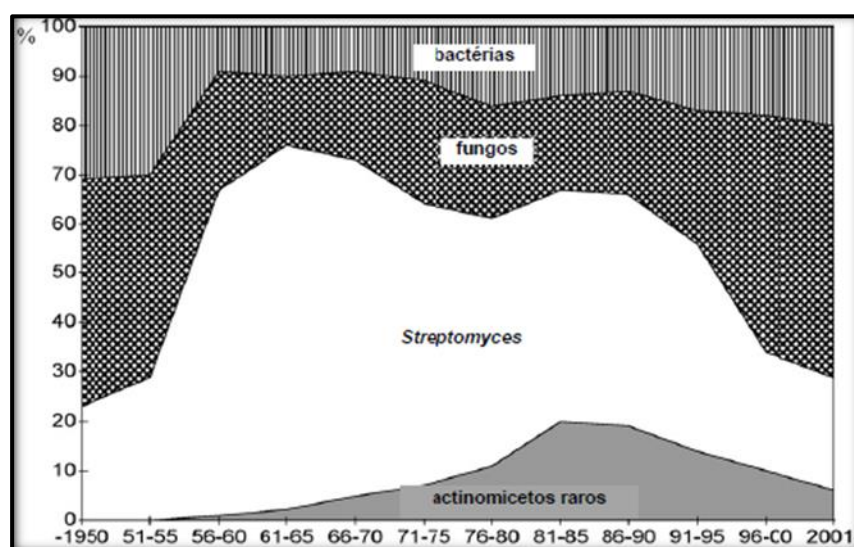
Foi a partir de 1928, com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, que as pesquisas com biocompostos ativos ganharam um papel de destaque mundialmente, resultando no desenvolvimento de muitos medicamentos que ainda são empregados atualmente em tratamento de várias doenças. Porém, em 1970 existiam apenas duas classes de antibióticos beta-lactâmicos conhecidas, as penicilinas e as cefalosporinas. A descoberta de novos antibióticos só foi possível com a melhoria e o desenvolvimento de novas estratégias de isolamento (WELLS et al., 1982).

Os avanços nas metodologias de técnicas de separação e sequenciamento genético impulsionaram o estudo da biossíntese de produtos naturais, ultrapassando um milhão de compostos descobertos, sendo 5% deste valor de origem microbiana (DEMAIN e SANCHEZ, 2009; O'BRIEN e WRIGHT, 2011). Apesar da baixa porcentagem, os micro-organismos desempenham um papel importante no cenário dos biocompostos, por serem responsáveis por 23000 dos compostos com atividade

já descobertos, sendo 42% produzido por fungos e 32% por actinomicetos (DEMAIN, 2014). No entanto menos de 1% destes biocompostos são empregados na agricultura e para fins terapêuticos em humanos e animais (BERDY, 2005).

Os actinomicetos possuem grande importância histórica nas pesquisas de metabólitos secundários, na década de 50 a 70, aproximadamente 60% dos novos antibióticos isolados eram exclusivamente produzidos por actinobactérias (BERDY, 2012). Sendo o gênero *Streptomyces* responsável por 75% de todos os compostos descobertos nesta classe (Figura 3.2). Muitos destes micro-organismos, geralmente, são produtores de vários metabólitos secundários, por exemplo, a biossíntese de *Streptomyces hygroscopicus* supera 180 bioativos (AWAD et al., 2012).

Figura 3.2: Distribuição dos antibióticos descobertos até 2001, de acordo com sua origem.



Fonte: Bérdy, (2005).

A estreptomicina foi o primeiro antibiótico isolado do gênero *Streptomyces* em 1944, por Waksman & Henrici (CHATER, 2006). A partir deste antibiótico outros foram descobertos, alguns exemplos são: a eritromicina (*S. erythreus*), cloranfenicol (*S. Venezuela*), lincomicina (*S. lincolnensis*), vancomicina (*S. orientalis*), daptomicina (*S. roseosporus* ou *S. pristinaespiralis*), rifamicina (*S. mediterranei*), estreptograminas (*S. pristinaespiralis*) e platensimicina (*S. platensi*) (GUIMARÃES et al., 2010). Existe uma diversidade imensa de antibióticos sintetizados pelo gênero *Streptomyces*, apesar disto, ainda hoje os beta-lactâmicos são os mais utilizados para o tratamento

de infecções (TORTORA et al., 2010), isto graças a sua alta especificidade e pela baixa toxicidade (BRAKHAGE, 1998).

A Tabela 3.1 apresenta o número de compostos naturais conhecidos até o ano de 2010.

Tabela 3.1: Número aproximado de produtos naturais conhecidos até o ano de 2010.

	Conhecidos	Bioativos	Antibióticos	Perspectivas
Produtos Naturais	+500000	80-100000	30-40000	+++
Metabólitos microbianos	60-80000	32-34000	25-27000	++
Actinobactéria	~20000	~12000	~10000	++
Fungo	~30000	~15000	~10000	++
Bactéria unicelular	~20000	~7000	~5000	+
Organismos superiores: Plantas				
Plantas pequenas	50-60000	~6000	~100-20	?
Plantas superiores	300-350000	~25000	~15000	+
Animais				
Invertebrados marinhos	25-30000	~10000	~5000	++
Animais terrestres	4-5000	~200	~100	?
Compostos sintéticos				
Antibióticos semissintéticos	+200000	?	Quase todos	++
Análogos	+50000	?	Poucos	+
Totalmente sintéticos	~Milhões	?	~1000	±

Fonte: Berdy, (2012).

Apesar do grande sucesso destes compostos na vida humana, a busca por novos bioativos vem sendo reduzida nos últimos anos pelas dificuldades encontradas no processo de obtenção do produto de interesse. Dentre os problemas encontrados, pode-se destacar o longo tempo de desenvolvimento do medicamento, o baixo rendimento, dificuldade do aumento de escala do processo, no cultivo dos micro-organismos em laboratório, no isolamento e purificação do novo composto (PATERSON e ANDERSON, 2005; BODE et al., 2015). Todos os fatores citados acima tornam a descoberta dos compostos naturais menos lucrativas. Neste contexto, muitas das grandes empresas farmacêuticas têm desistido deste mercado e investido em medicamento de uso terapêutico para doenças crônicas (Tabela 3.2).

Apenas instituições acadêmicas e pequenas empresas especializadas em biotecnologia farmacêutica permanecem pesquisando novos compostos naturais (Berdy, 2012; David et al., 2015).

Tabela 3.2: Empresas que cessaram ou continuam bioprospectando entre 2000 e 2013.

Pararam de bioprospectar	Em atividade
Abbott	Dabur
Astellas	Eisai
Bayer	Novartis
Boehringer Ingelheim	Otsuka
Bristol-Myers Squibb	Pierre Fabre
Daiichi Sankyo	Piramal
Eli Lilly	
GlaxoSmithKline	
Johnson and Johnson	
Kyowa Hakko	
Merck Sharp and Dohme	
Novo Nordisk	
Pfizer	
Roche	
Sanofi	
Servier	
Takeda	

Fonte: David et al., (2015).

Porém o desenvolvimento de compostos sintéticos que sejam eficientes como os compostos naturais, tem sido um grande desafio para as indústrias farmacêuticas. A grande vantagem dos produtos naturais, é que por serem produtos da evolução microbiana, estes compostos foram selecionados precisamente por sua capacidade de difundir-se nas células bacterianas (WRIGHT, 2014).

Logo, a descoberta de novos antibióticos é necessária, visto que a resistência bacteriana tem causado inúmeras mortes ao redor do mundo. Acredita-se que a resistência a antibióticos pode causar até 2050, 10 milhões de morte com um custo econômico estimado em 100 trilhões de dólares (SIMPKIN et al, 2017). Entre 2000 e 2015 foram lançados 30 novos compostos ativos, e muitos outros estão em fase de testes clínicos (BUTLER, 2016). Na Tabela 3.3 e 3.4 estão apresentados apenas os originados de produtos naturais.

Tabela 3.3:Antibióticos e inibidores de beta-lactamases lançados entre 2000 e 2015.

Ano de aprovação	Nome do fármaco	Classe	1º país a aprovar	Origem	Fonte de produto natural
2001	Telitromicina	Macrolídeo	Alemanha	Derivado PN	Actinomicetos
2002	Biapenem	Carbapenema	Japão	Derivado PN	Actinomicetos
2002	Ertapeném	Carbapenema	EUA	Derivado PN	Actinomicetos
2003	Daptomicina	Lipopeptídeo	EUA	PN	Actinomicetos
2004	Germifloxacino	Fluoroquinilona	EUA	Derivado PN	Actinomicetos
2005	Doripenem	Carbapenema	Japão	Derivado PN	Actinomicetos
2005	Tigeciclina	Tetraciclina	EUA	Derivado PN	Fungos
2008	Ceftobiprole medocaril	Cefalosporina	Canadá	Derivado PN	Fungos
2009	Tabipenem pivoxil	Carbapenema	Japão	Derivado PN	Actinomicetos
2009	Telavancin	Glicopeptídeo	EUA	Derivado PN	Actinomicetos
2010	Ceftarolina fosamil	Cefalosporina	EUA	Derivado PN	Fungos
2011	Fidaxomicina	Tiacumicina	EUA	PN	Actinomicetos
2014	Dalbavanicina	Glicopeptídeo	EUA	Derivado PN	Actinomicetos
2014	Ceftozane + tazobactam	Beta- lactâmico+ Inibidor de beta lactamases	EUA	Derivado PN	Fungos/ Actinomicetos
2015	Ceftazidima + avibactam	Beta-lactâmico + DBO inibidor de beta- lactamases	EUA	Derivado PN/Sintético	Fungos

Fonte: Butler, (2016).

Tabela 3.4: Medicamentos em teste clínico.

Nome (sinônimo)	Classe do composto	Desenvolvedor	Testes clínicos
BAL30072/Meropeném	Monobactam/Carbapenema	Basilea	Fase I
TD-1607	Glicopeptídeo-cefalosporina	Theravance Biopharma	Fase I
MGB-BP-03	Distamicina A	MGB Biopharma	Fase I
Cloreto de exporfinium	Porfirina	Destiny Pharma	Fase II
Auriclosene	N-clorotaurina	Novabay	Fase II
Lefamulina	Pleuromutilina	Nabriva	Fase II
CB-06-01	Tiopeptídeo	Cassiopea S.p.A	Fase II
Cefiderocol (S-649266)	Cefalosporina de sideróforo	Shionogi	Fase II
Solitromicina	Eritromicina	Cempra	Fase III
Omadaciclina	Tetraciclina	Paratek	Fase III
Sareciclina	Tetraciclina	Allergen	Fase III
Eravaciclina	Tetraciclina	Tetraphase	Fase III
Surotomicina	Lipopeptídeo (Daptomicina)	Merck	Fase III
Plazomicina	Aminoglicosídeo	Achaogen	Fase III
Cefilavancina	Cefalosporina/ Vancomicina	R-Pharm/ Theravance Biopharma	Fase III

Fonte: Butler, (2016).

Apesar da crise dos antibióticos e de muitas empresas terem abandonado esse ramo farmacêutico, na medida em que os casos de resistência bacteriana têm aumentado, algumas empresas de grande porte têm voltado a investir em pesquisas para solucionar este problema. A Roche, por exemplo, tornou-se parceira de várias empresas biotecnológicas de pequeno porte que visam à produção de antibiótico e em 2014 adquiriu a Merck. Existe uma forte tendência em pesquisas sobre antibióticos pelas pequenas empresas de biotecnologia (“startups”), tais como as americanas Macrolide Pharmaceuticals, Kaleido Biosciences e Spero Therapeutics (BUTLER, 2016).

Na Europa existem cerca de 40 empresas de biotecnologia contra a resistência antimicrobiana (BEAM), empenhadas no desenvolvimento de produtos capazes de combater a resistência bacteriana (BEAM, 2015)

Atualmente, muitas metodologias têm auxiliado na busca de novos produtos eficazes contra a resistência aos antibióticos existentes, como o sequenciamento de genoma completo, ferramentas de bioinformática, técnicas de química analítica e a biologia sintética (WRIGHT 2014). Um exemplo do uso destas novas técnica é o

dispositivo denominado i-Chip, desenvolvido pela empresa NovoBiotic Pharmaceuticals, que é utilizado para isolar e cultivar bactérias *in situ*. Esse dispositivo auxiliou na descoberta do novo antibiótico teixobactina (LING et al., 2015).

De acordo com as previsões de Simpkin e colaboradores (2017), sobre o aumento de micro-organismos resistentes aos atuais medicamentos nos próximos 30 anos, é muito importante continuar investindo na busca e no estudo de compostos com atividade antimicrobiana para o desenvolvimento de novas terapias, que visem o tratamento de doenças infecciosas.

3.2 *Streptomyces clavuligerus*

O gênero *Streptomyces*, como mencionado no item anterior (item 3.1), é muito importante no cenário de compostos naturais, pois trata-se de um grupo de bactérias filamentosas Gram positivas e que possui uma grande diversidade de espécies com alta capacidade de produção de biocompostos. Uma espécie bastante estudada é o *Streptomyces clavuligerus*, isolado de uma amostra de solo na América do sul por Higgins e Kastner (1971). Como a maioria dos actinomicetos, *S. clavuligerus* é um micro-organismo aeróbio estrito e com crescimento na faixa de temperatura de 28 a 45°C e pH entre 6,5 e 8,0 (BALLOWS et al., 1992).

S. clavuligerus possui algumas particularidade, como a presença do ciclo da ureia, algo incomum em procariotos (BUSHELL et al., 2006), e a incapacidade de crescimentos em meios de cultura compostos por certos tipos carboidratos como única fonte de carbono (C), como em alguns tipos hexoses (glicose, manose e galactose), pentoses (frutose, xilose, manitol e sorbitol) e dissacarídeos (lactose ou sacarose). Este micro-organismo metaboliza de forma eficiente apenas glicerol, maltose e amido como fontes principais de C e energia (GARCIA.DOMINGUEZ et al., 1989).

A diversidade produtiva desta espécie a coloca em uma posição de destaque na indústria farmacêutica, uma vez que é reportado na literatura a biossíntese de pelo menos 21 metabólitos secundários (ROMERO et al., 1984; SAUDAGAR et al., 2008). Dentre vários metabólitos destaca-se o inibidor de beta-lactamase AC, que frequentemente é administrado em conjunto com antibióticos beta-lactâmicos (DOMINGUES et al, 2010). Outro importante composto biossintetizado por *S.*

clavuligerus é o antibiótico beta-lactâmico CefC, que possui uma maior resistência a ação das enzimas beta-lactamases (OMSTEAD et al., 1985; BUSSARI et al, 2009).

Além de CefC, outros dois antibióticos não beta-lactâmico, também são produzidos, denominados Tun e Hol. Tun é uma mistura de homólogos de nucleosídeos, essa mistura bloqueia a formação de glicoproteínas em procariotos e eucariotos (HEIFETZ et al., 1979; PRICE e TSVETANOVA, 2007). Hol é uma dipirrolona de coloração amarelo-ouro e possui alta atividade citotóxica a várias linhagens cancerígenas, inclusive em células de mamíferos (LI e WALSH, 2010; LIRAS, 2014).

Visto a diversidade de metabólitos secundários de *S. clavuligerus*, essa espécie tem sido alvo de muitos estudos. Esses estudos têm investigado em as complexas reações envolvidas nos mecanismos de regulação das biossínteses de metabólitos, com auxílio de ferramentas das ciências biológicas e que tem permitido angariar muitas informações sobre o metabolismo celular (FUENTE et al., 2002).

3.3 Ácido Clavulânico

Com o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos, a eficiência dos tratamentos convencionais contra as infecções podem sofrer ameaças, o que torna essencial a busca por novas estratégias para contornar esse problema. Nesse contexto os inibidores de beta-lactamases têm desempenhado um papel importante no cenário mundial (SAUDAGAR et al., 2008).

Por volta de 1960, Beecham Research Laboratories iniciou pesquisas para isolar micro-organismos que produzissem inibidores de beta-lactamases (BAGGALEY et al, 1997; OLIVEIRA et al, 2009). Para isso, ensaios microbiológicos foram realizados com a bactéria *Klebsiella aerogenes*, que é resistente aos antibióticos beta-lactâmicos. Uma grande variedade de amostras oriundas do solo foi testada em conjunto com Benzilpenicilina, em uma dessas condições observaram a atividade inibitória de beta-lactamase, inibindo assim, a bactéria utilizada no teste (BUTTERWORTH, 1984; BAGGALEY et al, 1997).

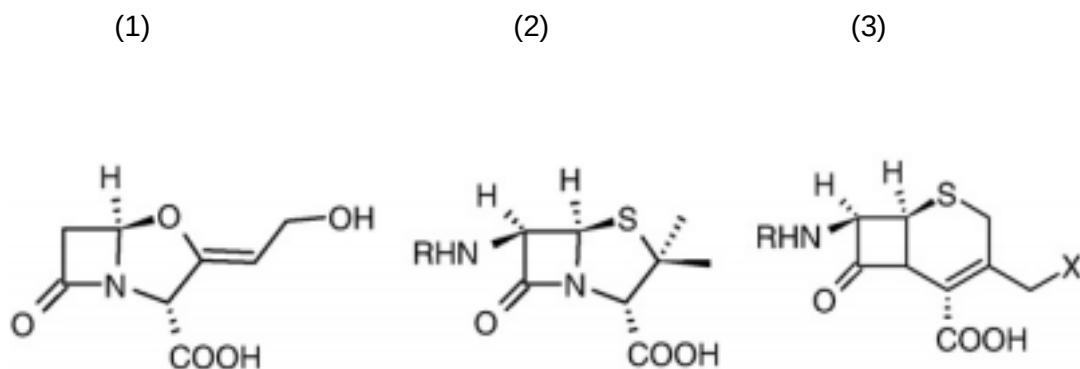
Inicialmente, o ácido clavulânico foi identificado em culturas de *Streptomyces clavuligerus*, posteriormente, várias outras *Streptomyces sp.*, demonstraram capacidade de produzir esse composto, exemplos disso são *Streptomyces jumonjinensis* e *Streptomyces katsurahamanus* (JENSEN e PARADKAR, 1999).

Porém, a *S. clavuligerus* tem sido a linhagem mais estudada e utilizada comercialmente para produção de AC (PARADKAR, 2013). O Clavulin® é um exemplo comercial importante da junção de AC e antibiótico, composto por clavulanato de potássio e amoxicilina, bastante utilizado no tratamento de infecções resistentes (DOMINGUES et al, 2010; TORTORA et al, 2010).

A combinação de AC com antibióticos beta-lactâmicos tem sido promissora contra infecções causada por bactérias gram positivas, como *Staphylococcus sp.*, e contra bactérias gram negativas, tais como *Klebsiella sp.*, *Hemophilus sp.*, *Proteus*, *Shigella*, *Pseudomonas* (PARADKAR, 2013).

A estrutura química de AC (Figura 3.2) foi descrita por Brown et al. (1976), esse composto é caracterizado pela presença do anel bicíclico (beta-lactâmico e o oxazolidínico). O AC foi o primeiro composto natural em que o anel beta-lactâmico não apresentou ligação com enxofre e esse composto possui atividade inibitória contra a maioria das classes de beta-lactamases, incluindo penicilinas e cefalosporinas (BUTTERWORTH, 1984; BAGGALEY et al, 1997; SAUDAGAR et al., 2008).

Figura 3.3: Estrutura química de compostos beta-lactâmicos: (1) Estrutura do ácido clavulânico, (2) Estrutura das penicilinas e (3) Estrutura das cefalosporinas.



Fonte: SAUDAGAR et al., (2008).

A inibição das beta-lactamases ocorre devido as semelhanças entre a estrutura química de AC e os antibióticos beta-lactâmicos. O AC atua como um agente suicida, em que a hidroxila da serina (presente na enzima) liga-se ao anel beta-lactâmico do inibidor de beta-lactamase, essa ligação causa a inibição irreversível da enzima, impedindo assim a degradação do anel beta-lactâmico do antibiótico e protegendo a sua bioatividade (GEORGOPAPADAKOU, 2004). A Figura 3.3 apresenta as estruturas químicas de alguns compostos beta-lactâmicos.

3.4 Biossíntese de Ácido clavulânico

As informações sobre a biossíntese de AC ainda são insuficientes para sua elucidação completa (OLIVEIRA et al., 2009), mas estudos indicam que a via biossintética deste composto não segue as dos demais compostos beta-lactâmicos, ou seja, a biossíntese não tem início com o tripeptídeo L-alfa-aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (ELSON et al., 1982). Alguns autores propuseram que os aminoácidos (arginina e ornitina) e intermediários da via glicolítica (glicerato e piruvato) seriam precursores de AC (TOWNSEND e HO, 1985; ROMERO et al, 1986). Anos mais tarde, apontaram que arginina e piruvato são precursores diretos da biossíntese de AC (VALENTINE et al., 1993; PITLIK e TOWNSEND, 1997; THIRKETTLE et al., 1997) e em 1999 Khaleeli e colaboradores constataram que gliceraldeído-3-fosfato é incorporado na rota biossintética de AC.

Sabe-se que a biossíntese de AC (Figura 3.4) inicia com a condensação de gliceraldeído-3-fosfato com L-arginina para formar N²-(2-carboxietil) arginina, seguida de sucessivas reações até a formação de ácido clavamínico, etapas comuns a rota biossintética de outras clavamas. Posteriormente, o ácido clavamínico sofre uma epimerização dupla e uma desaminação oxidativa, formando o clavaldeído. Na etapa seguinte, a conversão de clavaldeído em AC, ocorre por meio de uma enzima desidrogenase dependente de NADPH (clavaldeído desidrogenase) (NICHOLSON et al., 1994; PEREZ-REDONDO et al., 1998; JENSEN et al., 2000).

Gliceraleído-3-Fosfato
+
Arginina

CEAS

N²-(carboxietil)-arginina

BLS

Ácido deoxiguanidino proclavamínico

CAS

Ácido guanídino proclavamínico

PAH

Ácido proclavamínico

CAS

Ácido dihidroclavamínico

CAS

Ácido clavamínico

?

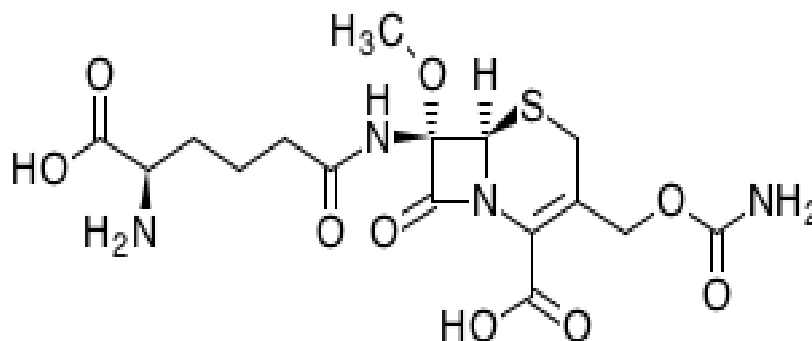
Clavaleído

CAD

Ácido Clavulánico

3.5 Cefamicina C

Figura 3.5: Estrutura química da Cefamicina C.



