

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 17/02/2019.

**MILENA ALVES DE SOUZA**

**“Investigação sobre associações entre fonte de nitrogênio e produção de compostos bioativos por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos submersos”**

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

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

ARARAQUARA  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

S719i Souza, Milena Alves de  
Investigação sobre associações entre fonte de nitrogênio e produção de compostos bioativos por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos submersos / Milena Alves de Souza.  
– Araraquara : [s.n.], 2017  
86 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Maria Lucia Gonsales da Costa Araújo

1. Biotecnologia. 2. Microbiologia industrial.  
3. Fermentação. 4. Compostos bioativos. 5. Antibióticos.  
I. Título.

MILENA ALVES DE SOUZA

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

Araraquara, 17 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Maria Lúcia Gonsales da Costa Araújo (Orientadora)  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Profª Drª Kelly Johana Dussán Medina  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Profª Drª. Rosineide Gomes da Silva Cruz  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia / UFSCar / São Carlos - SP

## DADOS CURRICULARES

**Nome:** Milena Alves de Souza

**Nome em citações bibliográficas:** SOUZA, M. A.

**Nacionalidade:** Brasileira

**Sexo:** Feminino

**Nascimento:** 29/10/1994 – Taquaritinga – SP

**Endereço profissional:** Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Instituto de Química, Dpto. De Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Francisto Degni n° 55

Quitandinha – Araraquara

14800-900, SP – Brasil

**Endereço eletrônico:** milena.asouza@hotmail.com

### Formação acadêmica/titulação

**2014 – atual** Mestrado em Biotecnologia

Instituto de Química – UNESP

Título: Investigação sobre associações entre fonte de nitrogênio e produção de compostos bioativos por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos submersos.

Orientadora: Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo

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

**2011 – 2013** Graduação em Biocombustíveis.

Instituto Federal de São Paulo, IFSP, Brasil.

Título: Transformação química de extratos de *Jatropha curcas* (Pinhão manso).

Orientador: Gisele Baraldi Messiano

### Formação complementar

**2014 – 2014** Escola de Adsorção (Carga horária: 6 horas) - 10º Encontro Brasileiro de Adsorção. Guarujá, SP.

**2014 – 2014** Curso de Extensão: Aplicação do método Sol-Gel para a síntese de adsorventes com efeito “ footprint molecular”, visando à diminuição de impactos ambientais associados à produção de biodiesel.” (Duração: 28 horas), Instituto Federal de Educação

Ciência e Tecnologia de São Paulo, IFSP- Campus Matão. Matão, SP.

**2013 – 2013** Minicurso: Briquetes de bagaço de cana: Uma alternativa tecnológica com maior rendimento energético. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo, IFSP- Campus Matão. Matão, SP.

**2013 – 2013** Minicurso: Reaproveitamento de óleo. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de São Paulo, IFSP- Campus Matão. Matão, SP.

### **Atuação profissional**

**1. Universidade Estadual Paulista – Instituto de Química – UNESP Araraquara, SP.**

**2014 – Atual** Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Mestranda em Biotecnologia. Regime: Dedicção exclusiva.

**2. Instituto Federal de São Paulo - Campus Matão, IFSP - Matão, Brasil.**

**2014 – 2014** Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Aluna bolsista do Curso de extensão. Regime: Dedicção exclusiva.

**2013 – 2014** Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Aluna de iniciação científica. Regime: Dedicção exclusiva.

### **Áreas de atuação**

1. Ciências Biológicas / Microbiologia / Microbiologia Industrial e de Fermentação.
2. Ciências Biológicas / Bioquímica / Bioquímica dos Microrganismos.
3. Ciências Biológicas / Microbiologia / Microalgas.
4. Ciências Exatas e da Terra / Química / Biocombustíveis.

### **Participação em eventos**

- 5° CINTEC (Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP). Apresentação do Trabalho intitulado: Transformação química de extratos de *Jathopa curcas* e avaliação da atividade inseticida.

VI Congresso Farmacêutico da UNESP e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Apresentação do trabalho intitulado: Investigação do teor de amônio de cultivos submersos de *Streptomyces clavuligerus* utilizando dois diferentes métodos analíticos.