36

Esse antibiótico possui maior resistência a beta-lactamases, isso ocorre devido pela presença de um grupo metoxi na posição 7 alfa do seu anel bicíclico, que atua como estabilizador do anel beta-lactâmico, reduzindo a sensibilidade as estas enzimas. (OMSTEAD et al., 1985; BUSSARI et al, 2009). Embora possua maior resistência a ação das enzimas beta-lactamases, seu espectro de inibição restringe-se apenas a bactérias gram-positivas. Algumas modificações químicas na molécula foram propostas para aumentar a atividade antibiótica em bactérias gram-negativas, exemplos dessas modificações são os compostos semi-sintéticos Cefoxitina produzido pela Merck & Co Inc., e Cefometazol e o Cefotetana (UMEZAWA, 1982; OMSTEAD et al., 1985).

Dessa forma, descoberta de CefC foi extrema importância para o desenvolvimento dos antibióticos semi-sintético, pois foi o primeiro composto beta-lactâmico a mostrar-se resistente a ação das enzimas lactamases (LIRAS, 1999).

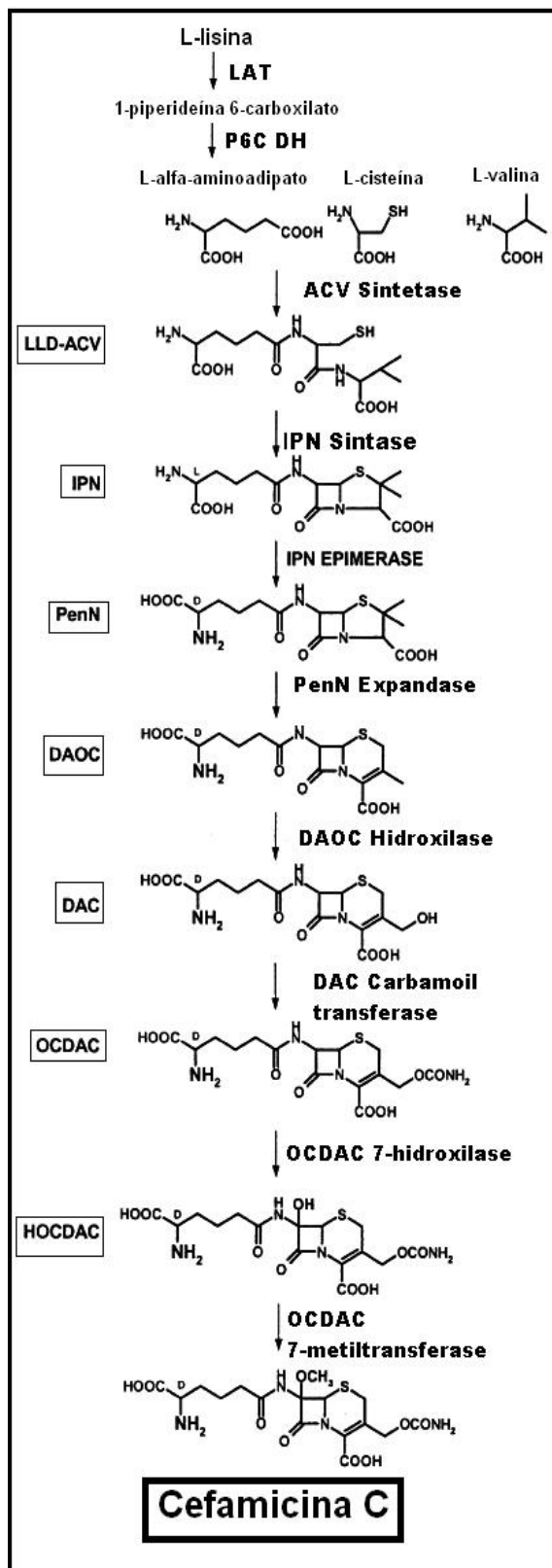
3.6 Biossíntese de Cefamicina C

A biossíntese, que ocorre na maioria dos compostos beta-lactâmicos, acontece a partir do tripeptídeo intermediário L-alfa-aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (ACV), com três aminoácidos envolvidos na sua formação: lisina (utilizada para formação do raro aminoácido ácido α -aminoadípico (AAA)), cisteína e valina, esses aminoácidos são precursores da estrutura básica dos antibióticos beta-lactâmicos (COQUE et al., 1991; FUENTE et al., 1997).

A rota biossintética de CefC inicia-se com a desaminação da lisina, formando o aminoácido ácido alfa-aminoadípico (AAA). Após a desaminação é formado o tripeptídeo L-alfa-aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (ACV). Outra etapa que ocorre na rota de todos os antibióticos beta-lactâmicos é a formação da Isopenicilina N. A Isopenicilina N sofre modificações na sua conformação, passando da sua forma L para D na cadeia lateral aminoadipil, formando a Penicilina N. A etapa seguinte da biossíntese, acontece pela expansão do anel tiazolidínico da Penicilina N, convertendo-a em deacetoxycephalosporin.C, que é hidrolisado a orto-carbamoil-deacetylcephalosporin C. O último passo é a acetilação de orto-carbamoil-deacetylcephalosporin a Cefalosporina C e a metilação da posição 7 alfa (MARTIN, 1999; LIRAS, 1999; ALEXANDER et al., 2000). A rota biossintética da CefC esta

apresentada na Figura 3.6, na qual estão todas as etapas, compostos e enzimas envolvidas no bioprocesso.

Figura 3.6: Rota biossintética de Cefamicina C em *S. clavuligerus* e *N. lactamdurans*.



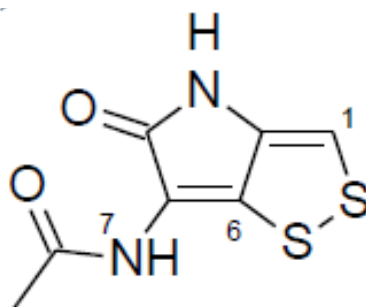
Fonte: Liras (1999).

3.7 Holomicina

A Holomicina (Figura 3.7) é um antibiótico com estrutura de ditiolopirrolonas e, geralmente, essa classe tem atividade inibitória contra um amplo espectro de patógenos gram-positivos e Gram negativos. Esse antibiótico foi isolado primeiramente em *Streptomyces griseus* (ETTLINGER et al., 1959) e em *Streptomyces* sp. P6621 (OKAMURA et al., 1977), posteriormente Kenig & Reading (1979) conseguiram isolar Hol a partir de linhagens mutantes de *Streptomyces clavuligerus*.

Anos mais tarde, descobriram que as bactérias *Photobacterium halotolerans* S2753 (WIETZ et al., 2010), *Yersinia ruckeri* (QIN et al., 2013) e *Streptomyces flavogriseus* NJ-4 (WEI et al., 2017) também possuem capacidade de realizar a biossíntese de Hol. Além disso, os autores relataram a presença dos genes responsáveis pela produção desse composto na linhagem selvagem de *S. clavuligerus* (LI & WALSH, 2010). Acredita-se, que o mecanismo de ação deste composto, esteja associado a inibição da síntese de RNA polimerase em bactéria resistentes a rifamicina (LI e WALSH, 2010; LIRAS, 2014).

Figura 3.7: Estrutura química da Holomicina.



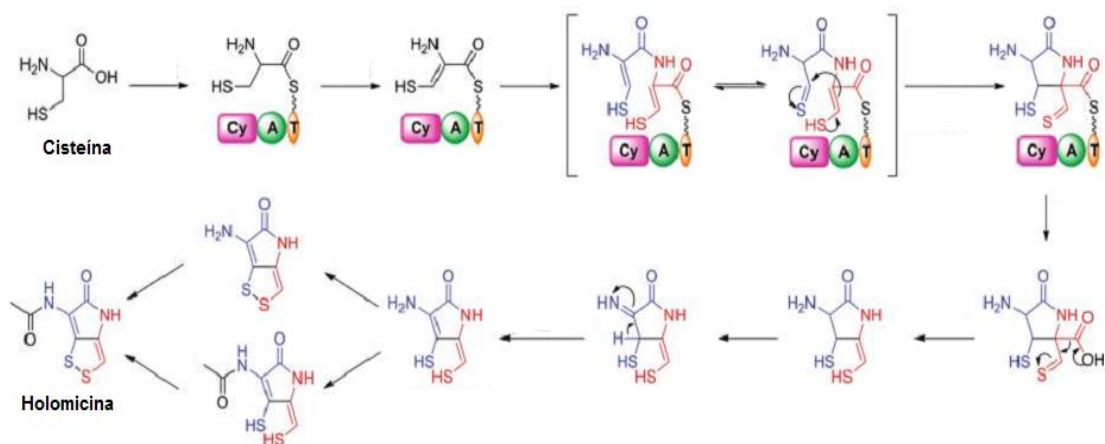
Fonte: WIETZ et al.,(2010).

Embora a linhagem selvagem de *S. clavuligerus* possua os genes para a biossíntese de Hol, ela produz concentrações praticamente indetectáveis. No entanto, os mutantes que apresentaram danos genéticos relacionados a via da biossíntese de AC, demonstraram ser superprodutores deste composto (FUENTE et al. 2002; LORENZANA et al. 2004; ROBLES.REGLERO, et al, 2013; LIRAS, 2014).

A Hol é um composto que apresenta coloração amarelo-ouro e possui atividade antimicrobiana em uma vasta diversidade de micro-organismos, incluído os fungos *Mucor miehei*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium greminaceum* e bactérias resistentes a rifamicina (CUI et al., 2006; WEI et al., 2017). Além da ação contra antimicrobiana, Hol tem demonstrado atividade antitumoral em células A549 (células de câncer de pulmão), BGC823 (células de câncer de gástrico) e HEPG2 (hepatocarcinoma). Todavia, a Hol tem apresentado citotoxicidade a células de mamíferos (LI e WALSH, 2010; LIRAS, 2014; WEI et al., 2017). Com a alta toxicidade de Hol, o que tem impedido o seu uso clínico, algumas modificações estruturais podem atenuar a sua citotoxicidade em células de mamíferos, tornando viável o seu uso terapêutico (CHEN et al., 2003).

A via biossintética de Hol foi proposta muitos anos após a sua descoberta por Li e Walsh (2010), esses autores se basearam em dados de bioinformática, pela indisponibilidade dos padrões dos intermediários da rota bioquímica. Dessa forma, propuseram que a biossintese inicia-se com a condensação da coenzima acetil-CoA e de duas cisteínas, sendo convertidas a um dipeptídeo, denominado L-Cis-L-Cis. Esse intermediário é descarboxilado e reduzido a holotina, por fim ocorre a acetilação para a conversão de Hol, conforme a Figura 3.8.

Figura 3.8: Rota biossintética de Hol.

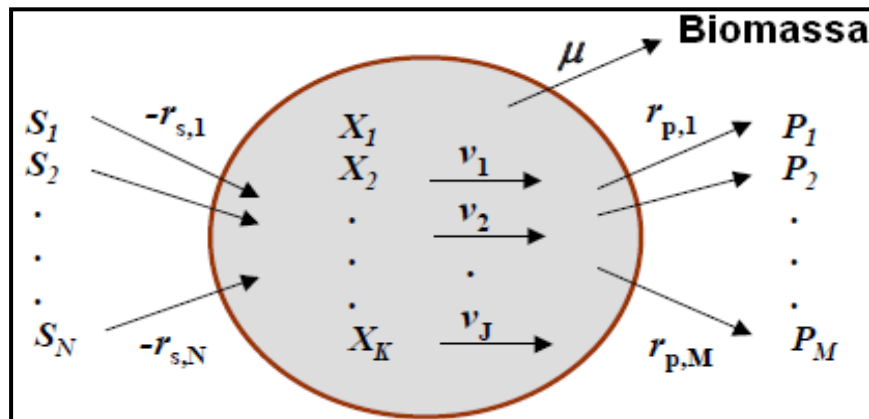


Fonte: Li e Walsh, (2010).

3.8 Influência das condições de cultivo no metabolismo secundário

A regulação da biossíntese de metabólitos secundários é muito complexa, sendo controlada por uma rede reguladora que envolve diversas proteínas e complexos (Figura 3.9). Comumente os micro-organismos, respondem as alterações externas mudando o padrão de expressão de genes envolvidos na biossíntese de diversos metabólitos. Esses estímulos externos incluem limitações nutricionais (exemplos comuns desta limitação são pela fonte de C e N), temperatura, pH e outras condições estressante que podem influenciar positivamente ou negativamente a produção destes compostos (BIBB, 2005).

Figura 3.9: Esquema do sistema biológico microscópico.



Fonte: Villadsen et al, (2011).

Existem muitos estudos sobre a influência que as fontes de C e N exercem na biossíntese de metabólitos secundários. Por exemplo, fontes de C de fácil assimilação como a glicose, são conhecidas por inibir a biossíntese de metabólitos secundários e favorecer o metabolismo primário, proporcionando uma maior formação de biomassa (SANCHEZ et al., 2010; WOHLLEBEN et al., 2017). Por outro lado, a presença de glicose em concentrações limitantes, pode favorecer a produção de biocompostos (WOHLLEBEN et al., 2017).

Este comportamento foi observado em *Streptomyces lividans*, em que a produção de actinorhodin foi inibida em meios de cultivo com suplementação de glicose acima de 0,1% (WOHLLEBEN et al., 2017). Já em estudo com *Streptomyces coelicolor*, constataram que a produção de actinorhodin foi favorecida em concentração de glicose de 2,5% e que em valores superiores a 3,6% a biossíntese

é completamente cessada (WOHLLEBEN et al., 2017). O efeito negativo de elevadas concentrações de glicose também foi observado em *Streptomyces venezuelae* na biossíntese de cloranfenicol (BHATNAGAR et al., 1998; WOHLLEBEN et al., 2017).

Geralmente, a repressão catabólica do metabolismo secundário, pela fonte de C, acontece na presença de glicose. Porém, existem outras fontes que são facilmente assimiladas pelos micro-organismos que também exercem essa função (SANCHEZ E DEMAINE, 2002; WOHLLEBEN et al., 2017). Um exemplo disso é a produção de novobiocina por *Streptomyces niveus*, que é utilizado meio de cultura suplementados de glicose e citrato, nessa condição o antibiótico é produzindo apenas quando a fonte de C preferencial, o citrato se esgota do meio (WOHLLEBEN et al., 2017).

Aharonowitz e Demain (1978) estudaram a regulação da produção de antibiótico pela fonte de C em *Streptomyces clavuligerus*, e constataram que as maiores concentrações de antibióticos foram obtidas com a utilização de glicerol, maltose e amido solúvel. Bellão e colaboradores (2013) observaram que as maiores concentrações de AC foram obtidas em cultivos que utilizaram glicerol como fonte de C, e em condições de cultura que continham maltose ou amido como fonte de C e energia, foram observadas as maiores produções de CefC.

Como já mencionado as fontes de N podem induzir a biossíntese dos metabólitos secundários nos micro-organismos. O Amônio, por exemplo, é facilmente assimilado por muitos actinomicetos e geralmente favorece o metabolismo primário do micro-organismo, reprimindo a biossíntese de biocompostos. No entanto, em alguns casos, a presença de altas concentrações de amônio pode favorecer a produção de antibióticos. Um exemplo é a biossíntese do antibiótico NAI-107 por *Microbispora* sp. ATCC-PTA-5024, estimulada por concentrações de amônio na faixa de 50 a 100 mmol.L⁻¹ (WOHLLEBEN et al., 2017).

Outras fontes de N que frequentemente são utilizadas para a produção de metabólitos secundários, são os aminoácidos. A influência destes compostos, na biossíntese de biocompostos, esta associada a sua natureza e a concentração destes no meio de cultura. Alguns aminoácidos são precursores diretos das vias biossintéticas de metabólitos, podendo ser incorporados às moléculas de

intermediários ou no bioativo final (MARTIN e DEMAINE, 1980; WOHLLEBEN et al., 2017).

O Glutamato é bastante utilizado em cultivos microbianos por ser um aminoácido versátil e por poder desempenhar a função de fonte de C e N, favorecendo o metabolismo primário e o secundário. Voelker e Altaba (2001) observaram que a presença de glutamato e arginina, no meio de cultura, estimularam a biossíntese de pristinamicina em *Streptomyces pristinaespiralis*, e constataram que glutamato foi utilizado preferencialmente como fonte de C e energia, enquanto a arginina foi consumida para o metabolismo secundário.

Em *S. clavuligerus*, a biossíntese de AC é favorecida pela adição de ornitina ao meio que é convertida em arginina, um precursor direto desse composto (SAUDAGAR et al, 2008; DOMINGUES et al, 2010; TEODORO et al, 2010). Os efeitos positivos de lisina na produção de antibióticos beta-lactâmicos por *S. clavuligerus* também têm sido amplamente reportados desde a década de 1980 por vários pesquisadores (FANG et al, 1996; DEMAINE e VAISHNAV, 2006; ANTONIO et al, 2012). Nesses trabalhos, os autores relataram que o uso em excesso de lisina foi mais efetivo na produção dos beta-lactâmicos, o que pode ser explicado pelo consumo do aminoácido para o metabolismo primário (via cadaverina aminotransferase) e o metabolismo secundário (energeticamente menos favorável), para sustentar as rotas de produção de beta-lactâmicos (FANG et al., 1996; KHETAN et al., 1999).

Outra variável fundamental, que pode influenciar a biossíntese de biocomposto, é o pH inicial. Os valores de pH iniciais são imprescindíveis, uma vez que, a produção de co-fatores e precursores para biossíntese de metabólitos secundários acontece durante a fase exponencial de crescimento do micro-organismo, momento em que é sinalizado a produção de um determinado produto. Estudo com *Penicillium chrysogenum* demonstraram uma maior transcrição de genes relacionados com a biossíntese de penicilina em valores de pH acima de 4,0, sendo a melhor condição testada em pH 6,5 (CHU et al., 1997).

Narayana e Vijayalakshmi (2008), estudaram o impacto do pH sobre a formação de biomassa e a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana na linhagem *Streptomyces albidoflavus*. Os autores constataram que

valores de pH 5,0 e 9,0 reprimiam a produção de biocompostos e afetavam o crescimento de forma significativa, sendo o pH ótimo de 7,0.

Ainda não existem estudos relacionando a biossíntese de biocompostos em *S. clavuligerus* com valores iniciais diferentes de pH, no entanto como mencionado acima, o pH é uma variável fundamental para o cultivo de qualquer micro-organismo. Inamine e colaboradores (1975) estabeleceram o pH de cultivo de *S. clavuligerus* entre de 6,0 a 8,0, portanto, há uma ampla faixa de pH a ser investigada para obter melhores rendimentos de metabólitos secundários.

3.9 Modelagem Matemática

A modelagem matemática tornou-se uma ferramenta amplamente utilizada em diversas áreas por permitir a interpretação e a previsão do comportamento de fenômenos naturais de forma confiável (GOMBERT e NIELSEN, 2000; VOIT et al., 2017). Um modelo matemático é a forma simplificada e representativa do fenômeno natural, desta forma, é possível estabelecer diferentes modelos para um mesmo fenômeno, considerando os dados disponíveis e o objetivo (BAILEY, 1998).

Há muitas décadas a modelagem matemática vem aprimorando-se com o objetivo de fornecer detalhes sobre o comportamento microbiano a fim de propor estratégias para obter linhagens microbianas superiores (STEPHANOPOULOS, 1999). Com os avanços das ômicas das ciências biológicas (genômica, proteômica, metabolômica) e de ferramentas de bioinformática, as tentativas para desenvolver modelos matemáticos que representem as funções celulares de um organismo aumentaram significativamente. O foco destes estudos têm sido entender o metabolismo celular de forma ampla angariando informações detalhadas sobre a biossíntese de compostos com diferentes aplicações biotecnológicas (GOMBERT e NIELSEN, 2000). Assim, a engenharia metabólica tem aliado estas informações fornecidas pela biologia e associado aos modelos matemáticos para sugerir manipulações genéticas direcionadas nos micro-organismos produtores de compostos com interesse industrial (DAI et al., 2015).

Existem duas principais metodologias de modelagem matemática que são empregadas pela engenharia metabólica. A primeira é baseada em modelos com restrições físico-químicas como, por exemplo, balanços de massa, balanços de energia e limitações de fluxos para explicar o comportamento do organismo

estudado (COVERT et al., 2003; PRICE et al., 2004). Estes modelos consideram a estequiometria das reações das vias metabólicas, são muito poderosos e tem focado no estudo de micro-organismos produtores de compostos de interesse industrial, porém este tipo de modelagem apresenta poder de previsão limitado. No caso destes modelos a desvantagem que os limita também os torna mais vantajoso, pois um dos maiores benefícios desta metodologia de modelagem é o uso mínimo de informações biológicas para inferir sobre o comportamento das redes metabólicas do organismo em análise (GOMBERT e NIELSEN, 2000).

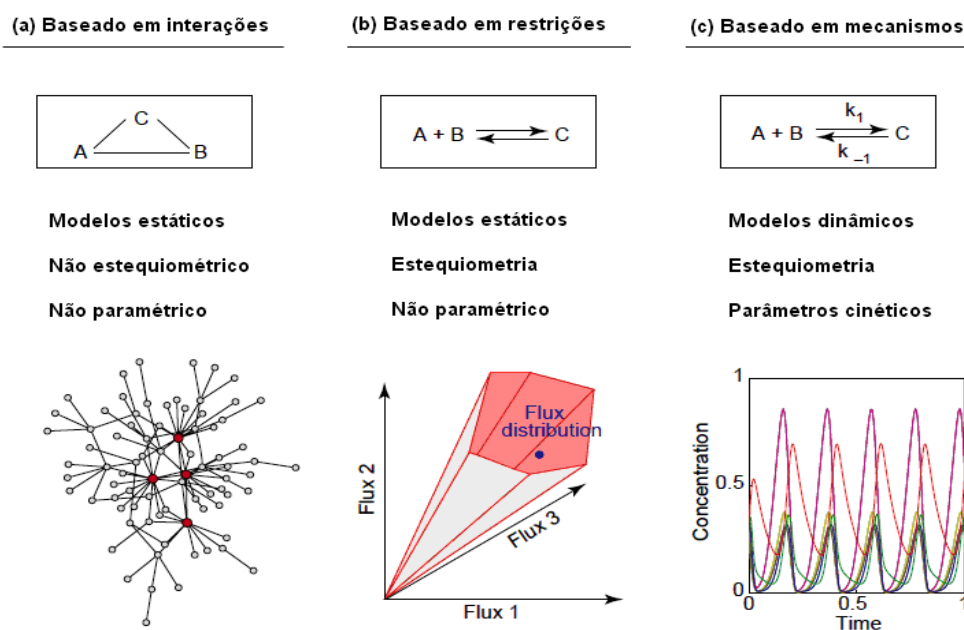
Apesar da limitação de previsão os modelos baseados em restrições têm mostrado se adequados para a análise de distribuição de fluxos metabólicos. A análise de distribuição de fluxo pode ser aplicada na investigação do comportamento celular em diferentes condições ambientais, em estudo de mutantes, para prever a relação genótipo-fenótipo, fornecendo informações funcionais (STEPHANOPOULOS, 1999; GOMBERT e NIELSEN, 2000). Dependendo dos dados experimentais e objetivo do estudo, é necessário o uso de diferentes técnicas de análise de distribuição de fluxos, que são agrupadas em três classes, AFM (Análise de Fluxo Metabólico), AEF (Análise de Equilíbrio de Fluxo) e AVM (Análise de Vias Metabólicas) (STEPHANOPOULOS et al., 1998 ; TRINH et al., 2009; LEWIS et al., 2012).