Dedico este trabalho a Deus que sempre guia, abençoa e ilumina o meu caminho, aos meus amigos, que são poucos, mas sem dúvida os melhores, e em especial aos meus pais Adalberto e Emília, meus irmãos Rodolfo e Amanda e meu noivo Flavio Myiaji.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por me conceder o dom da vida e me presentear com discernimento e sabedoria ao longo de toda minha trajetória. Por me proteger, iluminar, abençoar e dar forças em todos os momentos, principalmente naqueles mais árduos.

Agradeço aos meus pais Adalberto Antônio Alves de Souza e Emilia Mariano de Souza, por todo suporte, apoio, e carinho. Aos meus irmãos Rodolfo Alves de Souza e Amanda Caroline Alves de Souza, por me ensinarem “na marra” a ter paciência, e por todos os abraços e encorajamento.

Ao meu noivo Flávio Yoshizo Myiaji por todo apoio, por aturar todas as minhas crises de ansiedade (que não foram poucas), enxugar todas as minhas lágrimas e sempre me aconchegar nos seus braços me tranquilizando e encorajando a nunca desistir.

Agradeço a minha orientadora Maria Lucia Gonsales da Costa Araújo por ter confiado a mim o seu projeto e por acreditar na minha capacidade mesmo quando até eu duvidava. A minha companheira de laboratório Amanda Salvador Baptista, pelas risadas, ensinamentos e paciência com as minhas loucuras.

Agradeço a minha amiga Bruna Zavati Zavitóski, por sempre confiar em mim. Por me fazer superar meus medos (fobias) me colocando dentro de elevadores e no avião. Por me mandar engolir o choro e crescer e por me ensinar a ser mais firme. Obrigada por estar sempre presente e me dar os melhores conselhos.

Obrigada as minhas amigas Cristiane Moura Oliveira, Gabriela Santana, Gabrielle Calera, Taiane Silva, Larissa Cardoso, Guilherme Leite, por tornar essa caminhada mais sutil e agradável. Por dividir os problemas, as soluções, as lágrimas e sorrisos.

Agradeço aos técnicos, Ricardo e Gabriel, que sempre socorreram quando as coisas insistiam em dar errado no laboratório, me ajudando a solucionar os problemas.

Agradeço a toda equipe, trabalhadores diretos e indiretos da Unesp.

Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro.

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*  
*(Theodore Roosevelt).*

## RESUMO

*Streptomyces clavuligerus* produz vários compostos bioativos importantes, como os beta-lactâmicos ácido clavulânico (AC), um inibidor de beta-lactamases utilizado em combinação com antibióticos beta-lactâmicos, e mais vinte clavamas (várias com atividade antifúngica), o antibiótico cefamicina (CefC), utilizado comercialmente para a produção de antibióticos semi-sintéticos, além de bioativos não beta-lactâmicos como tunicamicina e holomicina. Estudos têm mostrado que tanto a natureza como a concentração de fontes de nitrogênio influenciam a produção de bioativos em *S. clavuligerus*, pois muitos precursores destes biocompostos derivam de intermediários nitrogenados do metabolismo primário. Um aminoácido importante para o cultivo de *S. clavuligerus* é a lisina, que atua no metabolismo primário via cadaverina aminotransferase, e no metabolismo secundário via 1-piperideína-6-carboxilato, para a produção do raro aminoácido ácido alfa-aminoadípico, um precursor de CefC e de todos os demais antibióticos beta-lactâmicos. Outra fonte de nitrogênio de destaque é o glutamato de sódio, que apresenta efeitos positivos na produção de AC por fornecer átomos de carbono para a molécula deste biocomposto. Estudos têm relatado a produção de bioativos utilizando lisina ou glutamato de sódio nos meios de cultivo, mas não há relatos na literatura sobre a influência conjunta destes aminoácidos. Este trabalho trata da investigação de relações entre, a utilização conjunta de lisina e glutamato de sódio e a produção dos compostos beta-lactâmicos AC e CefC por *S. clavurigerus* em cultivos submersos empregando-se meios quimicamente definidos. Inicialmente foram realizadas fermentações em batelada em mesa incubadora rotativa (28°C, 260 rpm e um pH inicial de 6,5). O conjunto de resultados em frascos agitados utilizando-se uma ampla faixa de combinações de concentração dos aminoácidos mostraram que não é possível otimizar concomitantemente a produção de AC e CefC. Porém, a combinação de 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato resultou em produções finais relevantes dos bioativos, 146,6 mg/L de AC e 140,51 mg/L de CefC. Nesta condição, foram obtidos biomassa de 8,44 g/L, pH final igual a 6,8 e concentração de amônio de 487 mg/L. Esta combinação foi, então, utilizada para validação em biorreator de bancada, com controles de pH em 6,5, 1 vvm de vazão de ar, (fluxometro de massa) e de oxigênio dissolvido em 50% da saturação por meio de variação automática da agitação. Nestas condições obtiveram-se concentrações finais de 248,28 mg/L de AC, 125,54 mg/L de CefC, com biomassa máxima e concentração final de amônio de 4,96 g/L e 457 mg/L, respectivamente. Desta forma, as produções específicas dos bioativos ao final do processo em biorreator foram 200% maior de AC e 40% de CefC, quando comparadas com os resultados obtidos em frascos agitados. Foi observado também que a molécula de AC é muito mais instável a pHs alcalinos e a maiores concentrações de amônio do que a molécula de CefC. O aumento do pH mostrou-se diretamente associado ao consumo de glutamato enquanto o acúmulo de amônio manteve uma relação direta com o consumo das fontes de nitrogênio.

**Palavras-chave:** *Streptomyces clavuligerus*. Lisina. Glutamato de sódio. Ácido clavulânico. Cefamicina C.

## ABSTRACT

*Streptomyces clavuligerus* produces several important bioactive compounds, such as beta-lactams, clavulanic acid (AC), a beta-lactamase inhibitor which is used in combination with beta-lactam antibiotics, and twenty more clavams with antifungal activity, the antibiotic cephamycin (CefC), of great commercial interest for the production of semisynthetic antibiotic, and the non-lactamic bioactives tunicamycin and holomicyn. Studies have shown that both the nature and the concentration of nitrogen sources influence the production of bioactive metabolites in *S. clavuligerus*, because many precursors of these biocompounds derive from nitrogenous intermediates of the primary metabolism. Lysine is an important amino acid in *S. clavuligerus*, acting on the primary metabolism via cadaverine aminotransferase, and on the secondary metabolism via 1-piperidine-6-carboxylate, for the production of the rare amino acid alpha-amino adipic acid, a precursor of CefC as also of all other beta-lactam antibiotics. Another important source of nitrogen is sodium glutamate, which in *S. clavuligerus* culture media has positive effects on the production of AC. Studies have reported the production of bioactive compounds employing lysine or sodium glutamate in culture media, but there aren't reports in the literature on the joint influence of these amino acids. In this sense, this project proposes to investigate relations between combinations of lysine and sodium glutamate and the production of beta-lactam compounds AC and CefC by *S. clavuligerus* in submerged cultures employing chemically defined media. Initially, batch fermentations were carried out in a rotating incubator at 28°C and 260 rpm, in order to select the best combination of lysine and glutamate concentrations to obtain higher final bioactive compounds yields. This combination was then validated in bioreactor. The set of results in shaken flasks in a wide range of amino acid concentration combinations showed that isn't possible to concomitantly optimize the production of AC and CefC. However the combination of 47,3 mmol/L lysine and 18 mmol/L sodium glutamate resulted in relevant final productions of the biocompounds, 146,6 mg/L of AC and 141,51 mg/L of CefC. In this condition, biomass of 8,44 g/L, final pH of 6,8 and ammonium concentration of 487 mg/L were obtained. This combination of lysine and sodium glutamate was then reproduced in benchtop bioreactor, with pH controlled at 6,5. The final concentration of 248,28 mg/L of AC and 125,54 mg/L of CefC with maximum biomass and final concentration of ca. 5,0 g/L and 457 mg/L, respectively, were obtained. That is, the specific productions of the bioactives at the end of the process in bioreactor were 200% higher for AC and 40% for CefC, when compared with the results obtained in shaken flasks. It has also been observed that the AC molecule is much more unstable at alkaline pH values and at higher ammonium concentrations than the CefC molecule. The increase in pH was directly associated with the consumption of glutamate, while the accumulation of ammonium has a straight relation with the consumption of nitrogen sources.