AFM determina o fluxo metabólico correspondente a um estado fisiológico da célula sob uma condição. Esta análise requer um grande conjunto de dados experimentais para simular a rede metabólica, tornando-se experimentalmente inviável, no entanto pode ser auxiliada pela utilização de substratos marcados com C13 (TRINH e THOMPSON, 2012). A AEF destaca-se entre as análises por ser a mais utilizada, como a AFM também consegue prever o estado fisiológico da célula em uma determina condição e ainda pode ser aplicada a rede metabólica em escala genômica. Neste caso é necessário estabelecer uma função objetivo, sujeita a restrições que possibilitam obter dados de maximização ou minimização de uma variável de interesse (TRINH e THOMPSON, 2012). Diferente de AFM e AEF, AVM determina todas as respostas admissíveis de uma rede metabólica sem fixar valores de velocidades de fluxos ou estabelecer uma função objetivo. Contudo para restringir o número de soluções admissíveis a um número finito é necessário adotar restrições adicionais como a não decomposibilidade e a independência sistemática.

Dependendo da restrição utilizada duas técnicas podem ser aplicadas para avaliar a capacidade metabólica da rede estudada, AME (Análise de modo elementares) quando se emprega a não decomposibilidade e a AVE (Análise de vias extremas) quando se aplica as duas restrições (TRINH e THOMPSON, 2012).

A segunda metodologia de modelagem matemática empregada em engenharia metabólica é baseada em modelos dinâmicos que visam caracterizar o mecanismo das reações enzimáticas e como as reações do metabolismo respondem as mudanças das concentrações de metabólitos. Todavia para utilizar esta metodologia é necessário valores de parâmetros cinéticos consideráveis, o que não é muito fácil, uma vez que as análises empregadas para determinação destes dados custam caro, exigem tempo e muitas vezes não é possível determinar experimentalmente estes valores (WIECHERT, 2002). A Figura 3.10 apresenta três representações de redes metabólicas.

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.



Fonte: Stelling, (2004).

A modelagem matemática e os bancos de dados têm sido grandes aliados para investigar sistemas biológicos de forma global com maior rigor e detalhamento. Alguns exemplos de sucesso de produtos com alto valor agregado produzidos industrialmente por meio de engenharia metabólica são, 1,3 propanodiol (NAKAMURA E WHITED, 2003), isobutanol (FELDMAN et al, 2013), ácido succínico (ZHU et al., 2014b), 1,4 butanodiol (YIM et al, 2011), artimisinina (PADDON et al., 2013) e ômega -3 eicosapentaenóico (XUE et al., 2013). Apesar de exemplos de sucesso, ainda existem muitos desafios para atingir a eficiência na produção de compostos por meio de engenharia metabólica, sendo necessária uma compreensão holística do metabolismo e das propriedades fisiológicas para superar o obstáculo da evolução natural microbiana (DAI e NIELSEN, 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Para a produção dos biocompostos (AC, CefC e Hol) foi utilizada linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* (BUTTERWORTH, 1984), depositada no *American Type Culture Collection*, sobre o número de acesso ATCC 27064. E como bactéria-teste foi usada *Escherichia coli* ESS 2235 (bactéria, sensível a antibióticos beta-lactâmicos), gentilmente cedida pela Dra. Paloma Liras, da Faculdade de Biologia da Universidade de Leon, Espanha (LIRAS; MARTIN; 2005).

Os micro-organismos foram estocados em forma de suspensão de esporos em solução crioprotetora (glicerol 20% v/v) em ultrafreezer (-80°C), para uso imediato e em forma de células vegetativas liofilizadas, armazenadas em ampolas à temperatura ambiente para estocagem em longo prazo.

4.2 Meios de Cultura

Para o cultivo da bactéria-teste *E. coli* ESS 2235 foi utilizado o meio de ágar nutriente, proposto pela ATCC (*American Type Culture Collection*), composto de (em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): peptona (5,0), extrato de carne (3,0), ágar bacteriológico (15,0) e pH ajustado para $7,0 \pm 0,1$. O meio utilizado para esporulação de *S. clavuligerus* (Figura 4.1) foi o descrito por Sánchez e Braña (1996), tendo como composição (em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): extrato de levedura (0,5), extrato de carne (0,5), caseína hidrolisada ácida (1,0), glicose (5,0), tampão biológico ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico (MOPS) e valor de pH $7,0 \pm 0,1$.

Figura 4.1: Esporos de *S. clavuligerus* cultivados em meio proposto por Sánchez e Braña (1996).



Fonte: Acervo pessoal.

O meio para germinação e/ou reativação dos esporos foi o mesmo formulado por trabalhos anteriores para este micro-organismo, adicionado de extrato de malte (KIESER *et al.*, 2000). Sendo composto de (em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): triptona (5,0), extrato de levedura (3,0), extrato de malte (10,0) e MOPS (21,0) e $\text{pH } 6,8 \pm 0,1$.

Foram utilizados meios de cultura quimicamente definidos para o preparo de inóculo e para produção dos bioativos. Estes meios foram formulados a partir de meios complexos utilizados no laboratório de Bioprocessos (ANTONIO *et al.*, 2012; BELLÃO *et al.*, 2013; LEITE *et al.*, 2013). Para isto as fontes de C e N complexas foram substituídas por maltose e pelos aminoácidos lisina e glutamato, com o objetivo de poder analisar o perfil de consumo destes substratos com precisão.

Aplicou-se o meio para o preparo de inóculo contendo (em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) maltose (10,0) lisina (4,0), glutamato (5,5), extrato de levedura (1,0), K_2HPO_4 (0,8), $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0,75), MOPS (21,0), solução de sais (10,0 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$) contendo (em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,0), $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0), $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0)) e elementos traços (1,0 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$) contendo (em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,49), CoCl_2 (0,28), Na_2MoO_4 (0,15). E para a produção, utilizaram-se meios compostos por (em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) maltose (10,0), K_2HPO_4 (1,75), $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0,75), CaCl_2 (0,2), NaCl (2,0), solução de sais (5,0 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$) ($\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,0), $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0), $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0)), elementos traços (1,0 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$) ($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,49), CoCl_2 (0,28), Na_2MoO_4 (0,15)) e as concentrações das fontes de nitrogênio (lisina e glutamato) foram variadas entre 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de acordo com os objetivos do cultivo e o biocomposto de interesse.

O meio de produção em biorreator foi isento de MOPS, uma vez que se utilizou o controle de pH.

4.3 Condições gerais do processo fermentativo

Os cultivos microbianos foram realizados em modo batelada com duração de 72 horas em frascos agitados e biorreator de bancada, tipo tanque agitado (News Brunswick, modelo Bioflo 2000, 5 L de volume útil).

4.3.1 Experimentos em frascos agitados

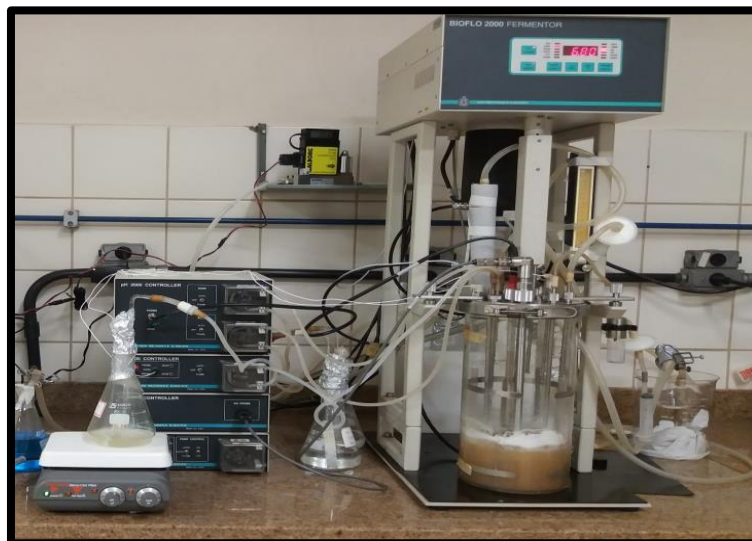
Para os experimentos realizados em frascos, utilizaram-se os do tipo Erlenmeyer com volume útil de 500 mL, 80 mL de meio de cultura ajustados em pH 6,8 e 7,2, agitados em mesa incubadora rotatória (New Brunswick Scientific) com temperatura controlada em 20°C ou 28°C e frequência de rotação de 260 rpm. Amostras (ca. 5 mL) foram retiradas a partir de 12 horas de cultivo, a cada 6 horas.

4.3.2 Experimentos em biorreator

4.3.2.1 Biorreator

Os experimentos foram realizados em biorreator convencional tipo tanque agitado BioFlo 2000 FERMENTOR com volume útil de 5 litros (Figura 4.2), equipado com dorna de vidro borossilicato e tampa de aço inox, com controle de pH (pH 2000 controller), com controle de O₂ dissolvido (DO 2000 controller), com controle de formação de espuma (AF 2000 controller), com controle de pH e com rotâmetro para controle da aeração. O sistema foi composto por quatro chicanas e um impelidor tipo Rushton posicionado abaixo da superfície do meio de cultura.

Figura 4.2: Biorreator de bancada, tipo tanque agitado (News Brunswick, modelo Bioflo 2000, 5 L de volume útil).



Fonte: Acervo pessoal.

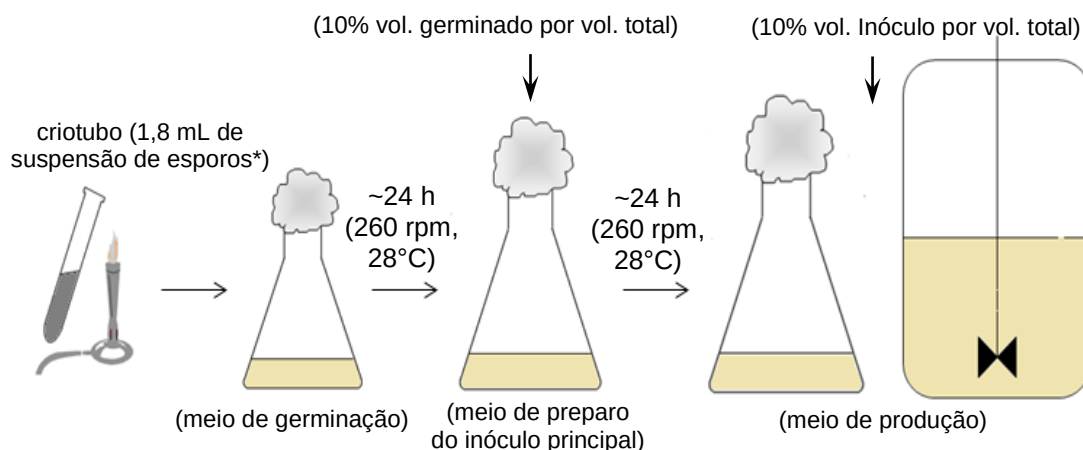
4.3.2.2 Condições de cultivo em biorreator

No biorreator a amostragem foi de três em três horas, tendo como condições gerais dos cultivos: volume reacional de 1,6 L, controle de temperatura (28°C), pH controlado a 6,8 ou 7,4 pela adição de HCl 2 mol.L⁻¹ e NaOH 1 mol.L⁻¹, conforme a necessidade, oxigênio dissolvido controlado em 50% relativo à saturação mantido por uma vazão de ar ajustada em 1 vvm e pela variação automática da velocidade de agitação (250 a 450 rpm).

4.3.3 Etapas dos cultivos de *S. clavuligerus*

A Figura 4.3 apresenta o esquema das etapas dos cultivos. Inicialmente a suspensão de esporos (ca. 10⁸ esporos.mL⁻¹) foi inoculada no meio de reativação, onde permaneceu durante aproximadamente 22 horas. Após a reativação dos esporos, uma alíquota de 10% do total do volume do meio de inóculo, foi transferida para o meio de preparo de inóculo, sendo cultivada por mais 22 horas. Passado este período, 10% do total do meio de produção do inóculo foram adicionados no meio de cultura de produção dos biocompostos.

Figura 4.3: Esquemas das etapas de cultivo de *S. clavuligerus*.



Fonte: Acervo pessoal.

Os cultivos foram denominados de acordo com a composição e a condição de processo, conforme a Tabela 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1: Cultivos em frascos agitados utilizando a linhagem selvagem ATCC 27064 de *Streptomyces clavuligerus*.

Frascos Agitados	Nome	Fonte de N	pH	Temperatura
1	Lisina pH 6,8	Lisina	6,8	28°C
2	Lisina pH 7,2	Lisina	7,2	28°C
3	Lisina t 20°C	Lisina	6,8	20°C
4	Lisina t 28°C	Lisina	6,8	28°C
5	L + G pH 6,8	Lisina e Glutamato	6,8	28°C
6	L + G pH 7,2	Lisina e Glutamato	7,2	28°C
7	L + G t 20°C	Lisina e Glutamato	6,8	20°C
8	L + G t 28°C	Lisina e Glutamato	6,8	28°C

Tabela 4.2: Cultivos em biorreator tipo tanque agitado utilizando a linhagem selvagem ATCC 27064 de *Streptomyces clavuligerus*.

Biorreator	Nome	Fonte de N	pH	Temperatura
1	B Lisina pH 6,8	Lisina	6,8	28°C
2	B Lisina pH 7,4	Lisina	7,4	28°C
3	B L + G pH 6,8	Lisina e Glutamato	6,8	28°C
4	B L + G pH 7,4	Lisina e Glutamato	7,4	28°C

4.4 Métodos Analíticos

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

As amostras coletadas foram centrifugadas a $15500 \times g$ a 4°C durante 15 minutos em centrífuga Eppendorf, modelo 5810R. O sobrenadante foi armazenado em *ultrafreezer* a -80°C para posteriores análises (substratos, biocompostos e proteína extracelular total) e o *pellet* de massa celular foi lavado com água destilada duas vezes por 10 minutos, com intuito de eliminar impurezas, e levado a estufa com circulação mecânica a 105°C , por 18 a 24 horas em recipiente previamente pesado, sendo a concentração de massa seca de células expressa em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.4.2 Determinação das concentrações dos substratos

O substrato residual foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou a sigla em inglês HPLC) (Shimadzu LC-20AT) equipado com desgaseificador (Shimadzu DGU-20A) e detector de índice de refração (Modelo RID-10A/ Shimadzu).

4.4.2.1 Concentração da fonte de C maltose

A concentração de maltose foi analisada por método isocrático, tendo como fase móvel 100% de ácido acético ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), fluxo de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando-se uma coluna Shim-Pack SCR-102H (7,9 mm x 30 cm), forno a 40°C e injeção de $10 \mu\text{L}$ de amostra (CAVALLIERI, 2014).

4.4.2.2 Concentração das fontes de N lisina e glutamato

Para análise das fontes de N adotou-se uma coluna Shim-Pack AnimoNa e forno a 60°C e injeção de $10 \mu\text{L}$ de amostra (CAVALLIERI, 2014).

A programação da fase móvel para determinar a concentração de lisina consistiu de: borato de sódio $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (solvente A), NaOH $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (solvente B), com fluxo constante de $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, tendo como condição de eluição:

- 0 a 25 min 100% A
- 25 a 30 min 100% B
- 30 a 35 min 100% B
- 35 a 40 min 0 a 100% A
- 40 a 55 min 100% A

As condições para a quantificação de glutamato foram: Fase móvel, citrato de sódio $0,07 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (solvente A) e NaOH $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (solvente B), com fluxo constante de $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Com a seguinte condição de eluição:

- 0 a 10 min 100% A
- 10 a 15 min 100% B
- 15 a 25 min 100% B
- 25 a 30 min 0 a 100% A
- 30 – 50 min 100% A.

4.4.3 Determinação da concentração de proteína extracelular

A proteína secretada para o meio de cultivo foi determinada utilizando o método de Lowry *et al* (1951) modificado por Hartree (1972). Como padrão foi utilizado soroalbumina bovina e as proteínas totais determinadas neste método foram expressas com unidade $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.4.4 Determinação da concentração de íons amônio

Para analisar os íons NH_4^+ utilizou-se o método do fenato, bastante aplicado na análise de águas residuais (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21^o ed 2005, 4500F. 4-114). Este método fundamenta-se na reação de NH_4^+ com fenol formando o azul de iodofenol, o qual é medido em com leitura no espectrofotômetro a 630 nm.

4.4.5 Determinação da concentração de Ácido Clavulânico

AC foi quantificado após derivatização do composto contido nas amostras com imidazol ($60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) a 30°C por 12 minutos, com medição do produto resultante

da reação (1-(4-aza-8-hydroxy-6-oxo) oct-2-en-1-oylimidazol) em espectrofotômetro UV (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000) a 312 nm (BIRD *et al*, 1982). E com o auxílio de uma curva de calibração foi determinada a concentração de AC em mg.L⁻¹.

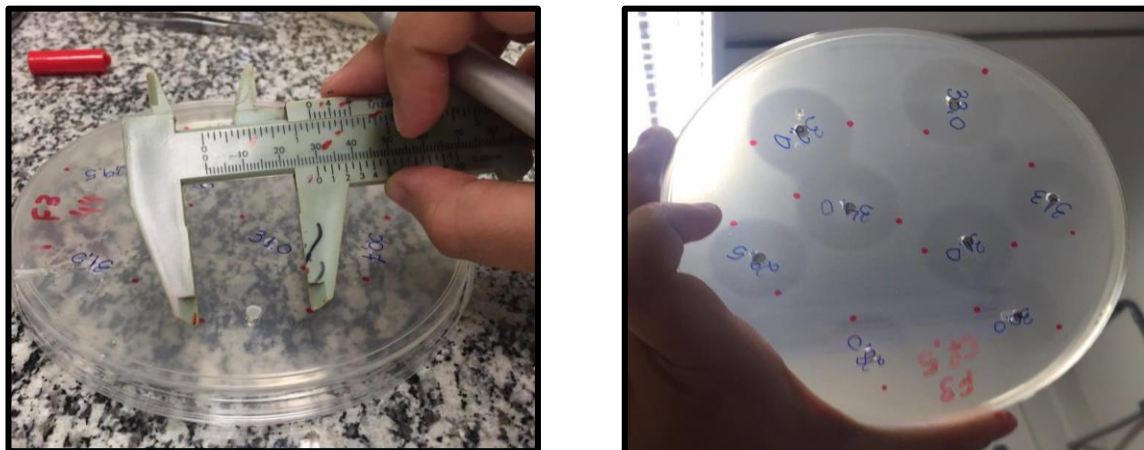
4.4.6 Determinação da concentração de Cefamicina C

A quantificação de CefC, foi realizada por meio do método de bioensaio de difusão em ágar descrito por LIRAS e MARTÍN (2005) (Figura 4.4). Para este método, utilizou-se cefalosporina C como antibiótico padrão, devido à semelhança de halos de inibição produzidos e *Escherichia coli* ESS 2235 (super sensível a antibióticos beta-lactâmicos) como micro-organismo-teste (LIRAS e MARTÍN, 2005). Nesta metodologia o antibiótico é quantificado de forma indireta e expresso termos de concentração de Cefalosporinas totais (CepC totais, em mg.L⁻¹).

Para o bioensaio as placas foram preparadas utilizando uma suspensão bacteriana em solução salina a 0,9% (com absorbância igual a 1,000) com leitura a 600 nm em espectrofotômetro. Esta solução foi adicionada em meio agar nutriente (ca. 1% de suspensão bacteriana por volume de meio agar nutriente) e após homogeneização o meio foi vertido em placas de Petri, sendo perfurado após a solidificação, formando poços com 5 mm de diâmetro. As amostras de caldo de cultivo foram preparadas utilizando a enzima BD Difco TM Penase®, para degradar a Penicilina N presente, para que esta não interferisse nos resultados das análises.

Posteriormente ao preparo das placas foram adicionados 20 µL de amostra em cada poço, após a aplicação foram incubados durante 18 horas em estufa a 30°C, e então o halo de inibição foi medido com o auxílio do paquímetro e a concentração do biocomposto foi determinada utilizando curva de calibração construída previamente.

Figura 4.4: Placa de bioensaio para determinação da concentração de CefC.

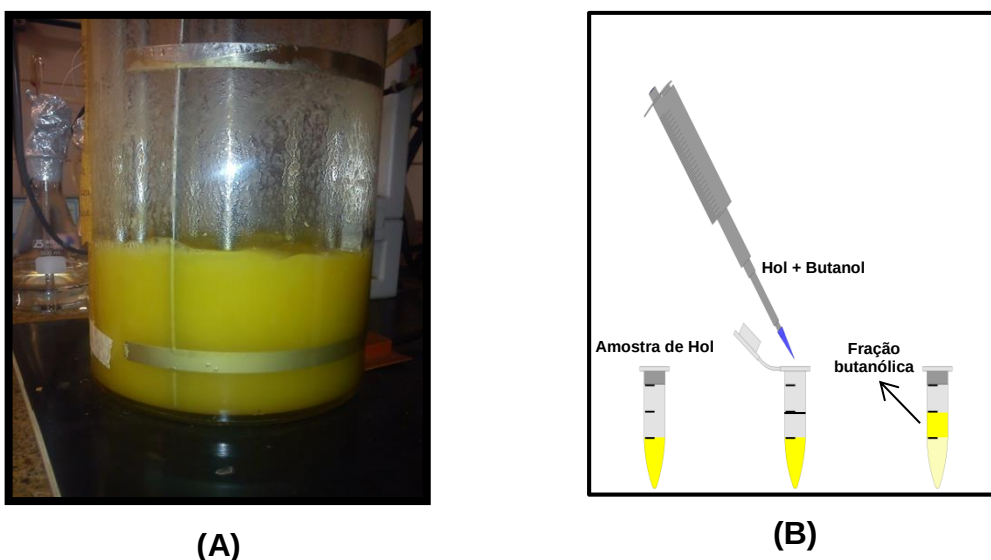


Fonte: Souza, (2017).