**Keywords:** *Streptomyces clavuligerus*. Lysine. Sodium glutamate. Acid clavulanic. Cephamycin C.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b>	Estrutura molecular de ácido clavulânico.	<b>25</b>
<b>Figura 3.2</b>	Rota biossintética do ácido clavulânico e outros clavamas.	<b>26</b>
<b>Figura 3.3</b>	Estrutura molecular da cefamicina C.	<b>27</b>
<b>Figura 3.4</b>	Rota biossintética da CefC.	<b>29</b>
<b>Figura 3.5</b>	Agrupamento de genes que codificam enzimas de síntese de CefC <b>(a)</b> e de ácido clavulânico <b>(b)</b> .	<b>30</b>
<b>Figura 4.1</b>	Esporos de <i>S. clavuligerus</i> obtido em meio sólido proposto por Sánchez e Braña (1996) <b>(a)</b> suspensão de esporos preparada em solução crioprotetora de glicerol a 20% v/v e distribuídos em criotubos <b>(b)</b> .	<b>34</b>
<b>Figura 4.2</b>	Esquema das etapas de cultivo de <i>S. clavuligerus</i> .	<b>37</b>
<b>Figura 4.3</b>	Sobrenadante distribuído em eppendorfs para posterior análise <b>(a)</b> e biomassa <b>(b)</b> .	<b>42</b>
<b>Figura 4.4</b>	Halos de inibição medidos para determinação da concentração de CefC..	<b>43</b>
<b>Figura 5.1</b>	Experimento C1- Perfis de concentração celular de cultivos em batelada em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio em mmol/L: M-I (50), M-II (60), M-III (70); M-IV (80), M-V (90) e M-VI (100).	<b>46</b>
<b>Figura 5.2</b>	Experimento C1- Perfis de concentração de lisina (a), maltose (b) e glutamato de sódio (c) de cultivos em batelada em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio (em mmol/L): M-I (50), M-II (60), M-III (70), M-IV (80), M-I (90) e M-VI (100).	<b>47</b>
<b>Figura 5.3</b>	Experimento C1- Perfis de concentração de AC (a) e de CefC (b) de cultivos em batelada em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio (em mmol/L): M-I (50), M-II (60), M-III (70), M-IV (80), M-V (90) e M-VI (100).	<b>48</b>
<b>Figura 5.4</b>	Experimento C1- Perfis de concentração de amônio (medidas pelo método do fenato e por ISE) de cultivos em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio (em mmol/L): M-I (50) (a), M-II (60) (b), M-III (70) (c), M-IV (80) (d), M-V (90) (e), M-VI (100) (f).	<b>49</b>
<b>Figura 5.5</b>	Experimento C1 – Perfis de concentração de glutamato e de valores de pH de cultivos em frascos agitados em meios contendo 50 mmol/L de lisina e glutamato de sódio (em mmol/L): M-I (50), M-II (60), M-III (70), M-IV (80), M-V (90) e M-VI (100).	<b>50</b>
<b>Figura 5.6</b>	Experimento P1 - Produção de AC em 72 horas: superfície de resposta (modelo quadrático ajustado a 95% de grau de confiança; coeficiente de determinação $R^2 = 0,98427$ ) <b>(a)</b> , Diagrama de Pareto <b>(b)</b> e gráfico de valores observados <i>versus</i> valores previstos pelo modelo <b>(c)</b>	<b>53</b>

- Figura 5.7** Experimento P1 - Produção de CefC em 72 horas: superfície de resposta (modelo quadrático ajustado a 95% de grau de confiança; coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9064$ ) **(a)**, Diagrama de Pareto **(b)** e gráfico de valores observados *versus* valores previstos pelo modelo **(c)**. **54**
- Figura 5.8** Experimento P1- Gráfico de perfis para valor ótimo de CefC. **56**
- Figura 5.9** Experimento P1 (*design* experimental DCCR) – Perfis de concentração celular de cultivos em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato): C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30). **57**
- Figura 5.10** Experimento P1- (*design* experimental DCCR) – Perfis dos valores de pH **(a)**; Perfis de concentração de amônio **(b)** de cultivos em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato): C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30). **58**
- Figura 5.11** Experimento P1 (*desing* experimental DCCR) – Relação, no período de 72 horas de cultivo, entre valores máximos de amônio e consumo de lisina **(a)** e glutamato de sódio **(b)**; e relação entre valores máximos de pH e consumo de lisina **(c)** e glutamato de sódio **(d)**, em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato): C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30). **59**
- Figura 5.12** Experimento P1 (*design* experimental DCCR) – Perfil de concentração de amônio e de concentrações de AC e de CefC obtidas em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato) C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30). **60**
- Figura 5.13** Experimento P1 (*design* experimental DCCR) – Relação, no período de 72 horas de cultivo, entre AC e pH **(a)**; AC e amônio **(b)**; CefC e pH **(c)** e CefC e amônio **(d)**, em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L de lisina; mmol/L de glutamato) C-I (50; 50), C-II (50; 10), C-III (100; 10), C-IV (100; 50), C-V (39,6; 30), C-VI (75; 1,7), C-VII (110,4; 30), C-VIII (75; 58,3), C-IX (75; 30). **62**
- Figura 5.14** Experimento P2- Produção de AC em 72 horas: superfície de resposta (modelo quadrático ajustado a 95 % de grau de confiança; coeficiente de determinação  $R^2= 0,70061$ ) **(a)**, Diagrama de Pareto **(b)** e gráfico de valores observados *versus* valores previstos pelo modelo **(c)**. **65**
- Figura 5.15** Experimento P2- Produção de CefC em 72 horas: superfície de resposta (modelo quadrático ajustado a 95 % de grau de confiança; coeficiente de determinação  $R^2= 0,70061$ ) **(a)**, Diagrama de Pareto **(b)** e gráfico de valores observados *versus* valores previstos pelo modelo **(c)**. **66**

- Figura 5.16** Experimento P2 (desing experimental DCCR) – Perfis de concentração celular de cultivos em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L): C-I (19,6: 6), C-II (19,6 : 30), C-III (39,6 : 6), C-IV (39,6 : 30), C-V (29,6 : 18), C-VI (15,5 : 18), C-VII (43,7 : 18), C-VIII (29,6 : 1), C-IX (29,6 : 35). **70**
- Figura 5.17** Experimento P2 (desing experimental DCCR) – Perfis dos valores de pH **(a)** e concentrações finais de amônio **(b)** de cultivos em frascos agitados em meios contendo lisina e glutamato (em mmol/L): C-I (19,6 : 6), C-II (19,6 : 30), C-III (39,6 : 6), C-IV (39,6 : 30), C-V (29,6 : 18), C-VI (15,5 : 18), C-VII (43,7 : 18), C-VIII ( 29,6 : 1), C-IX (29,6 : 35). **71**
- Figura 5.18** Perfis de consumo de glutamato de sódio **(a)**, lisina **(b)** e maltose **(c)**. **72**
- Figura 5.19** Experimento B1- Perfil de crescimento celular de cultivo realizado em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio. **74**
- Figura 5.20** Experimento B1- Comparação entre biomassas obtidas em cultivo realizado em frascos agitados (C-VII (P2)) e em biorreator de bancada (B1), utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio. **75**
- Figura 5.21** Experimento B1- Perfis de produções de AC **(a)** e CefC **(b)** de cultivo realizado em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio. **75**
- Figura 5.22** Experimento B1- Comparação ente as produções específicas de AC **(a)** e CefC **(b)** de cultivo realizado em frascos agitados e em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio. **76**
- Figura 5.23** Experimento B1 – Comparação entre as concentrações de amônio de cultivo realizado em biorreator de bancada **(a)** e em frascos agitados **(b)** utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio **77**
- Figura 5.24** Experimento B1- Perfil de secreção de proteínas de cultivo realizado em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio **78**
- Figura 5.25** Experimento B1- Esquematisação do balanço de massa de nitrogênio proveniente do período final (74 horas) do cultivo realizado em biorreator de bancada utilizando 43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio. **79**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b>	Subgrupos pertencentes aos compostos beta-lactâmicos e exemplos de microrganismo produtor.	<b>23</b>
<b>Tabela 4.1</b>	Composição do meio sólido proposto por Sánchez e Braña (1996) para obtenção de esporos de <i>S. clavuligerus</i> .	<b>35</b>
<b>Tabela 4.2</b>	Composição do meio de reativação para germinação dos esporos de <i>S. clavuligerus</i> .	<b>35</b>
<b>Tabela 4.3</b>	Composição do meio de propagação de micélios de <i>S. clavuligerus</i> .	<b>35</b>
<b>Tabela 4.4</b>	Composição do meio ágar nutriente para cultivo de <i>E. coli</i> (bactéria-teste).	<b>36</b>
<b>Tabela 4.5</b>	Composição do meio de germinação.	<b>37</b>
<b>Tabela 4.6</b>	Composição do meio de preparo de inóculo principal.	<b>38</b>
<b>Tabela 4.7</b>	Composição do meio base de produção	<b>38</b>
<b>Tabela 4.8</b>	Experimento C1 – Concentração de glutamato de sódio dos meios de cultivo em batelada de <i>S. clavuligerus</i> em frascos agitados, com concentração constante de lisina igual a 50 mmol/L.	<b>39</b>
<b>Tabela 4.9</b>	Experimento P1 - planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - Concentrações de lisina e glutamato de sódio dos meios de cultivo em batelada de <i>S. clavuligerus</i> em frascos agitados.	<b>40</b>
<b>Tabela 4.10</b>	Experimento P2 – planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) – Concentrações de lisina e glutamato de sódio dos meios de cultivo em batelada de <i>S. clavuligerus</i> em frascos agitados.	<b>40</b>
<b>Tabela 5.1</b>	Experimento P1 - planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - Concentrações de lisina e glutamato de sódio (variáveis independentes) e concentrações de AC e CefC (variáveis resposta) produzidas em 72 horas de cultivo em batelada de <i>S. clavuligerus</i> em frascos agitados	<b>51</b>
<b>Tabela 5.2</b>	Experimento P1 - Análises de variância (ANOVA) a 95% de nível de confiança, para regressão dos modelos quadráticos* das produções (em 72 horas) de AC <b>(a)</b> e CefC <b>(b)</b> .	<b>52</b>
<b>Tabela 5.3</b>	Experimento P1- Triplicata da condição C-V (39,6 mmol/L de Lisina e 30 mmol/L de glutamato de sódio) do planejamento experimental do tipo Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), realizada a fim de validar modelo experimental.	<b>56</b>