4.4.7 Determinação da concentração de Holomicina

Hol foi quantificada empregando-se uma extração líquido-líquido com butanol (KENING e READING, 1979) (Figura 4.5). A concentração do biocomposto, retido na fração butanólica, foi determinada por HPLC acoplado a um detector UV (SPD-20A Shimadzu), utilizando coluna C18 (300 x 4.9 mm, com tamanho de partícula 10 μm), fase móvel 60% água e 40% metanol, fluxo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, forno a 30°C, tempo de retenção de 5,6 minutos e leitura a 360 nm e injeção de 20 μL de amostra.

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) .



Fonte: Acervo pessoal.

4.4.8 Análise de CO₂

O CO₂ dos gases de saída do biorreator durante o processo fermentativo foi analisado com auxílio de um Analisador de gases (O₂ e CO₂) marca BlueSens, modelo BlueInOne. O CO₂ medido, expresso em %, foi convertido em mmol CO₂. gcél⁻¹.h⁻¹ para utilização nos balanços de carbono das simulações dos fluxos metabólicos do micro-organismo. Para os cálculos, utilizou-se a equação $P \cdot V = n \cdot R \cdot T$, para gases ideais.

Figura 4.6: Analisador de gases BlueInOne.



Fonte: Acervo pessoal.

4.5 Modelagens Matemáticas

4.5.1 Estimativa de parâmetros dos processos fermentativos

Os conjuntos de equações diferenciais dos modelos cinéticos propostos, apresentados na seção de Resultados e Discussão, foram resolvidos pelo método de Runge-Kutta de quarta ordem, utilizando-se o programa computacional de acesso livre Scilab (versão 6.0.0). As equações diferenciais (EDOs) do modelo cinético são apresentadas a seguir:

Cinética de Monod de crescimento para os meios "Lisina"

$$\mu_1 = \mu_{\text{Malt}1} \cdot \frac{C_{\text{Malt}}}{k_{\text{Malt}1} + C_{\text{Malt}}} \quad (1)$$

Modelo aditivo de crescimento para os meios "L+G"

$$\mu_2 = \mu_{\text{Malt}2} \cdot \frac{C_{\text{Malt}}}{k_{\text{Malt}2} + C_{\text{Malt}}} + \mu_{\text{Glut}} \cdot \frac{C_{\text{Glut}}}{k_{\text{Glut}} + C_{\text{Glut}}} \quad (2)$$

Para as EDOs a seguir (Eqs 3 a 9), de acordo com as Eqs 1 e 2, $i = 1$ para meios "Lisina" e $i = 2$ para meios "L+G":

$$\frac{dC_x}{dt} = (\mu_i - k_d) \cdot C_x \quad (3)$$

$$\frac{dC_{\text{Malt}}}{dt} = -\frac{\mu_i}{Y_{X/\text{Malt}}} \cdot C_x \quad (4)$$

$$\frac{dC_{\text{Glut}}}{dt} = -\frac{\mu_2}{Y_{X/\text{Glut}}} \cdot C_x \quad (5)$$

$$\frac{dC_{\text{Lis}}}{dt} = -\left(m_{\text{Lis}} + \frac{1}{Y_{X/\text{Lis}}} \cdot \mu_{\text{Lis}} \cdot \frac{C_{\text{Lis}}}{k_{\text{Lis}} + C_{\text{Lis}}} \right) \cdot C_x \quad (6)$$

Na Eq. (6), m_{Lys} representa a taxa específica de consumo de lisina direcionada para a manutenção celular e $1/Y_{X/\text{Lys}}$ representa a relação entre o consumo total de lisina por grama de células para produção de compostos bioativos e proteína extracelular.

$$\frac{dC_{\text{CefC}}}{dt} = (\alpha_{\text{CefC}} \cdot \mu_i + \beta_{\text{CefC}}) \cdot C_x - k_{\text{CefC}} \cdot C_{\text{CefC}} \quad (7)$$

$$\frac{dC_{\text{AC}}}{dt} = (\alpha_{\text{AC}} \cdot \mu_i + \beta_{\text{AC}}) \cdot C_x - k_{\text{AC}} \cdot C_{\text{AC}} \quad (8)$$

$$\frac{dC_{\text{Hol}}}{dt} = (\alpha_{\text{Hol}} \cdot \mu_i + \beta_{\text{Hol}}) \cdot C_x - k_{\text{Hol}} \cdot C_{\text{Hol}} \quad (9)$$

4.5.2 Simulação dos modelos metabólicos

As simulações dos fluxos metabólicos foram feitas utilizando-se rede metabólica anteriormente construída para *S. clavuligerus* (CAVALLIERI et al, 2016), com as adaptações necessárias para o presente trabalho. Para as simulações, empregou-se o programa computacional de acesso livre Optflux, versão 3 (www.optflux.org). A Análise de Balanço de Fluxos foi a técnica escolhida, estabelecendo-se como função objetivo a maximização de energia.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivos em frascos agitados

Estes cultivos foram realizados em batelada, utilizando-se dois meios sintéticos diferenciados nas fontes de nitrogênio utilizadas, porém, mantendo-se a mesma concentração molar total em cada meio. O pH inicial dos meios foi ajustado em dois valores distintos. Desta forma, a produção dos bioativos foi investigada em quatro condições diferentes. Os valores de pH iniciais foram escolhidos de acordo com resultados obtidos em experimentos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (CAVALLIERI et al, 2016; LEITE et al 2013; SOUZA, 2017).

Lisina e glutamato foram selecionados como fontes de nitrogênio, com base em dados da literatura. Os efeitos positivos de lisina na produção de antibióticos beta-lactâmicos por actinomicetos têm sido amplamente reportados desde a década de 1980 por vários pesquisadores (FANG et al, 1996; DEMAINE e VAISHNAV, 2006; ANTONIO et al, 2012). Nestes trabalhos, os autores mostraram que o uso de excesso de lisina foi bem mais efetivo na produção dos beta-lactâmicos, o que pode ser explicado pelo consumo do aminoácido para suprir ambos, o metabolismo primário (via cadaverina aminotransferase) e o metabolismo secundário, energeticamente muito menos favorável, para sustentar as rotas de produção de beta-lactâmicos (FANG et al., 1996; KHETAN et al., 1999). Glutamato, por sua vez, é uma fonte de nitrogênio fundamental para muitos organismos, sendo utilizado para a biossíntese de vários aminoácidos. Em micro-organismos produtores de compostos bioativos, por exemplo, glutamato é importante na síntese de cofatores envolvidos no metabolismo secundário (WALKER e DONK, 2016). Em *S. clavuligerus*, duas moléculas de glutamato são geradas durante o catabolismo da lisina (MADDURI et al., 1989) sugerindo-se, então, que a presença de lisina e glutamato no meio de cultura possa promover o consumo preferencial de glutamato para o metabolismo primário e, assim, preservar lisina para a biossíntese de antibióticos.

O crescimento do micro-organismo em maltose, glutamato ou lisina como únicas fontes de carbono e energia foi investigado em experimentos anteriores, também em mesa incubadora rotativa agitadora (BAPTISTA, 2015). Durante o cultivo em meio contendo maltose (e a fonte de nitrogênio NH_4Cl), houve diminuição do pH, provavelmente devido à liberação de ácidos orgânicos do ciclo de Krebs

(DESAI et al., 2002; CHEN et al., 2011). Em glutamato, o valor de pH aumentou significativamente e no meio contendo lisina, o pH diminuiu discretamente. Com estes dados, decidiu-se ajustar o pH inicial dos meios em 6,8 e 7,2.

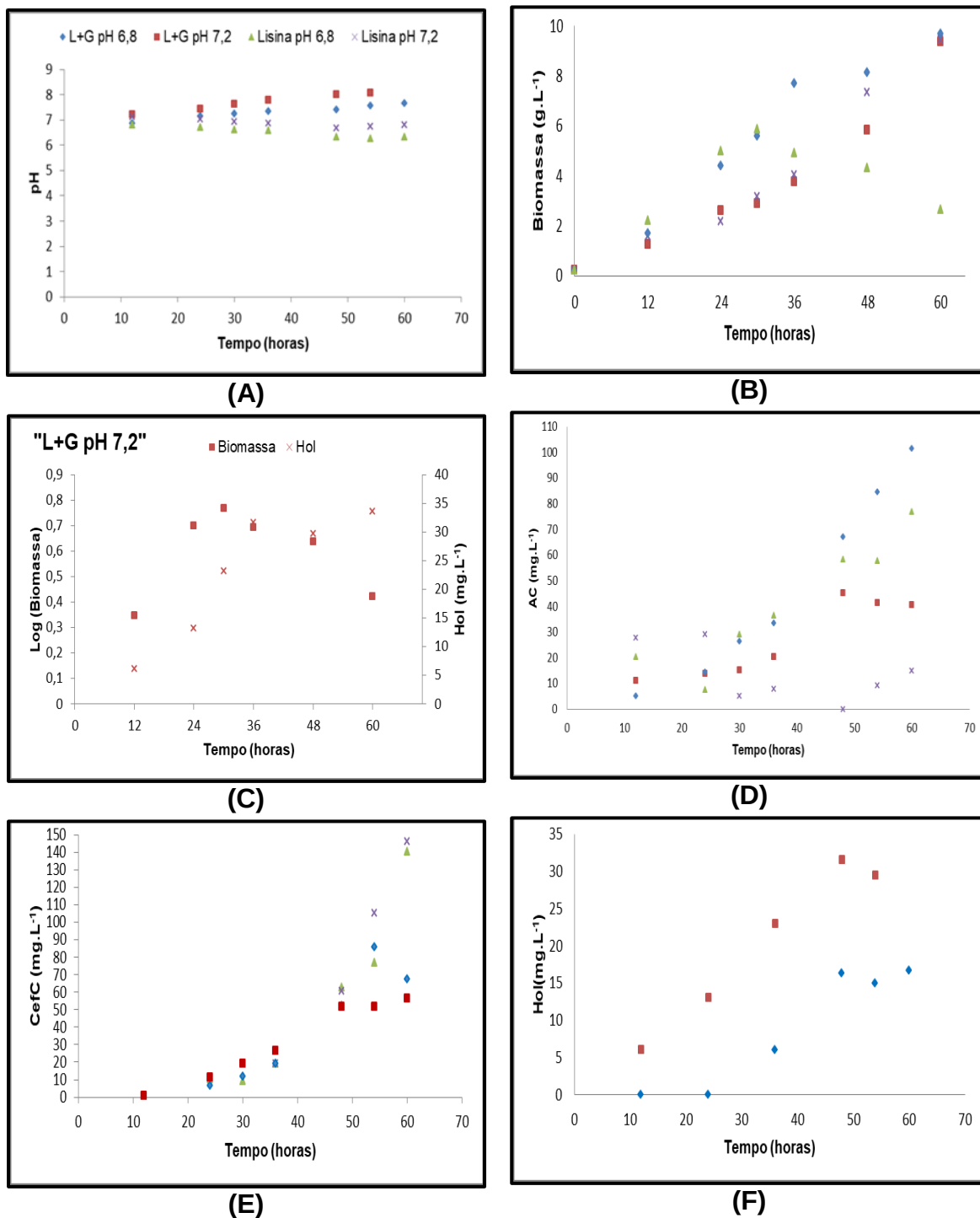
Como já mencionado, maltose (10 g.L^{-1}) foi o carboidrato usado como principal fonte de carbono e energia. Os meios "L+G" foram compostos por 50 mmol.L^{-1} de cada aminoácido (lisina e glutamato) e os meios "Lisina" continham 100 mmol.L^{-1} de lisina. Os dados dos cultivos estão apresentados na Figura 2.1.

Pela Figura 5.1A, como esperado, observou-se que os maiores aumentos de pH ocorreram nos meios contendo glutamato (meios L+G). Sabe-se que durante o catabolismo dos aminoácidos ocorre uma desaminação oxidativa que forma moléculas de NH_4^+ que contribuem para a alcalinização do meio de cultura. Deste modo, os valores de pH mais alcalinos dos meios em que a composição incluía glutamato, justifica-se pelo seu rápido e total consumo pelo micro-organismo, que pode ter gerado NH_4^+ como produto secundário (RAJNISZ et al., 2015). Comportamento semelhante a este foi observado por Baptista (2015) e Souza (2017). Lisina é uma fonte de N de difícil assimilação por *S. clavuligerus*. Sendo assim, foi preterida em relação à maltose, o que refletiu na acidificação do meio. Provavelmente a presença piruvato liberado na via glicolítica no meio promoveu esta acidificação (DESAI et al., 2002; CHEN et al., 2011).

Na Figura 5.1B, pode-se constatar que a variação de pH não afetou o crescimento celular, com exceção do meio "L+G pH 7,2". Neste meio, Hol começou a ser produzido no início da fase exponencial, conforme se pode verificar na Figura 5.1C. QIN et al. (2013) realizaram estudos em nível molecular no patógeno de peixe *Yersinia ruckeri*, produtor de Hol, identificando um gene codificador de uma enzima RNA metiltransferase que confere ao micro-organismo resistência ao antibiótico produzido. Porém em *S. clavuligerus* aquele gene não foi detectado. No entanto estes autores também observaram diferenças entre os "clusters" responsáveis pela biossíntese de Hol em ambos os micro-organismos, o que pode sugerir que *S. clavuligerus* possua outros mecanismos de tolerância a este bioativo, uma vez que, apenas concentrações acima de 25 mg.L^{-1} interferiram na biomassa, como observado no meio "L+G pH 7,2". Hol também foi produzido no meio "L+G pH 6,8" (Figura 5.1F), porém, o crescimento não foi afetado devido, provavelmente, à produção mais tardia do biocomposto e em menores concentrações. As

concentrações de Hol aqui obtidas são inéditas, uma vez que a literatura disponível tem mostrado que a capacidade produtiva da linhagem selvagem de *S. clavuligerus* para este biocomposto é desprezível nas condições de cultura até agora empregadas. Hol tem sido obtida somente por linhagens mutantes de *S. clavuligerus* com danos genéticos relacionados à síntese de AC (FUENTE et al., 2002; LIRAS, 2014). No entanto, as condições utilizadas no presente trabalho favoreceram a expressão do gene responsável pela síntese de Hol na linhagem selvagem, com exceção dos meios contendo somente lisina ("Lisina pH 6,8" e "Lisina pH 7,2"), independente do valor de pH utilizado. Os resultados de Hol são justificados pela vasta quantidade de informações genéticas que *S. clavuligerus* apresenta, incluindo a presença de genes silenciosos que se expressam apenas em determinadas condições de cultivo (MARTÍN e ALEGRE, 1984).

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).



A Figura 5.1D mostra produções crescentes de AC nos meios contendo apenas lisina, sendo os maiores valores obtidos no meio "Lisina pH 6,8". A severa degradação de AC em meio alcalino ($\text{pH} > 7$) tem sido comprovada por vários pesquisadores (BERSANETTI et al, 2005). Este comportamento ocorreu nos dois meios contendo glutamato, com destaque para o meio "L+G pH 7,4". Também, podemos observar uma relação inversa entre as produções de AC e de Hol, o que nos permite sugerir um comportamento semelhante entre linhagem selvagem e mutantes com danos genéticos relacionados à produção de AC (LIRAS, 2014). A produção de CefC (Figura 5.1E) também foi mais favorecida nos meios contendo apenas lisina. A menor produção de CefC observada no meios adicionados de glutamato ocorreu provavelmente pelo baixo consumo de lisina, precursor direto da molécula deste composto, e não pelo ambiente alcalino, dado que o aumento de pH e a biossíntese de CefC não apresentaram uma dependência evidente (SOUZA, 2017). Baptista (2015) observou que em condições utilizando meio de cultura "Lisina", apenas 50 mmol.L^{-1} de lisina (de 100 mmol.L^{-1} iniciais) foi consumido durante o cultivo, enquanto que em meios "L+G" este consumo foi reduzido em 50%, sendo a produção de CefC proporcional à assimilação do substrato. Em mutantes superprodutores de Hol, a produção de CefC é similar à observada com a linhagem selvagem (ALVAREZ-ALVAREZ et al., 2018), portanto podemos sugerir que a presença de Hol nos cultivos não interferiu na biossíntese de CefC.

De uma maneira geral, a variação de pH foi diferente em cada cultivo e influenciou não só a produção de CefC como a de outros compostos bioativos, conforme apresentado no corpo do texto. As concentrações de Hol obtidas em frascos agitados, frente à afirmação da literatura disponível de que a produção deste composto pela linhagem selvagem de *S. clavuligerus* é indetectável, motivaram introduzir este composto nos objetivos do presente trabalho, além de CefC.

Para a definição das condições de cultivo em biorreator, surgiu a questão: o que desencadeou a produção de Hol? A adição de glutamato ou o aumento de pH? ou ambos? Desta forma, experimentos em biorreator foram realizados empregando quatro condições de cultivo com controle de pH.

5.2 Cultivos em biorreator

Os resultados obtidos em frascos agitados evidenciaram o efeito positivo de lisina na produção dos compostos beta-lactâmicos e mostraram uma possível relação entre composição do meio e aumento da alcalinização (durante o crescimento) na produção de Hol. Porém, as diferenças na evolução do pH entre os cultivos não permitiram avaliar o desempenho do glutamato - positivo ou negativo - na produção de CefC. Para eliminar este problema, os mesmos meios de cultura foram testados em cultivos em batelada em biorreator, com pH controlado em 6.8, um valor comumente mantido em culturas submersas de *S. clavuligerus* (ROMERO, et al., 1984; LEITE et al., 2016), ou em pH 7.4, valor próximo do observado no início da produção de Hol nos experimentos em frascos agitados. As demais condições em biorreator estão descritas no item 4.3.

Os resultados das bateladas em meios "Lisina pH 6,8", "L+G pH 6,8", "Lisina pH 7,4" e "L+G pH 7,4" estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 5.2 a 5.5 a seguir, em bloco, para facilitar a visualização e a comparação entre os cultivos. Junto com os dados experimentais, estão representadas as curvas de ajuste dos modelos cinéticos propostos, cujas equações e correspondentes parâmetros serão apresentados e discutidos no item 5.3.

Figura 5.2: Batelada em meio "Lisina pH 6,8" a 28°C – Dados experimentais (cruz) e simulados (traço-dois pontos) de crescimento celular (C_x), de consumo maltose (C_{malt}) e lisina (C_{lis}), e de formação dos biocompostos cefamicina C (C_{cefC}) e ácido clavulânico (CAC) de cultivo em batelada em biorreator convencional de bancada, com pH controlado em 6,8.

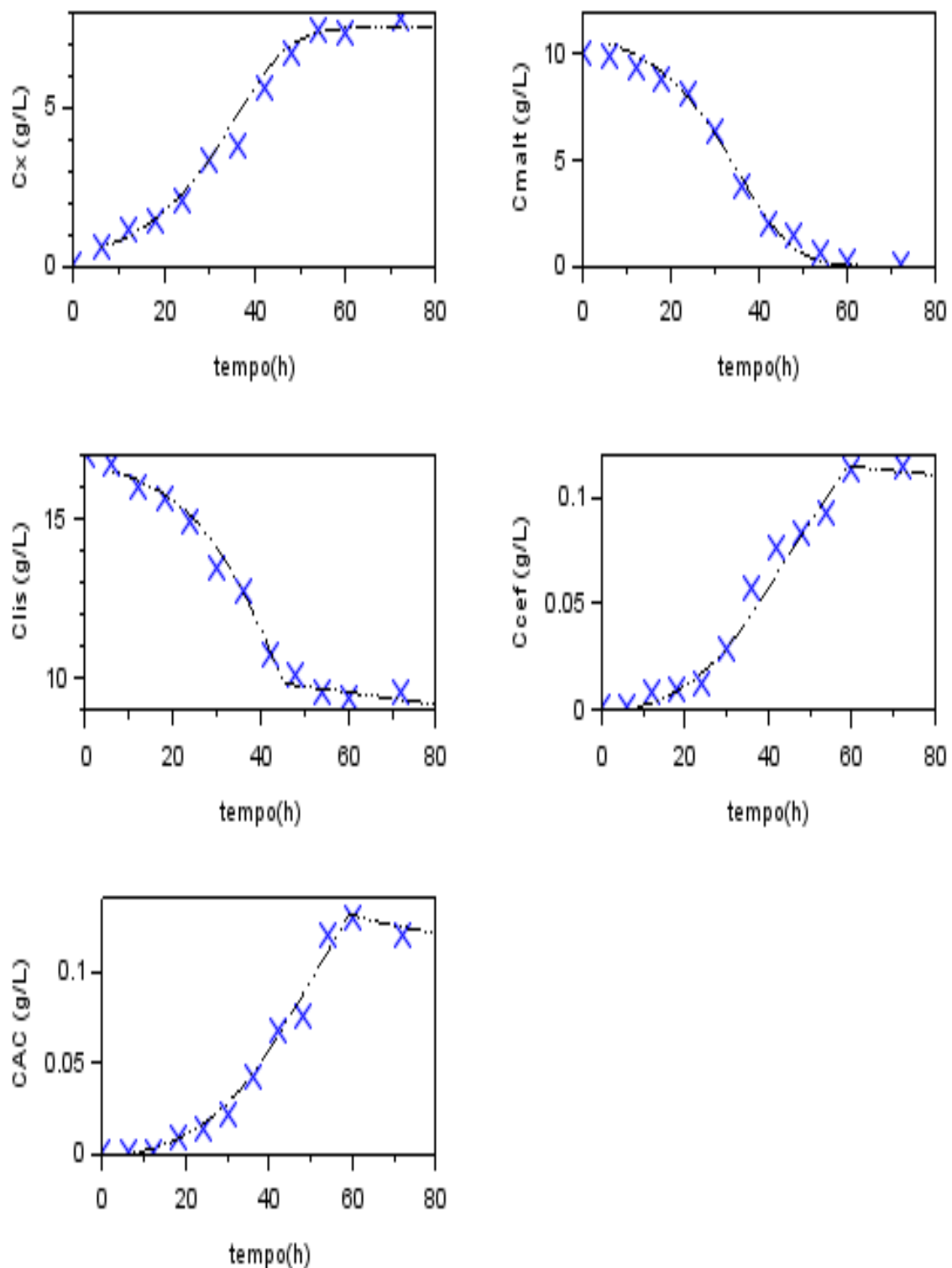


Figura 5.3: Batelada em meio "L+G pH 6,8" a 28°C – Dados experimentais (cruz) e simulados (traço-dois pontos) de crescimento celular (C_x), de consumo de glutamato (C_{glut}), maltose (C_{malt}) e lisina (C_{lis}), e de formação dos biocompostos cefamicina C (C_{cefC}) e ácido clavulânico (CAC) de cultivo em batelada em biorreator convencional de bancada, com pH controlado em 6,8.