<b>Tabela 5.4</b>	Experimento P2 - planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) - Concentrações de lisina e glutamato de sódio (variáveis independentes) e concentrações de AC e CefC (variáveis resposta) produzidas em 72 horas de cultivo em batelada de <i>S. clavuligerus</i> em frascos agitados	<b>64</b>
<b>Tabela 5.5</b>	Experimento P2 - Análises de variância (ANOVA) a 95% de nível de confiança, para regressão dos modelos quadráticos* das produções (em 72 horas) de AC <b>(a)</b> e CefC <b>(b)</b> .	<b>67</b>
<b>Tabela 5.6</b>	Comparação entre os planejamentos experimentais Experimento P1 e Experimento P2	<b>73</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 Objetivos Específicos .....	21
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>22</b>
3.1. Antibióticos beta-lactâmicos .....	22
<b>3.1.1. A descoberta e desenvolvimento de compostos beta-lactâmicos para uso clínico.</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1.2. Compostos beta-lactâmicos</b> .....	<b>23</b>
3.1.2.1 Ácido Clavulânico .....	24
3.1.2.1.1 Biossíntese do AC .....	26
3.1.2.2. Cefamicina C .....	27
3.1.2.2.1 Biossíntese da CefC .....	28
3.2. <i>Streptomyces clavuligerus</i> e a produção de metabólitos secundários. ....	30
3.3. Influência das fontes de Nitrogênio na produção de metabólitos secundários	31
3.4. Íons amônio e sua interferência na produção de metabólitos secundários. ....	32
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
4.1. Microrganismos e forma de estocagem .....	34
4.2. Condições gerais do processo fermentativo .....	36
4.3. Métodos Analíticos .....	41
<b>4.3.1. Coleta e tratamento de amostras</b> .....	<b>41</b>
<b>4.3.2. Concentração Celular</b> .....	<b>41</b>
<b>4.3.3. Concentração de CefC</b> .....	<b>42</b>
4.3.3.1 Preparo das placas de bioensaio .....	42
4.3.3.2. Preparo das amostras .....	43
4.3.3.3. Aplicação das amostras, incubação e leitura dos halos. ....	43
<b>4.3.4. Concentração de ácido clavulânico</b> .....	<b>43</b>
<b>4.3.5. Análise de Aminoácidos</b> .....	<b>44</b>
<b>4.3.6. Métodos de análise de determinação de Amônio</b> .....	<b>44</b>
4.3.6.1. Método do fenato .....	44
4.3.6.2. Eletrodo de íon seletivo (ISE) .....	45
<b>4.3.7. Análise de proteínas extracelulares</b> .....	<b>45</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>46</b>
5.1. Cultivos em frascos agitados .....	46