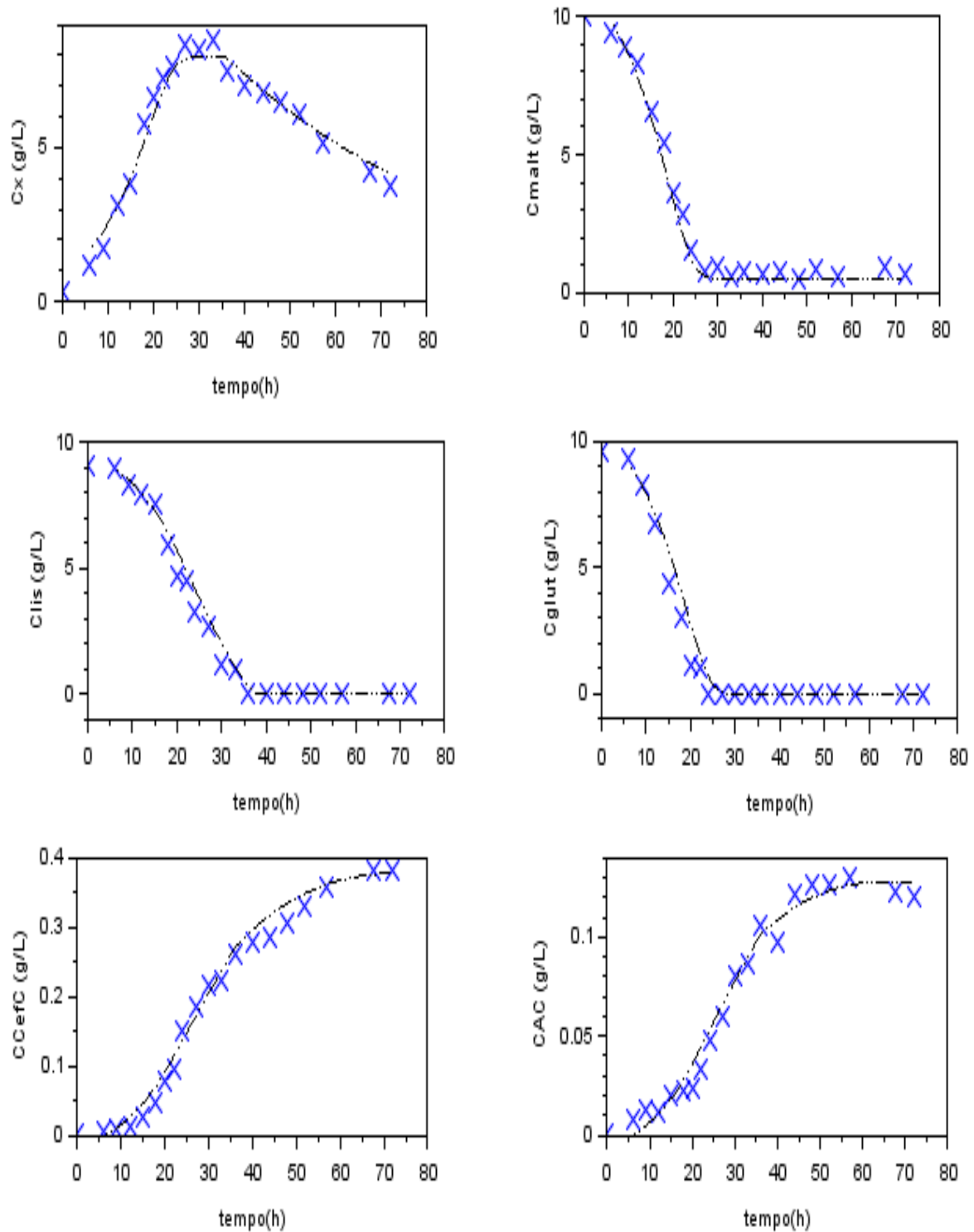


Figura 5.4: Batelada em meio "Lisina pH 7,4" a 28°C – Dados experimentais (cruz) e simulados (linha traço-dois pontos) de crescimento celular (C_x), de consumo maltose (C_{malt}) e lisina ($Clis$), e de formação dos biocompostos holomicina ($Chol$), cefamicina C (C_{cefC}) e ácido clavulânico (CAC) de cultivo em batelada em biorreator convencional de bancada, com pH controlado em 7,4.

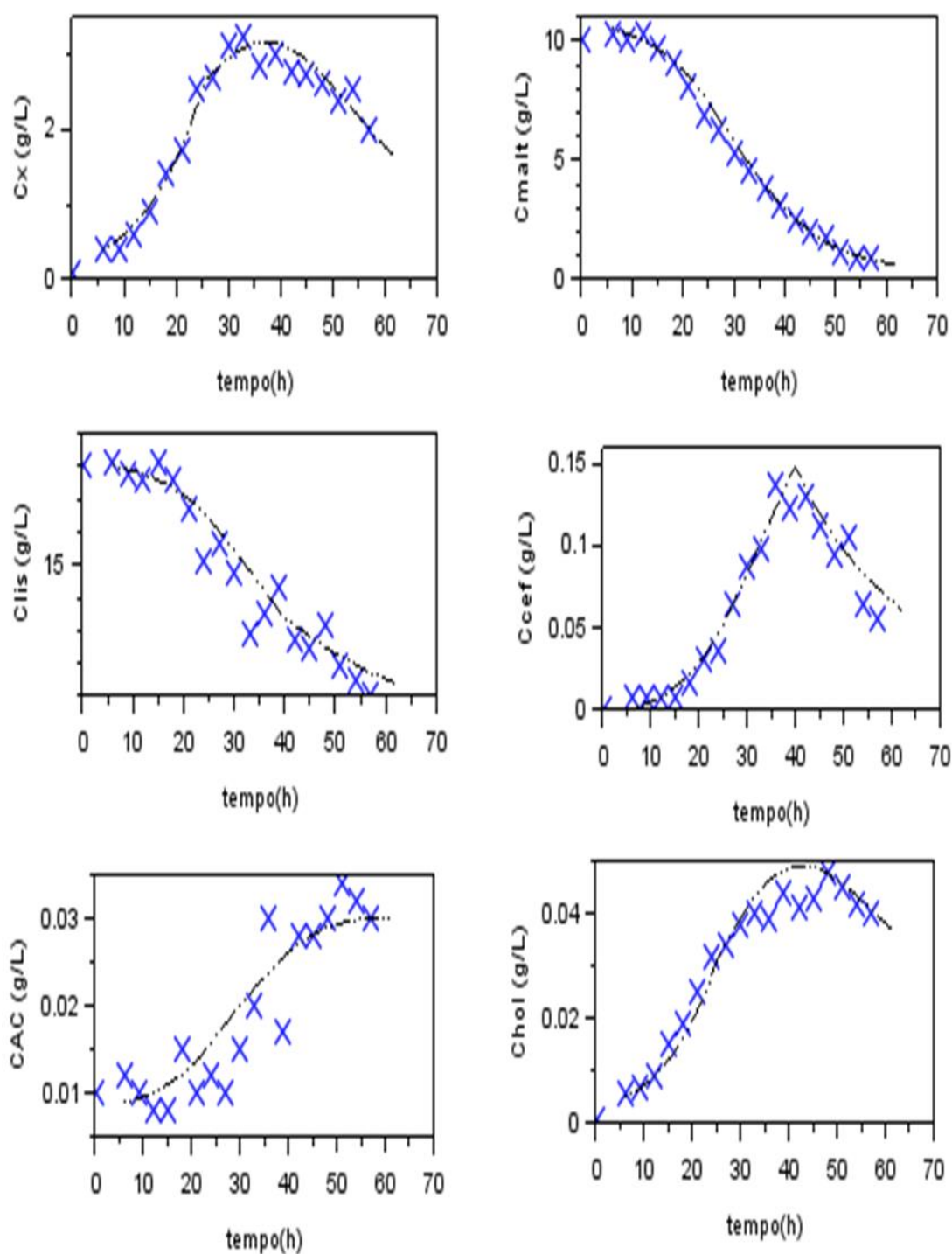
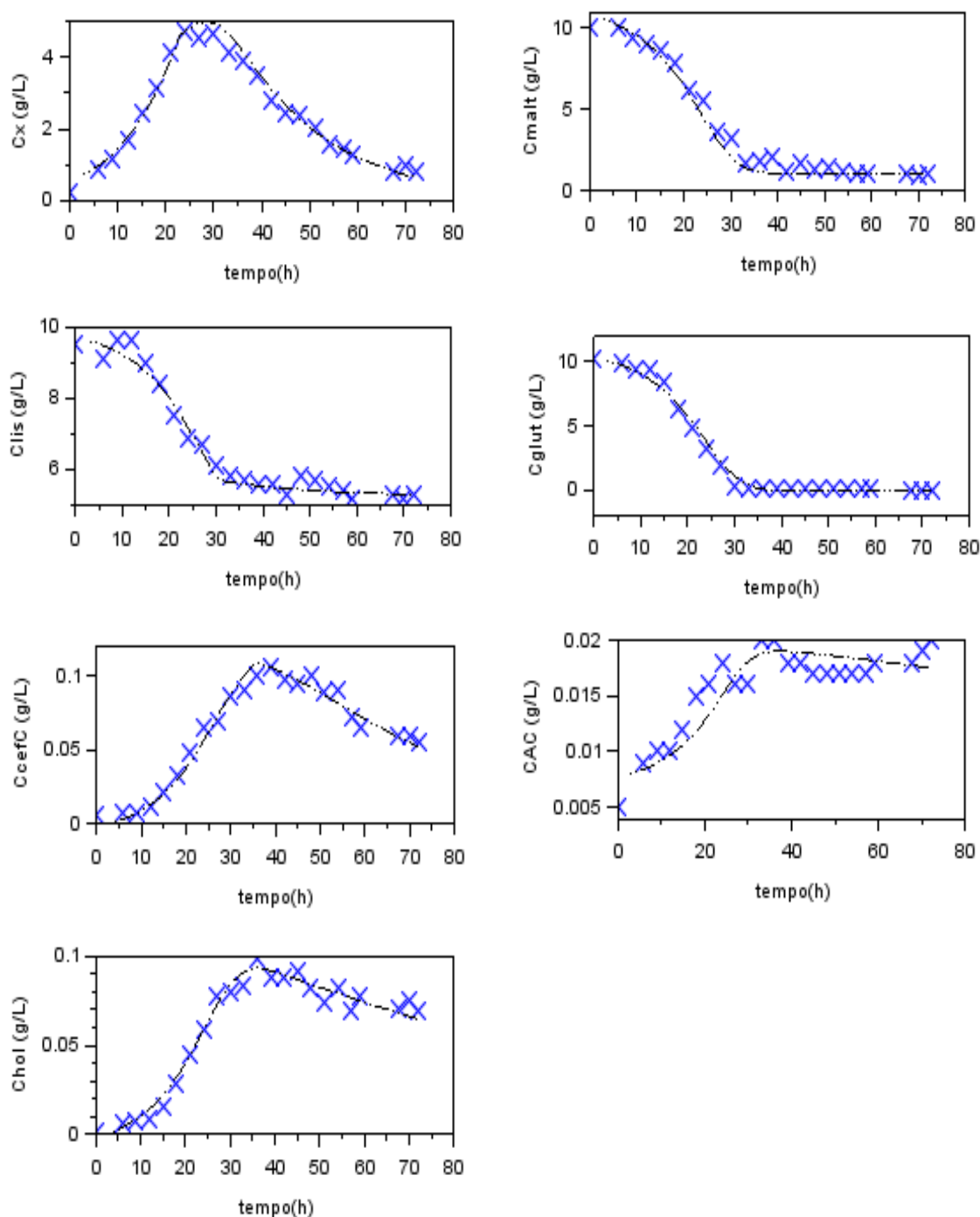


Figura 5.5: Batelada em meio "L+G pH 7,4" a 28°C – Dados experimentais (cruz) e simulados (linha traço-dois pontos) de crescimento celular (Cx), de consumo de glutamato (Cglut), maltose (Cmalt) e lisina (Clis), e de formação dos biocompostos holomicina (Chol), cefamicina C (CcefC) e ácido clavulânico (CAC) de cultivo em batelada em biorreator convencional de bancada, com pH controlado em 7,4.



Os perfis de concentração celular (Cx) das Figuras 5.2 a 5.4 mostram que a velocidade de crescimento do micro-organismo foi dependente da composição dos meios e independente dos valores de pH utilizados. Este comportamento era esperado, uma vez que a faixa ótima de pH para crescimento de *S. clavuligerus* situa-se entre 6 e 8 (Liras et al., 2008). Os meios controlados em pH 6,8, resultaram em concentração de células cerca de duas vezes maior que os meios mantidos em pH 7,4. Nestes meios ("Lisina pH 7,4" e "L+G pH 7,4"), ocorreu a produção de Hol que, conforme discutido anteriormente (item 2.1.1), deve ter causado danos às células. A condição mais adversa foi "Lisina pH 7,4", na qual se aliaram a produção de Hol e a assimilação mais difícil de lisina pelo micro-organismo.

Glutamato foi mais rapidamente consumido que maltose ou lisina em qualquer valor de pH (meios "L+G pH 6,8" e "L+G pH 7,4"), mostrando que foi o substrato mais facilmente assimilável por *S. clavuligerus*. Este comportamento também foi observado em trabalhos anteriores realizados no laboratório de Bioprocessos (BAPTISTA, 2015; SOUZA, 2017). Também, de forma inesperada, a presença de glutamato promoveu o aumento da velocidade de consumo de maltose. Nos meios em pH 7,4, ambas, velocidade de crescimento e concentração máxima de células, foram maiores no meio contendo glutamato. Na condição "L+G pH 7,4", porém, a queda da concentração celular após a fase exponencial foi mais acentuada, pois a concentração de Hol foi o dobro da obtida em "Lisina pH 7,4". SOUZA (2017) cultivou a linhagem selvagem de *S. clavuligerus* em frascos agitados em meio "L+G" (10 g.L⁻¹ de maltose, 50 mmol.L⁻¹ de lisina e 50 mmol.L⁻¹ de glutamato), porém com pH inicial do meio ajustado em 6,5. Neste experimento, o pH aumentou gradativamente até 7,8 ao final de 72 horas de processo, a concentração celular máxima atingiu cerca de 11 g.L⁻¹, e as produções de AC e CefC foram 80 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹, respectivamente. Não houve produção de Hol, mesmo nestas condições (pH final 7,8 e presença de glutamato). A produção de metabólitos secundários pode ser regulada por vários estímulos ambientais, inclusive pelo pH (PALMER E KELLER, 2010; BRAKHAGE et al., 2013). Um exemplo disto é a transcrição de genes responsáveis pela biossíntese de penicilina em *Aspergillus nidulans*, que é ativada em pH alcalino (LITZKA et al., 1998). Neste contexto, podemos sugerir que os valores de pH acima de 7,0 durante a fase exponencial de crescimento serviram como gatilho para ativação dos genes envolvidos na

biossíntese de Hol, favorecendo sua produção. Desta forma, os dados do presente experimento permitem concluir que a de *S. clavuligerus* iniciada em meio alcalino, aliada à presença de glutamato (meio "L+G pH 7,4"), favoreceu a obtenção de maiores concentrações de Hol, corroborando a hipótese proposta no início deste item. Trabalhos futuros devem ser feitos com o intuito de contornar os efeitos tóxicos de Hol na espécie *S. clavuligerus*, pois não há evidências de que mesmo mutantes desta espécie sejam resistentes à toxicidade do biocomposto (LIRAS, 2014).

Nos meios controlados em pH 6,8, houve produção de AC em torno de 140 mg.L⁻¹. Resultados desta ordem de grandeza têm sido obtidos no laboratório de Bioprocessos (CAVALLIERI et al, 2016), não havendo outros dados de produção de AC disponíveis na literatura em meios definidos equivalentes aos do presente trabalho. A produção de AC no meio "L+G pH 6,8" não diferiu daquela em meio "Lisina pH 6,8". Este resultado pode ser justificado em trabalho de Romero et al (1984), no qual se mostrou que a porcentagem de átomos de C incorporada à molécula de AC proveniente de glutamato foi cerca de sete vezes menor comparado a arginina ou ornitina. As condições dos cultivos controlados em pH 7,4 foram as mais prejudiciais para a produção de AC pois, além da alcalinidade propícia à degradação severa do biocomposto (BERSANETTI, 2005), houve produção de Hol. Estes resultados reforçam a hipótese de que a linhagem selvagem sofre algum dano na produção de AC quando seu metabolismo secundário é também conduzido para a produção de Hol, de maneira semelhante a linhagens mutantes produtoras de Hol (LIRAS, 2014).

A produção de CefC, por sua vez, atingiu valores entre 100 e 140 mg.L⁻¹ nas condições investigadas, exceto em meio "L+G pH 6,8", no qual a produção foi inesperadamente mais alta (~400 mg.L⁻¹). Não há dados na literatura reportando uma concentração de CefC desta ordem de grandeza em meios definidos. A produção de CefC, em torno de três vezes maior que a do inibidor de beta-lactamases AC, valida a hipótese anteriormente feita, na qual a presença de glutamato no meio poderia suprir o metabolismo primário do micro-organismo disponibilizando, assim, maiores concentrações de lisina para a produção do antibiótico. Nos cultivos em que houve produção de Hol (meios controlados em pH 7,4), a degradação de CefC foi acentuada após 40 horas de processo, com ênfase para a condição "Lisina pH 7,4".

5.3 Modelo cinético

Os resultados das bateladas em biorreator foram utilizados para propor um modelo matemático para descrever a relação entre crescimento celular, consumo de substratos e formação de compostos bioativos. As equações do modelo consistiram dos balanços de massa para células, substratos e os compostos CefC, AC e Hol. O monitoramento da formação de CO₂ nos gases de exaustão do biorreator (Figura 5.11) também auxiliou na proposição do modelo, comprovando que os meios contendo glutamato apresentaram as maiores velocidades de crescimento. Apesar disto, não houve diferença aparente entre as concentrações celulares máximas obtidas nos meios contendo ou não glutamato. Com isto, pôde ser postulado que maltose é o substrato limitante de crescimento e glutamato, além de fornecer N, é um substrato preferencialmente consumido como fonte de energia de crescimento. Por outro lado, o papel de lisina no crescimento foi considerado desprezível, em vista da menor afinidade do micro-organismo por este aminoácido (CAVALLIERI et al, 2016). Foi assumido, então, que lisina é, essencialmente, assimilada para metabolismo secundário, formação de proteína extracelular e geração de energia de manutenção celular (CAVALLIERI et al, 2016). Esta última proposta foi baseada no fato do catabolismo de lisina gerar duas moléculas de acetil-coenzima A geralmente metabolizadas no ciclo de Krebs, que é a principal via de fornecimento de energia para as células em condições de aerobiose.

O modelo cinético de Monod foi utilizado para o crescimento celular, sendo o modelo aditivo (BLANCH e CLARK, 1997) proposto para os meios que também continham glutamato (Equações 1 e 2). A equação de consumo de lisina consistiu de um termo para a manutenção celular e outro para a produção de compostos bioativos e de proteína extracelular. Esta produção foi governada por uma cinética de saturação análoga à cinética de Monod, dependente da concentração de lisina. Com relação à formação de compostos bioativos, foi adotada a cinética de Leudeking e Piret, a qual considera uma produção parcialmente associada ao crescimento celular (FREDRICKSON et al, 1970).

Os modelos cinéticos propostos explicaram bem o comportamento do micro-organismo nos meios utilizados, conforme se pode verificar pelas curvas ajustadas das Figuras 5.2 a 5.5. Os parâmetros do modelo matemático estão apresentados na Tabela 5.3, 5.4 e 5.5.

As simulações do modelo matemático mostraram que, basicamente, nenhum parâmetro foi influenciado pelo pH ou pela composição da(s) fonte(s) de N. Então, observou-se que, independente do valor de pH empregado nos cultivos, a velocidade específica máxima de crescimento foi aproximadamente a mesma para as culturas contendo como fonte(s) de C apenas maltose (meios “Lisina”) ($\mu_{\text{malt } 1}$) ou maltose e glutamato (meios “L+G”) ($\mu_{\text{malt } 2}$ somada de μ_{glut}), conforme os valores apresentados na Tabela 5.1.

Outra particularidade observada foi o coeficiente de rendimento de células para maltose e glutamato. Para ambos os substratos, este coeficiente foi ajustado em valores da mesma ordem de grandeza, ca. 0,7 g células/ g de substrato. Os valores dos parâmetros cinéticos também evidenciaram a preferência de *S. clavuligerus* em utilizar o glutamato como fonte de C e energia para o crescimento.

Tabela 5.1: Parâmetros cinéticos referentes as fontes de C dos cultivos simulado em Scilab.

Parâmetros	Lisina pH 6,8	L + G pH 6,8	Lisina pH 7,4	L + G pH 7,4
Velocidade específica máxima de crescimento em maltose (h^{-1})	$\mu_{\text{malt } 1}=0,13$	$\mu_{\text{malt } 2}=0,057$	$\mu_{\text{malt } 1}=0,17$	$\mu_{\text{malt } 2}=0,055$
Constante de Monod para maltose ($\text{g}_{\text{malt}}/\text{L}$)	$k_{\text{malt } 1}=7,0$	$k_{\text{malt } 2}=7,0$	$k_{\text{malt } 1}=7,0$	$k_{\text{malt } 2}=7,5$
Rendimento global de maltose a células ($\text{g}_x/\text{g}_{\text{malt}}$)	$Y_{\text{xmalt}}=0,66$	$Y_{\text{xmalt}}=0,67$	$Y_{\text{xmalt}}=0,7$	$Y_{\text{xmalt}}=0,72$
Velocidade específica máxima associada ao consumo de Glu (h^{-1})	-	$\mu_{\text{glut}}=0,078$	-	$\mu_{\text{glut}}=0,076$
Constante de Monod para Glu ($\text{g}_{\text{glut}}/\text{L}$)	-	$k_{\text{glut}}=1,5$	-	$k_{\text{glut}}=1,5$
Rendimento global de Glu a energia de crescimento ($\text{g}_x/\text{g}_{\text{malt}}$)	-	$Y_{\text{xglut}}=0,67$	-	$Y_{\text{xglut}}=0,66$

O coeficiente estequiométrico associado ao consumo de lisina para a formação de proteína extracelular e de compostos bioativos, $Y_{\text{x/lis}}$ foi o único parâmetro simulado que demonstrou variação nos valores (Tabela 5.2). A variação do valor deste coeficiente era esperada, pois foram observadas diferenças importantes de natureza e concentração dos compostos bioativos produzidos em cada cultivo.

Tabela 5.2: Parâmetros cinéticos referentes a fonte de N dos cultivos simulado em Scilab.

Parâmetros	Lisina pH 6,8	L + G pH 6,8	Lisina pH 7,4	L + G pH 7,4
Coeficiente de manutenção celular por Lis ($g_{lis}/(g_x \cdot h)$)	$m_{lis}=0,028$	$m_{lis}=0,028$	$m_{lis}=0,027$	$m_{lis}=0,028$
Velocidade específica máxima associada ao consumo de Lis (h^{-1})	$\mu_{lis}=0,039$	$\mu_{lis}=0,042$	$\mu_{lis}=0,042$	$\mu_{lis}=0,04$
Coeficiente associado à Lis para a formação de produtos e subprodutos (g_x/g_{lis})	$Y_{xlis}=0,44$	$Y_{xlis}=0,26$	$Y_{xlis}=0,39$	$Y_{xlis}=0,42$
Constante da cinética de consumo de Lis para a formação de produtos e subprodutos (g_{lis}/L)	$k_{lis}=27,0$	$k_{lis}=24,0$	$k_{lis}=25,0$	$k_{lis}=27,0$

Os coeficientes de morte celular (k_d), degradação dos bioativos (k_{CefC} , k_{AC} e k_{Hol}) e de produção de CefC associado à concentração celular (β_{CefC}) foram considerados somente para o período após a fase exponencial de crescimento e estão apresentados na Tabela 5.3. Os valores ajustados para estes coeficientes variaram entre os cultivos por causa das diferenças observadas entre as velocidades de declínio da concentração celular.

Como esperado, a maior taxa de morte celular foi observada nos cultivos nos quais se produziu Hol (“Lisina pH 7,4” e “L+G pH 7,4”). Nestes casos, observou-se a inibição do crescimento do micro-organismo em concentrações de Hol acima de 25 mg.L⁻¹ no caldo de cultivo. De um modo geral, apesar dos compostos bioativos serem produtos do metabolismo secundário de *S. clavuligerus*, os dados experimentais não deixaram dúvidas de que as biossínteses dos três bioativos (AC, CefC e Hol) mostraram-se mais associadas ao crescimento microbiano. Os valores simulados dos parâmetros do modelo de Leudeking comprovaram este fato.

Tabela 5.3: Parâmetros cinéticos referentes aos biocompostos produzido nos cultivos simulado em Scilab.

Parâmetros	Lisina pH 6,8	L + G pH 6,8	Lisina pH 7,4	L + G pH 7,4
Coeficiente médio de morte celular (h^{-1})	$k_d=0,0000$	$k_d=0,0$ (*) 0,018	$k_d=0,0$ (*) 0,058	$k_d=0,0$ (*) 0,053
Coeficiente da cinética de Leudeking-Piret para CefC, associado ao crescimento (g_{CefC}/g_x)	$\alpha_{CefC}=0,005$ 3	$\alpha_{CefC}=0,00$ 52	$\alpha_{CefC}=0,005$ 4	$\alpha_{CefC}=0,00$ 53
Coeficiente da cinética de Leudeking-Piret para CefC, não associado ao crescimento ($g_{CefC}/(g_x \cdot h)$)	$\beta_{CefC}=0,000$ 36	$\beta_{CefC}=0,00$ 14	$\beta_{CefC}=0,001$ 8	$\beta_{CefC}=0,00$ 07
Coeficiente médio de degradação de CefC (h^{-1})	$k_{CefC}=0,0$ (*) 0,026	$k_{CefC}=0,0$ (*) 0,015	$k_{CefC}=0,0$ (*) 0,093	$k_{CefC}=0,0$ (*) 0,036
Coeficiente da cinética de Leudeking-Piret para AC, associado ao crescimento (g_{AC}/g_x)	$\alpha_{AC}=0,0026$	$\alpha_{AC}=0,002$ 5	–	–
Coeficiente da cinética de Leudeking-Piret para AC, não associado ao crescimento ($g_{AC} (g_x \cdot h)$)	$\beta_{AC}=0,0005$ 2	$\beta_{AC}=0,000$ 5	–	–
Coeficiente médio de degradação de AC (h^{-1})	$k_{AC}=0,0$ (*) 0,035	$k_{AC}=0,0$ (*) 0,018	–	–
Coeficiente da cinética de Leudeking-Piret para Hol, associado ao crescimento (g_{Hol}/g_x)	–	–	$\alpha_{Hol}=0,011$	$\alpha_{Hol}=0,014$
Coeficiente da cinética de Leudeking-Piret para Hol, não associado ao crescimento ($g_{Hol}/(g_x \cdot h)$)	–	–	$\beta_{Hol} \cong 0$	$\beta_{Hol} \cong 0$
Coeficiente médio de degradação de Hol (h^{-1})	–	–	$k_{Hol}=0,0$ (*) 0,033	$k_{Hol}=0,0$ (*) 0,012

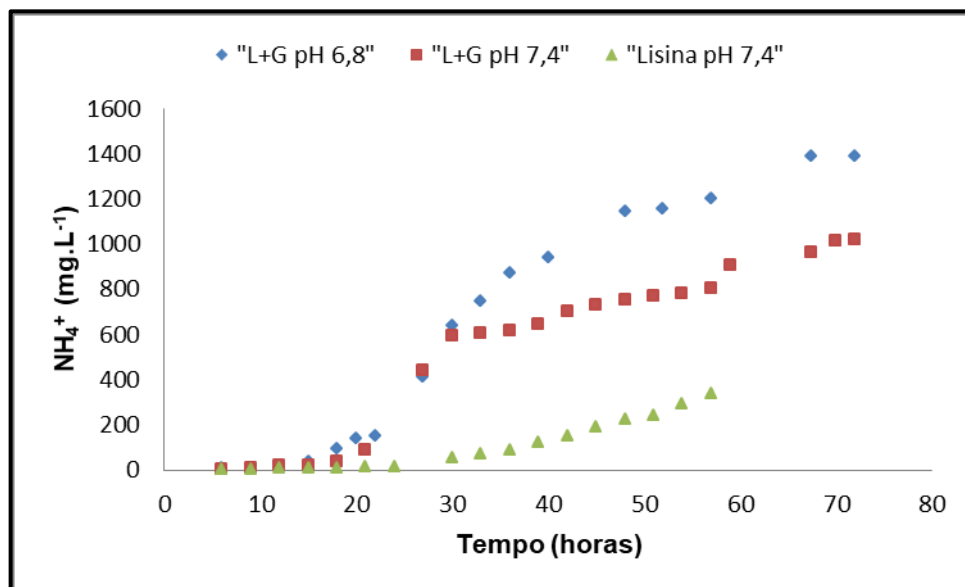
5.4 Formação de íons amônio nas culturas

A concentração de NH_4^+ no caldo de cultivo foi analisada com o intuito de realizar os balanços de N de cada cultivo.

Sabe-se que altas concentrações de íons amônio (NH_4^+) no meio de cultivo afetam de forma negativa a produção de biocompostos (BRAÑA,1986). Portanto, analisar a concentração de NH_4^+ no meio de cultivo é de grande importância, os perfis de evolução de NH_4^+ dos cultivos em biorreator estão apresentados na Figura 5.6. Como a concentração de íons amônio no caldo esta diretamente associada com o consumo de aminoácidos, a batelada que apresentou maiores valores de NH_4^+ (ca. 1400 mg.L^{-1}) foi a condição de meio "L+G pH 6,8", onde os 100 mmol.L^{-1} de aminoácidos foram consumidos. Valores similares foram observados na condição "L+G pH 7,4", aproximadamente 1000 mg.L^{-1} e um consumo de 75 mmol.L^{-1} das fontes de nitrogênio, atestando que a evolução dos íons é proporcional ao consumo dos aminoácidos.

A condição "Lisina pH 7,4" foi a que apresentou as menores concentrações de NH_4^+ , apenas 350 mg.L^{-1} , sendo justificado por ser um meio de cultura composto por lisina como única fonte de nitrogênio e pelo consumo modesto deste aminoácido. Apesar de não ter sido analisada a evolução dos íons amônio no cultivo "Lisina pH 6,8", pode-se inferir que este tenha apresentado concentrações semelhantes ao cultivo "Lisina pH 7,4", em função do consumo de lisina, que foi o mesmo em ambas as culturas, cerca de 40 mmol.L^{-1} .

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 *S. clavuligerus* ATCC 27064.



A literatura tem reportado que concentrações entre 350 a 900 mg.L⁻¹ de NH₄⁺ afetam a biossíntese de beta-lactâmicos (BRAÑA,1986; DEMAÏN, 2006). Desta forma, as altas concentrações de NH₄⁺ observadas nos meios "L+G pH 6,8" e "L+G pH 7,4" devem ter contribuído para a degradação dos biocompostos, sendo a biossíntese de CefC afetada em menor grau do que AC. Os dados indicaram que as maiores concentrações de NH₄⁺ foram observadas nos cultivos contendo glutamato. Este comportamento também foi constatado por SOUZA (2017).

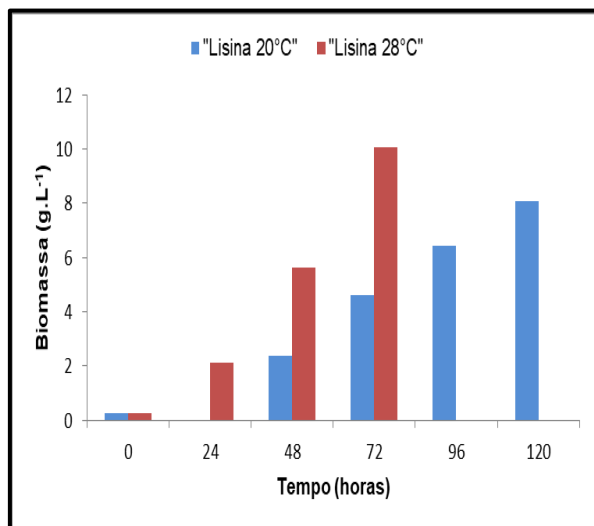
Fonseca (2018) investigou a influência da temperatura e dos íons amônio sobre AC e constatou que a 20°C, a formação de íons amônio tornou-se mais lenta, favorecendo a obtenção de maiores concentrações daquele metabólito. As maiores estabilidade e produtividade de AC em baixas temperatura já foram observadas por alguns autores (BERSANETTI et. al, 2005; COSTA e BADINO, 2012; FONSECA, 2018; RODRIGUES, 2015). No entanto ainda não existem dados que relacionem o lento metabolismo de *S. clavuligerus* em temperaturas inferiores a 28°C à maior produção de CefC. Desta forma, tendo em vista reduzir a concentração de íons amônio no meio de cultivo ao longo da fase de produção dos beta-lactâmicos, novos experimentos em frascos agitados foram propostos, utilizando os meios cultura "L+G

pH 6,8" e "Lisina pH 6,8" em duas temperaturas 20°C e 28°C. Estes novos cultivos foram denominados "L+G t 20°C", "Lisina t 20°C", "L+G t 28°C" e "Lisina t 28°C".

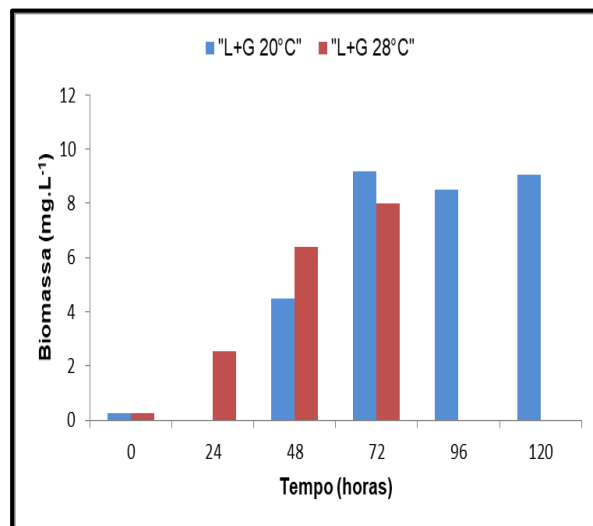
Os cultivos em 20°C foram prolongados em 48 horas, pois nesta condição de temperatura o metabolismo do micro-organismo foi atenuado pela mudança brusca de temperatura, uma vez que o inóculo para a fermentação principal foi preparado a 28°C.. Esta diferença de temperatura entre os meios de inóculo e o de produção conferiu uma fase lag maior para o cultivo.

A Figura 5.7 apresenta os perfis de crescimento e evolução de pH em ambas as temperaturas. A maior concentração de células foi observada no cultivo a 28°C composto por apenas lisina como fonte de N (Figura 5.7A), provavelmente a maior formação de biomassa esta associada à temperatura utilizada, que forneceu a condição ideal ao crescimento do micro-organismo. Como esperado os maiores valores de pH foram observados independente da temperatura utilizada nos meios adicionados de glutamato (Figura 5.7D). Ainda, vale salientar que apesar do período de cultivo a 20°C ter sido prolongado, este exibiu o mesmo comportamento que os cultivos em condições padrão de cultura.

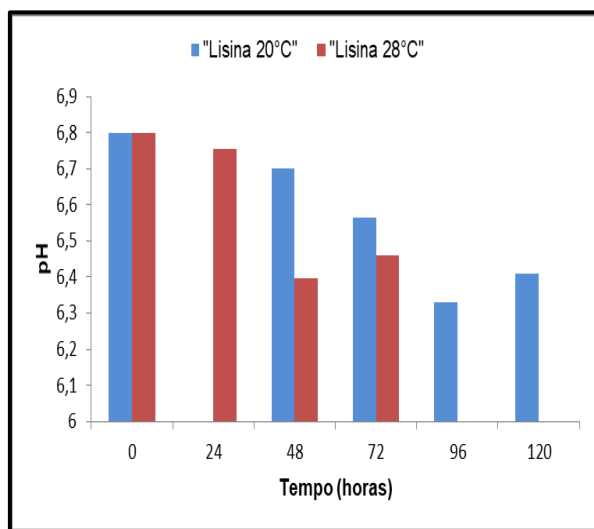
Figura 5.7: Perfis de crescimento e evolução dos valores de pH nos cultivos de *S. clavuligerus* ATCC 27064 em frascos agitados com pH inicial a 6,8: Formação de biomassa dos meios contendo lisina como fonte de N a 20°C e 28°C (A), Formação de biomassa dos meios contendo lisina e glutamato como fontes 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).



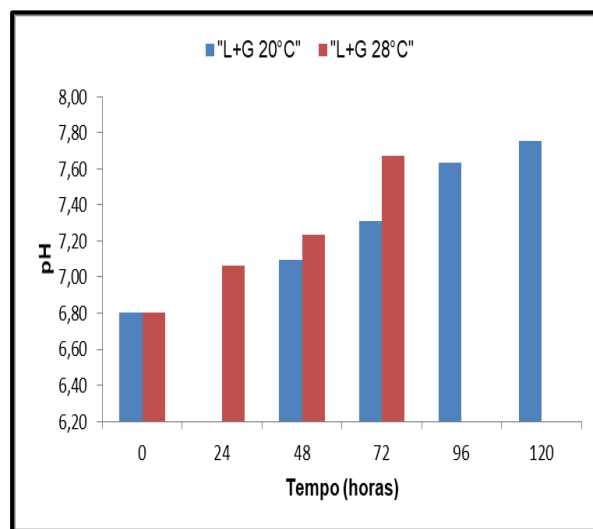
(A)



(B)



(C)



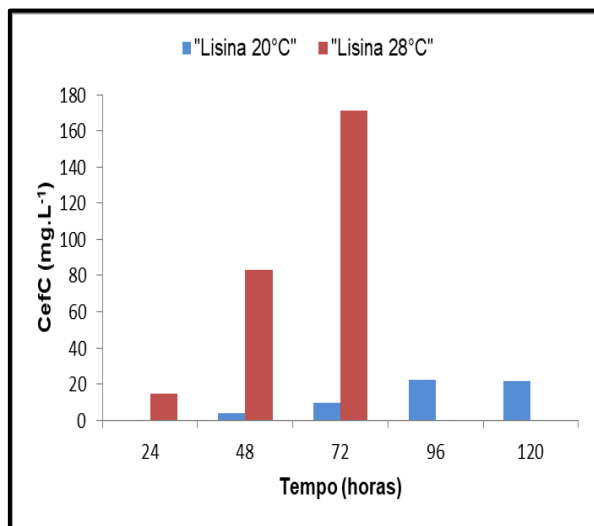
(D)

Quanto à biossíntese de bioativos, o melhor desempenho foi observado em "Lisina t 28°C" (Figura 5.8A), com cerca de 170 mg.L⁻¹ e 90 mg.L⁻¹ de CefC e AC, respectivamente. Este panorama não era esperado, uma vez que existem alguns estudos que indicam que temperaturas amenas (entre 20°C e 22°C) favorecem maior biossíntese de AC. Costa e Badino (2012) e Fonseca (2018) conseguiram

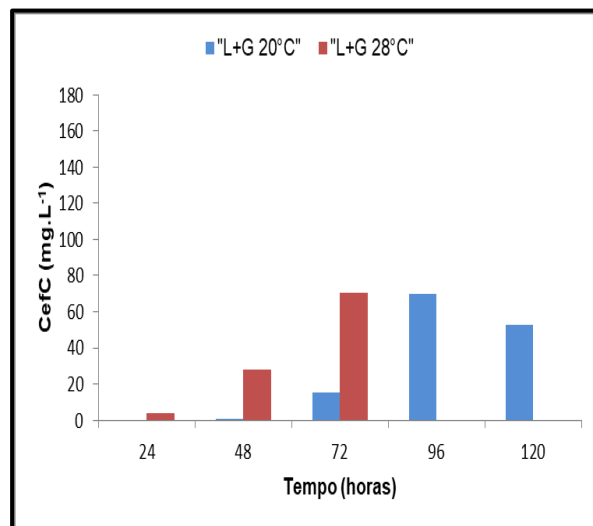
obter cerca de 1 g.L^{-1} de AC em cultivos a 20°C , porém nestes trabalhos a fonte de C e energia utilizada foi o glicerol, um dos precursores da molécula deste composto. Além disto, o micro-organismo foi cultivado em meios de cultura complexos. Provavelmente, a baixa produção de AC no meio "L+G t 20°C " (Figura 5.8D) está relacionada à composição do meio de cultura utilizado.

As condições "L+G t 20°C " e "L+G t 28°C " (Figuras 5.8B e 5.8D) no período de 96 e de 72 horas respectivamente, resultaram em valores próximos de concentração de CefC ou AC. A biossíntese de AC foi desprezível em valores de pH acima de 7,0 decorrentes do rápido consumo de glutamato. Este aumento de pH mostrou-se diretamente relacionado com o aumento na formação de NH_4^+ no caldo de cultivo ocasionando, assim, maior degradação de AC (Figura 5.8D) (BERSANETTI et. al, 2005; RODRIGUES, 2015). CefC teve produção afetada em 60% nos meios "L+G t 20°C " e "L+G t 28°C " (Figura 5.8B). Provavelmente, nessas condições a lisina não foi bem assimilada por *S. clavuligerus*, uma vez que, já foi observado que em cultivos em frascos agitados contendo glutamato e lisina em condições semelhantes, apenas 50% de lisina é consumida (BAPTISTA, 2015; SOUZA, 2017). Portanto o baixo consumo de lisina pode ter impossibilitado uma maior obtenção de CefC, visto que, este aminoácido é precursor direto da biossíntese desse antibiótico. Apesar de o pH ter aumentado durante os cultivos "L+G t 20°C " e "L+G t 28°C ", alcançando valores em torno de 8,0 não houve indícios da presença de Hol nos meios de cultura. Isto pode ser explicado, pois os cultivos atingiram valores de pH acima de 7,3, valor que geralmente induz a produção de Hol, somente após 48 horas de cultivos. Desta forma, as enzimas e precursores essenciais para biossíntese dos outros metabólitos secundários já haviam sido formadas durante o início do processo.

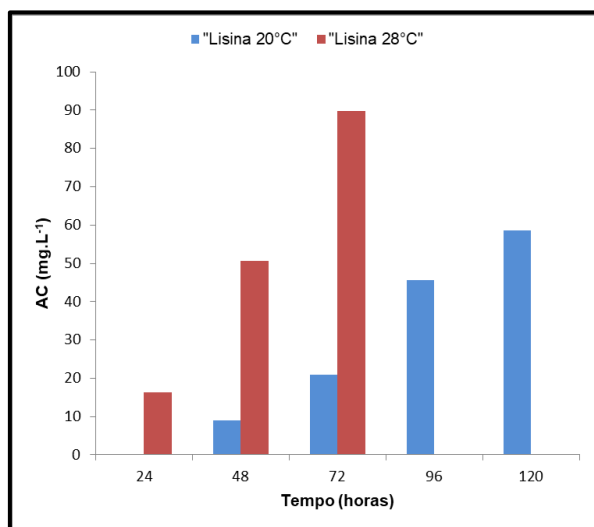
Figura 5.8: Perfis de produção de biocompostos nos cultivos de *S. clavuligerus* ATCC 27064 em frascos agitados com pH inicial a 6,8: Produção de CefC dos meios contendo lisina como fonte de N a 20°C e 28°C (A), Produção de CefC dos meios contendo lisina e glutamato como fontes de N a 20°C e 28°C (B), 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).