<b>5.1.1. Experimento C1 .....</b>	<b>46</b>
<b>5.1.2. Planejamento Experimental 2<sup>2</sup> com quatro pontos axiais e replicatas no ponto central: lisina e glutamato de sódio .....</b>	<b>50</b>
5.1.2.1. Experimento P1.....	50
5.1.2.2. Experimento P2.....	63
<b>5.2. Cultivo em batelada realizado em biorreator .....</b>	<b>73</b>
<b>5.2.1. Experimento B1 .....</b>	<b>73</b>
<b>5.2.2. Balanço de massa do Nitrogênio .....</b>	<b>77</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Em uma definição clássica os antibióticos são compostos produzidos no metabolismo secundário de microrganismos que inibem o crescimento de outros microrganismos. Os antibióticos podem ser agrupados de acordo com sua estrutura química ou mecanismo de ação. Uma importante classe de antibióticos é constituída por compostos beta-lactâmicos. Um exemplo desta classe é cefamicina C (CefC). Estes bioativos são caracterizados pela presença de um anel beta-lactâmico em sua estrutura molecular (KUMMERER, 2009).

Apesar dos antibióticos beta-lactâmicos serem efetivos no tratamento de muitos microrganismos patogênicos, algumas bactérias desenvolveram uma resistência a estes antibióticos, devido sua capacidade em produzir beta-lactamase, enzimas que clivam o anel beta-lactâmico. Para superar esta resistência, os antibióticos beta-lactâmicos são frequentemente ministrados com inibidores de beta-lactamases, como o ácido clavulânico (AC) (KURYLOWICZ, 1981).

Streptomicetos são bactérias gram-positivas do grupo dos actinomicetos que apresentam a habilidade única de produzir metabólitos secundários complexos, em grande número e variedade, muitos deles com importantes propriedades bioativas (antibióticos, antifúngicos, antitumorais). Somente a partir da década de 1970 foi sendo descoberta a capacidade deste gênero de bactérias em produzir um grande número de compostos bioativos, maior que aqueles produzidos por fungos filamentosos, os quais eram considerados, até então, os maiores produtores de biocompostos (CHALLIS; HOPWOOD, 2003).

Com a descoberta da estreptomicina, primeira droga efetiva no tratamento da tuberculose, em 1943, os actinomicetos ganharam ainda mais destaque como produtores de antibióticos e outros metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas, sendo o gênero *Streptomyces* responsáveis por 70-80% desta produção (SHARMA et al., 2014).

A espécie *Streptomyces clavuligerus* produz vários compostos bioativos de interesse, como, por exemplo, os antibióticos não-beta-lactâmicos Tunicamicina (Tun) que consiste em uma mistura de dez ou mais homólogos de nucleosídeos que interferem na formação de glicoproteínas em bactérias e eucariotos, a holomicina (Hol), um antibiótico da classe das pirrotrinas bem conhecido por inibir a síntese de RNA polimerase de bactérias resistentes à rifamicina (BASSIK; KAMPMANN, 2011;

ROBLES-REGLERO et al., 2013), além de compostos beta-lactâmicos com destaque para o antibiótico cefamicina C (CefC) e o ácido clavulânico (AC), um potente inibidor de enzimas beta-lactamases.

A cefamicina C pertence a importante classe dos antibióticos beta-lactâmicos. Sua estrutura molecular é semelhante a das cefalosporinas, diferenciando-se pela substituição do hidrogênio por um grupo metoxila na posição 7- $\alpha$  do anel bicíclico. Este grupo atua como estabilizador da estrutura do anel beta-lactâmico conferindo uma maior resistência destes antibióticos a enzimas beta-lactamases (OMSTEAD et al., 1985).