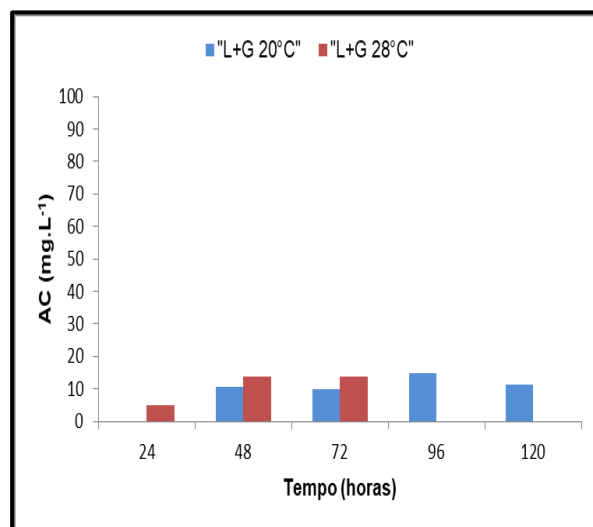
(A)



(B)



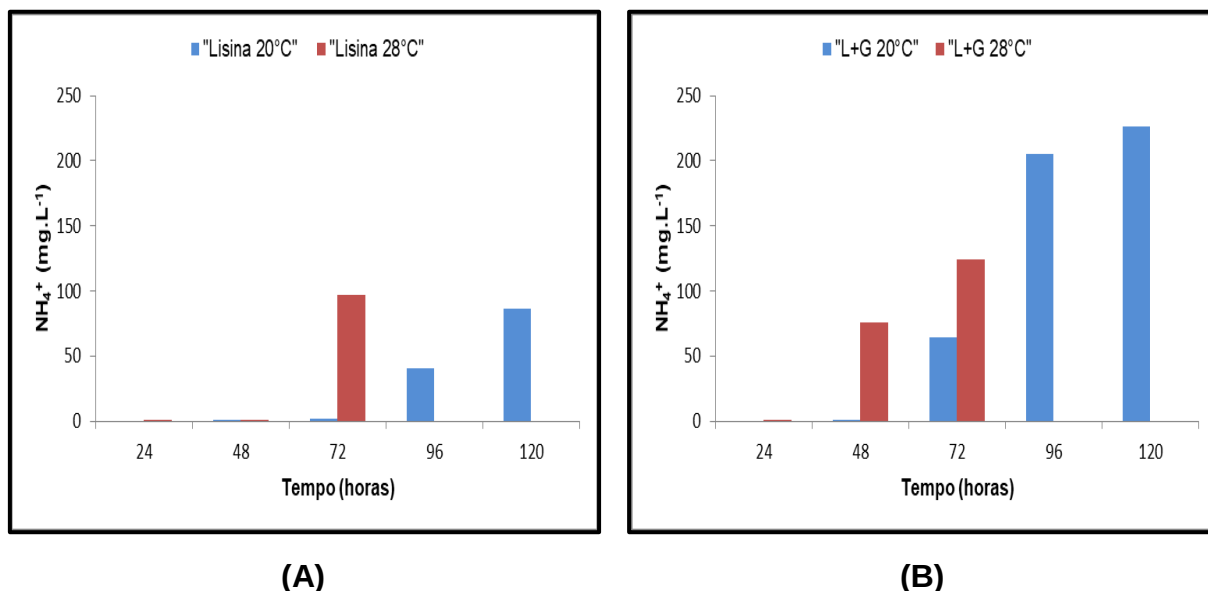
(C)



(D)

A formação de NH_4^+ nos cultivos a 20°C foi mais lenta comparada às obtidas nos cultivos a 28°C (Figura 5.9), corroborando com os resultados obtidos por Fonseca (2018). No entanto o lento acúmulo de NH_4^+ no caldo de cultivo não refletiu em maiores concentrações de bioativos nos meios utilizados no presente trabalho.

Figura 5.9: Perfis de formação de NH_4^+ nos cultivos de *S. clavuligerus* 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).

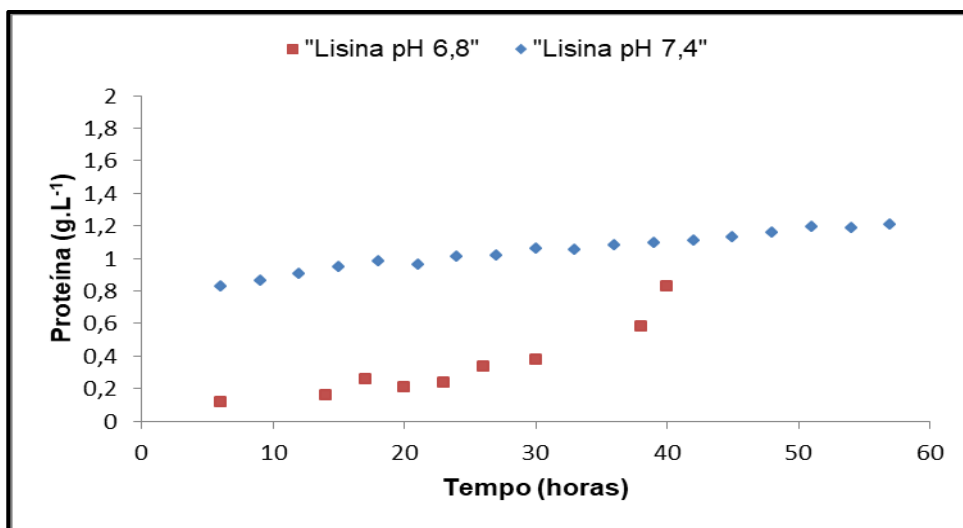


5.5 Secreção de Proteínas

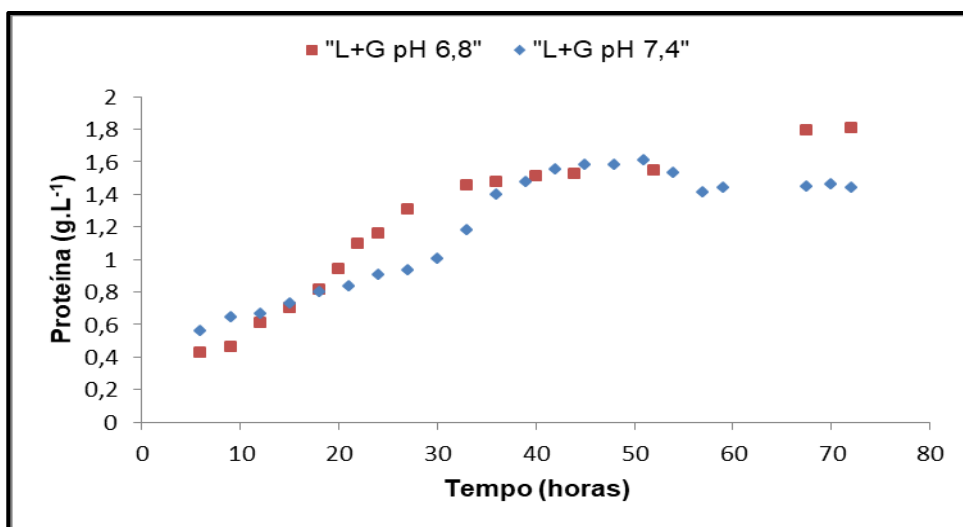
A concentração de proteínas extracelulares secretadas durante o processo fermentativo foi monitorada para cálculos de balanço de matéria para C e N, apresentados a seguir.

Nos meios "L+G pH 6,8" e "L+G pH 7,4" (Figura 5.10B), as concentrações de proteínas extracelulares no caldo de cultivo foram crescentes até atingirem valores de 1,5 g.L⁻¹, estabilizando-se até o final do processo fermentativo. Em "Lisina pH 6,8" e "Lisina pH 7,4" (Figura 5.10A), também foi observado uma secreção proteica progressiva durante os cultivos. No entanto, nestas condições o aumento de proteínas extracelulares no caldo ocorreu de forma mais lenta e menor que 50% com relação às condições contendo também glutamato.

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).



(A)



(B)

5.6 Evolução de CO₂

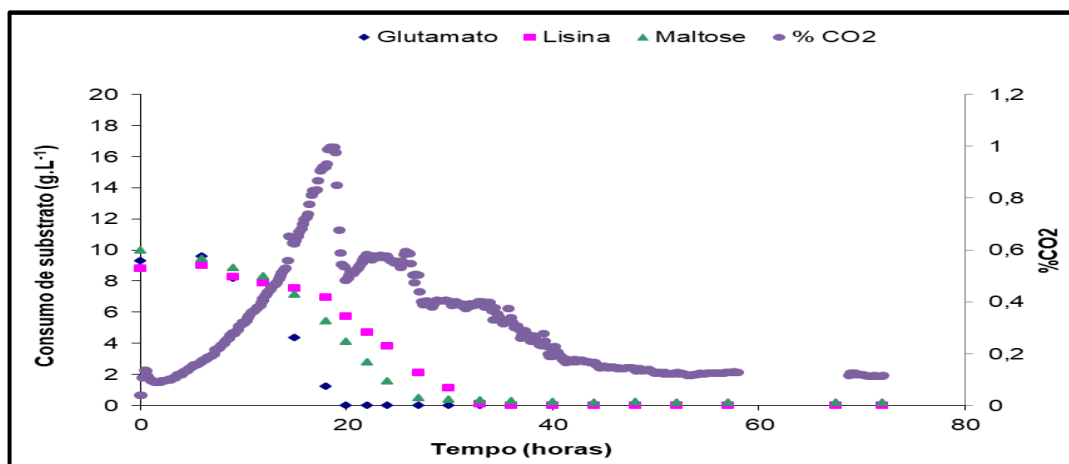
O cultivo "Lisina pH 6,8" foi realizado para o estudo comparativo entre os cultivos e o perfil de CO₂ foi apresentado em trabalho anterior (CAVALLIERI, 2014). Neste trabalho CO₂ foi medido com o analisador de gases Quantek modelo 902P. Os dados de CO₂ dos demais cultivos (Figura 5.11) permitiram acompanhar o metabolismo do micro-organismo perante o consumo dos substratos, uma vez que a

liberação deste gás está diretamente associada com o consumo de C. Em "L+G pH 6,8" (Figura 5.11A), foi possível observar que a máxima respiração deu-se em torno de 19 horas de cultivo (ca. 0,9% de CO₂ liberado), coincidindo com o período da exaustão de glutamato. Após o consumo total desta fonte de C e N preferencial por *S. clavuligerus*, notou-se que o micro-organismo mudou seu metabolismo para assimilação da fonte de C restante no caldo de cultivo (maltose), exibindo uma acentuada queda na respiração, ca. 33% menor. Com o fim da maltose, o crescimento celular entrou em declínio e novamente foi observada uma nova mudança de metabolismo, durante o consumo de lisina residual. O conjunto de dados de concentração de células e substrato, além de comprovar a intensa atividade respiratória durante a fase exponencial (etapa de acentuada atividade metabólica) também corroborou com os parâmetros cinéticos simulados. Estes evidenciaram a preferência do micro-organismo por glutamato e o uso de lisina como fonte de manutenção e energia para as células e para a produção de biocompostos.

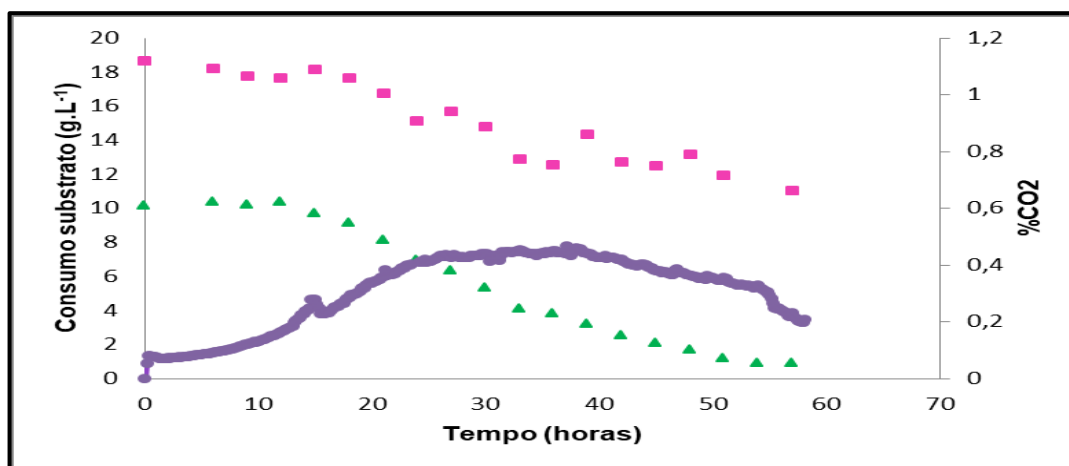
Utilizando apenas lisina como fonte de N ("Lisina pH 7,4"), um novo perfil de liberação de CO₂ foi observado (Figura 5.11B). Durante o consumo de maltose a evolução foi progressiva atingindo aproximadamente 0,4% de CO₂, que permaneceu constante até Hol apresentar concentrações máximas no caldo de cultivo.

O meio "L+G pH 7,4" exibiu comportamento semelhante ao meio "L+G pH 6,8" durante o consumo de glutamato, quando a máxima porcentagem de CO₂ foi alcançada (Figura 5.11C). O glutamato foi exaurido por volta de 24 horas de cultivo, quando a liberação de CO₂ foi reduzida (ca. 87%). Esta redução respiratória foi associada ao decréscimo celular de 50%, causado pela alta concentração de Hol no cultivo.

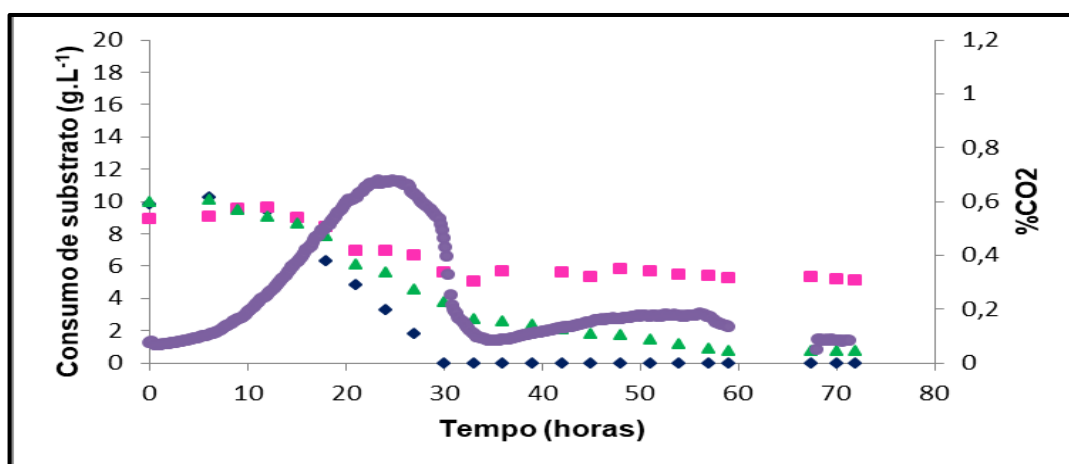
Figura 5.11: Perfis de evolução de CO₂ nos cultivos em batelada realizados em biorreator a 28°C: "L+G pH 6,8" (A), "Lisina pH 7,4" (B) e "L+G pH 7,4".



(A)



(B)



(C)

5.7 Reações do modelo metabólico

O modelo metabólico utilizado para simulação das distribuições de fluxos foi baseado no utilizado por CAVALLIERI et al. (2016) e suplementados com as reações de biossíntese de Hol. A rede metabólica é composta por 89 reações que representam o metabolismo de *S. clavuligerus*. As reações estão anexadas no Apêndice A.

5.8 Distribuições de fluxos metabólicos e Balanços de massa para o Carbono

Para a simulação de fluxos metabólicos utiliza-se um modelo construído do metabolismo do organismo que se baseia na estequiometria das principais reações bioquímicas. As porcentagens de C, N e O₂ na entrada devem ser mantidas nos compostos de saída. Desta forma, os resultados experimentais de consumo de substratos (maltose, lisina e glutamato) são os dados de entrada no programa “Optflux” e espera-se que o balanço de massa feche em 100% para os dados de saída (biomassa, proteína extracelular, os biocompostos AC, CefC e Hol, e o CO₂ dos gases de exaustão do biorreator). Para trabalhos de distribuição de fluxos metabólicos do laboratório de Bioprocessos, tem sido adotada como base de cálculo 100 mmol C, incluindo todos os substratos dos cultivos, ou seja, maltose, lisina e glutamato (quando utilizado) (CAVALLIERI et al., 2016).

Com os dados obtidos nos cultivos "L+G pH 6,8", "Lisina pH 7,4" e "L+G pH 7,4" realizaram-se os balanços de carbono (Tabela 5.4, 5.5, 5.6 e 5.7) para a simulação do modelo metabólico. O cultivo "Lisina pH 6,8" foi realizado somente para comparar dados cinéticos (item 5.3), uma vez que estudo de fluxos metabólicos já foram publicados para esta condição (CAVALLIERI et al., 2016).

A fim de eliminar as variações dos pontos experimentais coletados no processo aplicou-se uma linha de tendência dos perfis dos componentes (concentração x tempo), utilizando-se a função polinomial mais adequada de ajuste aos dados (LE DUY e ZAJIC, 1973). A fase exponencial de crescimento (fase log) foi escolhida para a simulação, de forma que foram consideradas as variações globais dos componentes de cada cultivo, método baseado em Goel et al. (2003). A fim de se excluir a fase lag e a fase de desaceleração de crescimento, foram adotados diferentes intervalos de tempo para os cultivos.

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 *S. clavuligerus* ATCC 27064 em biorreator.

Metabólitos	Variação global		Fluxo Normalizado
	g.L ⁻¹	mmol.L ⁻¹	
Maltose	5,39	14,96	3,35
Lisina	2,20	12,04	2,69
Glutamato	7,30	38,99	8,73
Biomassa	4,87	4,866	1,09
CefC	0,07	0,161	0,04
AC	0,03	0,139	0,03
Proteína	0,41	3,800	0,85
CO ₂	8,69	197,409	44,20

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 *S. clavuligerus* ATCC 27064 em biorreator.

Metabólitos	Variação global		Fluxo Normalizado
	g.L ⁻¹	mmol.L ⁻¹	
Maltose	3,69	10,25	4,32
Lisina	3,49	19,09	8,04
Glutamato	0,82	4,40	1,85
Biomassa	2,60	2,60	1,10
CefC	0,13	0,29	0,12
AC	0,05	0,27	0,11
Proteína	0,30	2,75	1,16
CO ₂	5,46	124,11	52,24

Tabela 5.6: Variações globais de consumo de substratos e formações de produtos durante a fase exponencial do cultivo "Lisina pH 7,4" de *S. clavuligerus* ATCC 27064 em biorreator.

Metabólitos	Variação global		Fluxo Normalizado
	g.L ⁻¹	mmol.L ⁻¹	
Maltose	5,93	16,46	4,96
Lisina	4,10	22,43	6,75
Glutamato	0,00	0,00	0,00
Biomassa	2,58	2,58	0,78
CefC	0,10	0,23	0,07
AC	0,02	0,08	0,02
Hol	0,03	0,13	0,04
Proteína	0,19	1,74	0,52
CO ₂	8,17	185,73	55,92

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 *S. clavuligerus* ATCC 27064 em biorreator.

Metabólitos	Variação global		Fluxo Normalizado
	g.L ⁻¹	mmol.L ⁻¹	
Maltose	4,11	11,43	2,88
Lisina	2,20	12,04	3,03
Glutamato	7,04	37,61	9,46
Biomassa	3,00	3,00	0,76
CefC	0,04	0,08	0,02
AC	0,01	0,04	0,01
Hol	0,06	0,28	0,07
Proteína	1,03	9,47	2,38
CO₂	8,85	201,05	50,58

Foram selecionados os períodos de 9 a 30 horas para "Lisina pH 7,4" e 9 a 24 horas para "L+G pH 7,4". Para "L+G pH 6,8" foi necessário escolher dois intervalos distintos, 9 a 20 horas e 20 a 30 horas. Isto foi feito em virtude da descontinuidade apresentada na evolução de CO₂, em consequência da mudança de metabolismo durante o consumo dos substratos (Figura 5.12).

Foram utilizados dados experimentais de substratos (maltose, lisina e glutamato), biomassa, proteína e bioativos (CefC, AC e Hol) como valores de restrições externas dos fluxos para simulação dos intervalos, e os dados de O₂, CO₂, NH₃ e produção de energia foram determinados pelo software Optflux.

Os balanços de C realizados para os cultivos ("L+G pH 6,8", "Lisina pH 7,4" e "L+G pH 7,4") foram bem satisfatórios, apresentando valores de 99,99% e 97,40% para os intervalos de tempo selecionados para a condição "L+G pH 6,8", e 94,5% e 96,39% para as condições "Lisina pH 7,4" e "L+G pH 7,4", respectivamente. A relação entre saída e entrada de C nos processos foi muito próxima de 1, comprovando a precisão das análises de consumo de substratos e formação de produtos.

Para AEF é necessário assumir uma função objetivo, sendo a maximização do crescimento a comumente utilizada em trabalhos de análise de fluxos (KNORR et al, 2007). Porém para a simulação do metabolismo de micro-organismos produtores de metabólitos secundários, a escolha da função objetivo é um grande desafio, uma vez que o metabolismo secundário não é essencial ao crescimento celular e a produção de bioativos geralmente acontece em condições de crescimento limitado

(BIBB, 2005; BUSHEL, 2006). Deste modo, a maximização do crescimento não é apropriada para micro-organismos produtores de biocompostos. Por outro lado, a maximização da produção de antibiótico também não se mostra uma função objetiva ideal para a distribuição de fluxos, dado a biossíntese deste composto não é ser o objetivo principal do sistema microbiano (KHANNAPHO et al., 2008). Sendo assim, a evolução encontrou um equilíbrio entre o crescimento celular, a produção de biocompostos e outras funções celulares (ZAKRZEWSKI et al., 2012).

SCHUETZ et al (2007) estudaram onze funções objetivo em seis condições de cultura de *Escherichia coli* e observaram que o critério de otimização ideal foi dependente do comportamento do micro-organismo nos cultivos. CAVALLIERI e colaboradores (2016) estudaram o comportamento de *S. clavuligerus* utilizando a simulação de parâmetros cinéticos e AEF. Constataram por meio dos parâmetros cinéticos simulados que a biossíntese de AC e CefC estavam intimamente associadas ao crescimento. Sendo assim, concluíram que a maximização do crescimento ou a produção de bioativos não são funções objetivo apropriadas para análise de fluxos em *S. clavuligerus*. Com base neste estudo e nos resultados obtidos na simulação dos parâmetros cinéticos do presente trabalho, que também mostraram que a produção dos biocompostos nas condições de cultivo investigadas, está associada ao crescimento (item 5.3), selecionou-se a maximização da produção de ATP como função objetivo. Para isto foi estabelecido que todo o C que não fosse utilizado para formação de células seria oxidado em energia química livre.

Com valores de fluxos simulados, foi possível comparar o gasto de energia entre os cultivos. A condição "L+G pH 6,8" apresentou 1,23 e 1,83 mmol ATP/mmol C consumido. O maior valor foi observado no período de 20 a 30 horas, em que havia maior concentração de células e de biocompostos. Este período, portanto, a inter-relação extremamente complexa entre os processos de crescimento e de formação dos bioativos, os quais culminaram concentrações máximas, exigiu um maior gasto energético. Na condição "L+G pH 7,4" o valor de manutenção de energia foi da mesma ordem de grandeza que no intervalo de 20 a 30 horas em pH 6,8, cerca de 1,73 mmol ATP/mmol C consumido. No entanto neste cultivo a biomassa máxima alcançada e a concentração de biocompostos (AC, CefC e Hol) apresentaram valores cerca de 40% menores. A semelhança do valor energético exigido neste último cultivo pode ser atribuída à formação de Hol. Este composto,

como mencionado anteriormente, afeta severamente o crescimento microbiano em concentrações acima de 25 mg.L⁻¹, fazendo-se necessário uma demanda energética maior para a manutenção da viabilidade das células (LIRAS, 2014; BAPTISTA, 2015).

Em "Lisina pH 7,4", a energia de manutenção utilizada foi 30% maior que em "L+G pH 6,8" e "L+G pH 7,4", cerca de 2,67 mmol ATP/mmol C consumido. Este valor foi extremamente alto comparado a biomassa máxima alcançada (ca. 3.24 g.L⁻¹) no período simulado. Neste cultivo também houve a produção de Hol, no entanto em menor concentração que em "L+G pH 7,4" (ca. de 50% inferior). Apesar de Hol ter sido produzida em menor concentração, esta condição de cultura pode ser considerada estressante o suficiente para justificar a maior necessidade energética. Isto porque a fonte de N utilizada, lisina, não é facilmente assimilada por *S. clavuligerus*. Sendo assim, lisina não contribuiu efetivamente no desenvolvimento celular do micro-organismo exigindo uma maior demanda energética para manter viabilidade celular na presença de Hol.

Apesar dos intervalos selecionados para distribuição de fluxos pertencerem à fase exponencial de crescimento de *S. clavuligerus*, os mapas metabólicos exibiram valores de fluxos maiores no ciclo de Krebs em comparação com a via das pentoses fosfato, apesar de se tratar de uma fase de intenso crescimento. No entanto, este comportamento pode ser justificado, pois a metabolização dos esqueletos carbônicos de lisina e glutamato é realizada por meio deste ciclo, o que fundamenta os maiores valores dos fluxos. Além disso, acetil-CoA gerado pelo catabolismo de lisina, que por meio da conversão de isocitrato em α -cetoglutarato é capaz fornecer NADPH para suprir a biossíntese de células, permite a continuidade do crescimento microbiano.

Comparando os intervalos simulados dos três cultivos, as maiores concentrações de AC e CefC foram observadas nos mapas metabólicos em que as reações 4 e 14 apresentaram valor de fluxo cerca de 50% superior (Figuras 5.13 e 5.14). Estas reações são responsáveis pela produção de precursores da biossíntese destes metabólitos, sendo gliceraldeído-3 fosfato para AC e α -cetoglutarato para CefC.

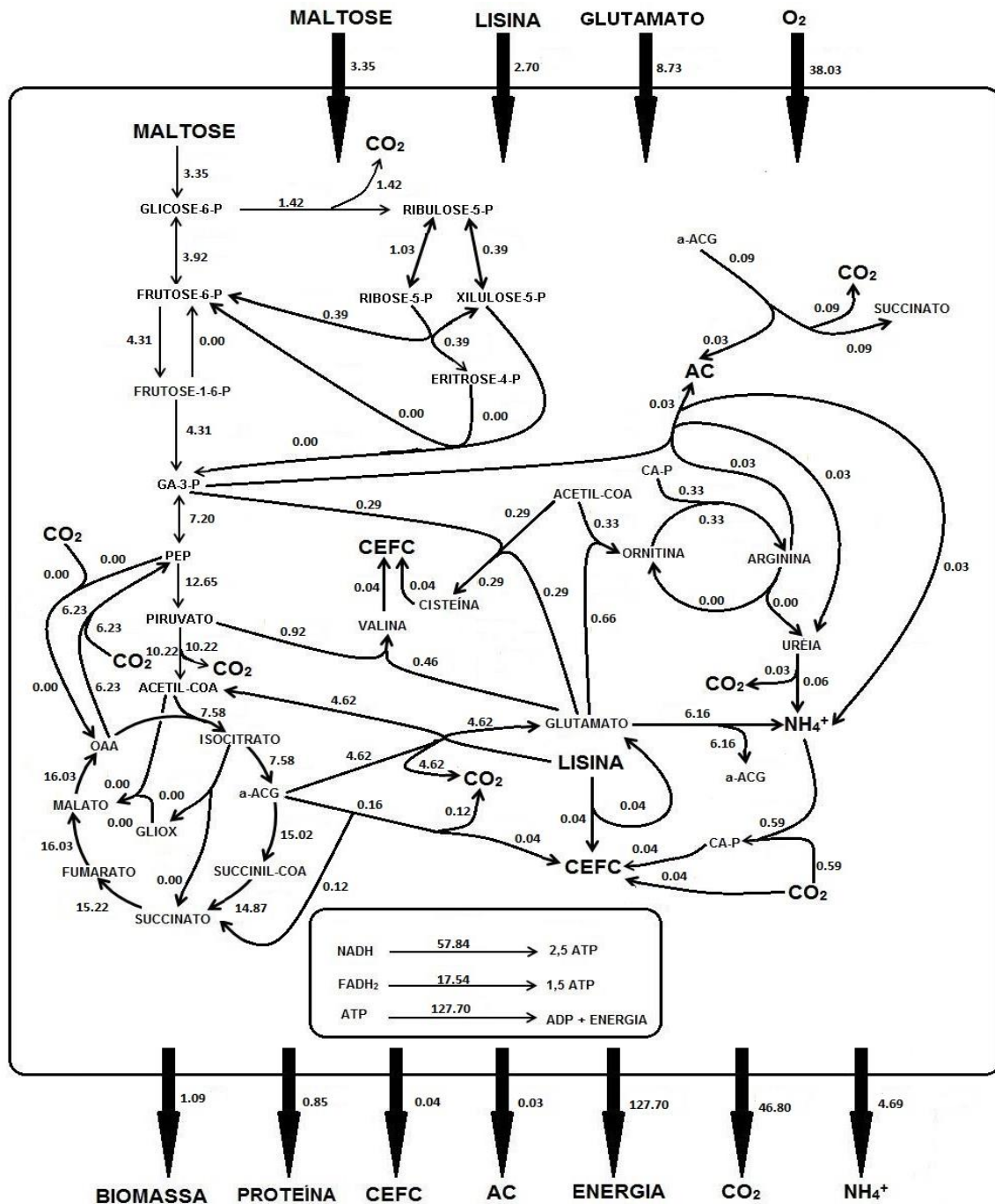
Avaliando os cultivos produtores de Hol, "L+G pH 7,4" (Figura 5.15) e "Lisina pH 7,4" (Figura 5.14), um aumento de 20% nos valores das vias das pentoses

fosfatos foi observado na condição adicionada de glutamato. Glutamato é um aminoácido que exerce um papel importante como fonte de C e energia, principalmente como fonte de energia de crescimento, conforme postulado na proposição do modelo cinético. O maior consumo de lisina em "Lisina pH 7,4" provavelmente colaborou com a maior produção de CefC por ser precursor da via biossintética deste bioativo.

O ciclo do glioxilato é essencial para micro-organismos que crescem em fontes cetogênicas, como a lisina. No entanto este ciclo mostrou-se ativo apenas em um dos mapas metabólicos simulados, cultivo "L+G pH 6,8" (Figura 5.13), no intervalo de 20 a 30 horas. Esta particularidade observada pode ter relação com a exaustão de lisina neste intervalo, enquanto que nas demais condições este aminoácido foi consumido lentamente. Vale salientar que o cultivo "L+G pH 6,8" aliou as melhores condições de crescimento e produção de bioativos.

As soluções obtidas em cada distribuição de fluxos (Soluções 1, 2, 3 e 4) apresentaram valores de CO₂ muito próximos aos reais, estes dados atestam a precisão das análises realizadas e a boa representação do metabolismo do micro-organismo pelo modelo.

Figura 5.12: Mapa de distribuição dos principais fluxos durante a fase exponencial do cultivo "L+G pH 6,8" de *S. clavuligerus* ATCC 27064 em biorreator (intervalo de 9 a 20 horas de cultivo).



Solução 1.

3,35 Maltoses + 2,70 Lisinae + 8,73 Glutamatoe + 38,03 O₂..> 0,85 Proteína + 127,70 Energia + 1,09 Biomassa + 0,04 CefC + 0,03 Aclav + 46,80 CO₂ + 4,69 NH₃e.

5.9 Balanços de material para o Nitrogênio (N)

Além do balanço de massa para C, também foi calculado o de N outro elemento importante para o desenvolvimento microbiano e para produção de metabólitos secundários. Neste caso, consideraram-se como valores de entrada do processo as fontes de nitrogênio lisina e glutamato, e como valores de saída os produtos obtidos durante a fermentação, a formação de biomassa, de proteínas extracelulares, de biocompostos (AC, CefC e Hol) e de amônio. As porcentagens de nitrogênio contidas na biomassa e nas proteínas secretadas foram estimadas com base na literatura (BUSHELL e FRYDAY, 1983; STEPHANOPOULOS et al, 1998; CAVALLIERI et al., 2016).

Os balanços foram realizados com o objetivo de comparar a porcentagem de N proveniente de NH_4^+ com os demais produtos formados durante o cultivo. As Tabelas 5.10, 5.11 e 5.12 apresentam os resultados do balanço material de N, para “L+G pH 6,8”, “Lisina pH 7,4” e “L+G pH 7,4” respectivamente.

Tabela 5.8: Balanço de massa de Nitrogênio do cultivo “L+G pH 6,8” de *S. clavuligerus* ATCC 27064 em biorreator.

Componentes	Δ	g.L ⁻¹	Somatória	mmol.L ⁻¹
Entrada				
Lisina	8,79	1,34		48,12
Glutamato	9,29	0,69	2,04	49,64
Saída				
Biomassa	3,41	0,36		3,41
Proteína	1,81	0,31		16,60
Holomicina	0,00	0,00		0,00
CefC	0,38	0,05		0,86
AC	0,12	0,01		0,60
NH_4^+	1,39	1,08	1,80	76,97
Total			3,84	
Saída/Entrada			0,88	
%N			88,25	

Tabela 5.9: Balanço de massa de Nitrogênio do cultivo "Lisina pH 7,4" de *S. clavuligerus* ATCC 27064 em biorreator.

Componentes	Δ	g.L ⁻¹	Somatória	mmol.L ⁻¹
Entrada				
Lisina	7,40	1,13		40,51
Glutamato	0	0,00	1,13	0,00
Saída				
Biomassa	1,90	0,20		1,90
Proteína	1,21	0,21		11,08
Holomicina	0,04	0,005		0,18
CefC	0,04	0,01		0,09
AC	0,03	0,002		0,15
NH ₄ ⁺	0,47	0,37	0,78	26,10
Total			1,92	
Saída/Entrada			0,69	
%N			69,14	

Tabela 5.10: Balanço de massa de Nitrogênio do cultivo "L+G pH 7,4" de *S. clavuligerus* ATCC 27064 em biorreator.

Componentes	Δ	g.L ⁻¹	Somatória	mmol.L ⁻¹
Entrada				
Lisina	3,80	0,58		20,80
Glutamato	9,86	0,74	1,32	52,69
Saída				
Biomassa	2,02	0,21		2,02
Proteína	1,44	0,25		13,21
Holomicina	0,07	0,009		0,32
CefC	0,09	0,012		0,21
AC	0,02	0,001		0,10
NH ₄ ⁺	1,02	0,79	1,27	56,53
Total			2,59	
Saída/Entrada			0,96	
%N			96,38	

As maiores porcentagens de N da saída do biorreator observadas nos cultivos foram oriundas de NH₄⁺. Um balanço de N semelhante a este também foi realizado por Souza (2017). No entanto, neste estudo a maior porcentagem de N observada foi proveniente da biomassa, cerca de 350 mg de N.L⁻¹. Esta diferença pode ser justificada pelo maior consumo de aminoácidos nos cultivos "L+G pH 6,8" e "L+G pH 7,4", cerca de 100 mmol.L⁻¹ de lisina e 75 mmol.L⁻¹ de glutamato em cada cultivo,

respectivamente. Em “Lisina pH 7,4”, o consumo da fonte de N foi semelhante ao apresentado por Souza (2017), cerca de 40 mmol.L⁻¹, e a porcentagem de N proveniente de NH₄⁺ também foi da mesma ordem de grandeza, porém houve a produção de Hol, que contribuiu para uma menor formação de biomassa.

Íons NH₄⁺ foram responsáveis por cerca de 60% da concentração de N em “L+G pH 6,8” e “L+G pH 7,4” e cerca de 50% em “Lisina pH 7,4”. Como mencionado anteriormente, altas concentrações de NH₄⁺ no caldo de cultivo são prejudiciais à biossíntese de compostos beta-lactâmicos. Os dados de concentração de biocompostos obtidos neste trabalho indicaram que o maior efeito negativo foi na produção de AC.

Os valores de rendimento dos balanços fecharam em 88,25%, 69,14% e 96,38% para “L+G pH 6,8”, “Lisina pH 7,4” e “L+G pH 7,4” respectivamente. As menores porcentagens obtidas nos balanços podem ser explicadas pela presença de produtos de degradação de células, de ureia, de compostos intermediários das biossínteses dos bioativos ou até mesmo outros bioativos, variáveis que não foram quantificadas pelas análises realizadas e podem ter impedido os balanços de fecharem em 100%

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-Acetylglycyl-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.; DEMAÏN, 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.; DEMAİN, 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.

8 APÊNDICE A- Reações bioquímicas do modelo metabólico de *S. clavuligerus*

Reações *Streptomyces clavuligerus*

TRANSIDROGENASE		
0	$\text{NADPH} + \text{NAD} = \text{NADP} + \text{NADH}$	R
VIA GLICOLÍTICA		
1	$\text{Maltose} + 2 \text{ATP} = 2 \text{Glicose-6-P} + 2 \text{ADP}$	I
2	$\text{Glicose-6-P} = \text{Frutose-6-P}$	R
3	$\text{Frutose-6-P} + \text{ATP} = \text{Frutose-1,6-P} + \text{ADP}$	I
4	$\text{Frutose-1,6-P} = 2 \text{Gliceraldeído-3P}$	R
5	$\text{Gliceraldeído-3-P} + \text{NAD} + \text{ADP} = \text{Fosfoenolpiruvato} + \text{NADH} + \text{ATP}$	R
6	$\text{Fosfoenolpiruvato} + \text{ADP} = \text{Piruvato} + \text{ATP}$	I
7	$\text{Piruvato} + \text{NAD} = \text{NADH} + \text{CO}_2 + \text{Acetil-CoA}$	I
VIA DAS PENTOSSES-FOSFATO		
8	$\text{Glicose-6-P} + 2 \text{NADP} = \text{Ribulose-5-P} + \text{CO}_2 + 2 \text{NADPH}$	I
9	$\text{Ribulose-5-P} = \text{Ribose-5-P}$	R
10	$\text{Ribulose-5-P} = \text{Xilulose-5-P}$	R
11	$\text{Ribose-5-P} + \text{Xilulose-5-P} = \text{Frutose-6-P} + \text{Eritrose-4-P}$	R
12	$\text{Eritrose-4-P} + \text{Xilulose-5-P} = \text{Frutose-6-P} + \text{Gliceraldeído-3-P}$	I
CICLO DE KREBS		
13	$\text{Acetil-CoA} + \text{Oxaloacetato} = \text{Isocitrato}$	I
14	$\text{Isocitrato} + \text{NADP} = \alpha\text{-cetoglutarato} + \text{NADPH} + \text{CO}_2$	I
15	$\alpha\text{-cetoglutarato} + \text{NAD} = \text{Succinil-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$	I
16	$\text{Succinil-CoA} + \text{GDP} = \text{Succinato} + \text{GTP}$	R
17	$\text{Succinato} + \text{FAD} = \text{Fumarato} + \text{FADH}_2$	R
18	$\text{Fumarato} = \text{Malato}$	R
19	$\text{Malato} + \text{NAD} = \text{Oxaloacetato} + \text{NADH}$	R
BIOSSÍNTESE DE AMINOÁCIDOS		
Glutamina		
20	$\text{Glutamato} + \text{NH}_3 + \text{ATP} = \text{Glutamina} + \text{ADP}$	I
Aspartato		
21	$\text{Oxaloacetato} + \text{Glutamato} = \text{Aspartato} + \alpha\text{-cetoglutarato}$	I
Asparagina		
22	$\text{Aspartato} + \text{Glutamina} + \text{ATP} = \text{Asparagina} + \text{Glutamato} + \text{ADP}$	I
Serina		
23	$\text{Gliceraldeído-3-P} + \text{Glutamato} + \text{NAD} = \text{Serina} + \alpha\text{-cetoglutarato} + \text{NADH}$	I
Arginina		
24	$2 \text{Glutamato} + \text{Acetil-CoA} + \text{ATP} + \text{NADPH} = \text{Ornitina} + \text{ADP} + \text{NADP} + \text{Acetato} + \alpha\text{-cetoglutarato}$	I
25	$2 \text{ATP} + \text{CO}_2 + \text{Glutamina} = \text{Carbamoil-P} + 2 \text{ADP} + \text{Glutamato}$	I

26 Ornitina + Carbamoil-P + Aspartato + ATP = Arginina + Fumarato + AMP I

Lisina

27 Aspartato + ATP + NADPH = Aspartato-4-semialdeído + ADP + NADP I

28 Aspartato-4-semialdeído + Glutamato + Piruvato + Succinil-CoA + NADPH = Lisina + α-cetoglutarato + Succinato + NADP + CO₂ I

Treonina e Metionina

29 Aspartato-4-semialdeído + NADPH = Homoserina + 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 = 5-Fosforribosil-1-pirofosfato + AMP I

45 Fosforribosilpirofosfato + 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	I
50	N-10-Formiltetraidrofolato + NADP = Tetraidrofolato + NADPH + CO ₂	I

BIOSSÍNTESI DE BASE NITROGENADAS

Adenina, Guanina, Desoxiadenina e Desoxiguanina

51	Fosforribosilpirofosfato + 2 Glutamina + Aspartato + CO ₂ + Glicina + 5 ATP + N-10-Formiltetraidrofolato = AICAR + Tetraidrofolato + Fumarato + 2 Glutamato + 5 ADP	I
52	AICAR + N-10-Formiltetraidrofolato = 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 + CO ₂ + 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

BIOSSÍNTESI DE CARBOIDRATOS

63	Glicose-6-P + ATP = CARBOIDRATO + ADP	I
----	---------------------------------------	---

Nota: CARBOIDRATO equivale a 162 gramas

BIOSSÍNTESI DE LÍPIDIOS

64	8 Acetil-CoA + 7 ATP + 14 NADPH = LÍPIDIO + 7 ADP + 14 NADP	I
----	---	---

Nota: LÍPIDIO (PALMITATO) equivale a 256 gramas

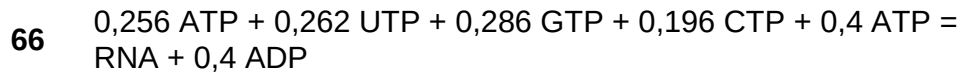
BIOSSÍNTESI DE PROTEÍNAS

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	I
----	---	---

ADP

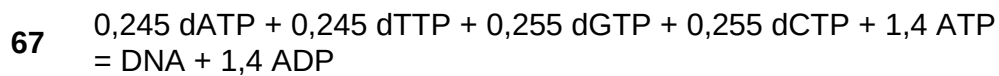
Nota: PROTEÍNA equivale a 108,9 gramas

BIOSSÍNTESE DE RNA



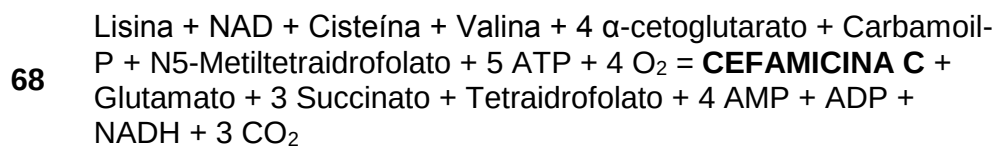
Nota: RNA equivale a 323 gramas

BIOSÍNTESE DE DNA

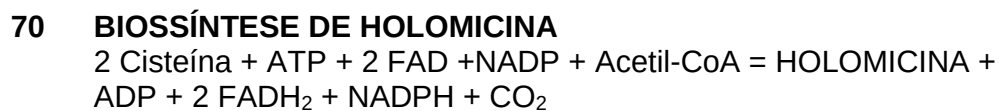
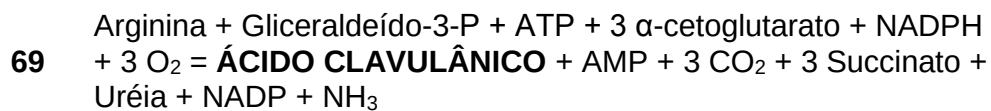


Nota: DNA equivale a 310 gramas

BIOSSÍNTESE DE CEFAMICINA C

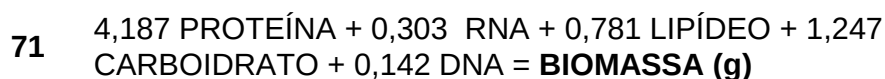


BIOSSÍNTESE DE ÁCIDO CLAVULÂNICO



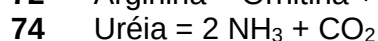
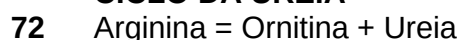
BIOMASSA

Considerando: 45,6% Proteína
9,8 % RNA
20 % Lipídeos
20,2 % Carboidratos
4,4% DNA



Nota: BIOMASSA equivale a 100 grama de células

CICLO DA URÉIA



CATABOLISMO DO GLUTAMATO		
75	Glutamato + NADP = α -cetoglutarato + NADPH + NH ₃	I
CATABOLISMO DA LISINA		
76	Lisina + 2 α -cetoglutarato + 3 NAD + FAD + ATP = 2 Glutamato + 2 Acetil-CoA + 2 CO ₂ + FADH ₂ + 3 NADH + ADP	I
CATABOLISMO DO ACETATO		
77	Acetato + ATP = Acetil-CoA + AMP	I
REAÇÃO GOGAT		
78	Glutamina + α -cetoglutarato + NADPH = 2 Glutamato + NADP	I
Transporte Lisina		
79	Lisinae + ATP = Lisina + ADP	I
Transporte de Amonia		
80	NH ₃ = NH ₃ e	R
Transporte de maltose		
81	Maltosee + ATP = Maltose + ADP	I
Transporte de glutamato		
82	Glutamatoe + ATP = Glutamato + ADP	I
REAÇÕES PARA CONVERSÃO DE COENZIMAS REDUZIDAS EM ATP		
83	NADH + 2,5 ADP + 0,5 O ₂ = NAD + 2,5 ATP	I
84	FADH ₂ + 1,5 ADP + 0,5 O ₂ = FAD + 1,5 ATP	I
GLICONEOGÊNESE		
85	Frutose-1,6-P = Frutose-6P	I
PEP CARBOXICINASE		
86	Oxaloacetato + GTP = Fosfoenolpiruvato + CO ₂ + GDP	I
ANAPLERÓTICA		
87	Fosfoenolpiruvato + CO ₂ = Oxaloacetato	I
CICLO DO GLIOXILATO		
88	Isocitrato = Glioxilato + Succinato	I
89	Glioxilato + Acetil-Coa = Malato	I