O ácido clavulânico é um potente inibidor natural de beta-lactamases (enzimas que conferem resistência a antibióticos beta-lactâmicos em muitos microrganismos). A associação entre o AC e antibióticos beta-lactâmicos permite diminuir a inibição da beta-lactamase permitindo assim, que o antibiótico atue no combate a infecção (FUENTE et al., 2002).

A elucidação das rotas biossintéticas dos compostos beta-lactâmicos e dos demais bioativos produzidos por *S. clavuligerus* tem sido objeto de muitos estudos. Muitos precursores dos metabólitos secundários de *S. clavuligerus* são compostos nitrogenados, o que torna o metabolismo do nitrogênio um aspecto importante para a compreensão da dinâmica entre os metabolismos primário e secundário nesta espécie (DEMAIN; VAISHNAV, 2006).

O controle de processos microbianos pela fonte de nitrogênio é um fenômeno geral e extensivo a todos os microrganismos (AHARONOWITZ; DEMAIN, 1979; VILJOEN et al., 2013). Muitas moléculas de antibióticos são estruturadas com átomos de nitrogênio provenientes de compostos nitrogenados do metabolismo primário (DREW; DEMAIN, 1977; HODGSON, 2000).

Uma característica em *S. clavuligerus*, incomum em procaríotos, é a presença do ciclo da ureia (BUSHELL et al., 2006). Esta via do metabolismo do nitrogênio fornece arginina, um dos precursores diretos da molécula de AC. A biossíntese deste composto é favorecida pela adição de ornitina ao meio, a qual é convertida em arginina. Um aminoácido importante em *S. clavuligerus* é a lisina, que atua no metabolismo primário, via cadaverina aminotranferase, e no metabolismo secundário via 1-piperideína-6- carboxilato, para a produção do raro antibiótico  $\alpha$ -aminoadípico, um precursor de CefC e demais antibióticos beta-lactâmicos (OZCENGIZ; DEMAIN, 2013). Outro aminoácido com destaque é o glutamato de

sódio. Elson et al (1982) demonstraram a incorporação do carbono do glutamato na molécula de AC, e desde então, vários pesquisadores têm demonstrado o efeito positivo deste aminoácido na produção dos bioativos.

Apesar dos inúmeros benefícios da utilização destas fontes de nitrogênio em cultivos submersos de *S. clavuligerus* o consumo destes aminoácidos acarreta a liberação de amônio e já tem sido demonstrado que o acúmulo destes íons, em concentrações significativas no meio de cultivo afetam de forma negativa a síntese de antibióticos beta-lactâmicos produzidos tanto por fungos como por actinomicetos. Os mecanismos mais observados têm sido repressão e/ou inibição de enzimas da rota biossintética pelo amônio e de enzimas responsáveis pela síntese de precursores dos biocompostos por determinadas fontes de nitrogênio (OZCENGIZ; DEMAIN, 2013).

Em vista da importância do metabolismo do nitrogênio em *S. clavuligerus*, neste projeto investigou-se o consumo de fontes de nitrogênio, lisina e glutamato de sódio, e a evolução da concentração de íons amônio durante cultivos submersos do microrganismo, de forma a associar estes dados com a produção de compostos bioativos.

## 6. CONCLUSÃO

- Tanto o método do fenato como a utilização de eletrodo de íon seletivo (ISE) foram eficazes para analisar a concentração de amônio presente no sobrenadante das amostras coletadas durante os cultivos submersos de *S. clavuligerus*, obtendo-se resultados da mesma ordem de grandeza com ambos os métodos.
- A interação entre as fontes de nitrogênio lisina e glutamato de sódio, juntamente com a maltose como fonte de carbono principal, mostrou-se promissora, obtendo-se maiores aumentos nas produções dos compostos beta-lactâmicos AC e CefC em condições limitantes de nitrogênio, ou seja, em menores razões carbono:nitrogênio, considerando-se o carbono dos aminoácidos.
- Os modelos matemáticos resultantes dos planejamentos experimentais apresentaram bons ajustes aos dados experimentais de produção de AC e CefC, porém, indicaram a impossibilidade de se otimizar a produção de ambos os bioativos em um mesmo cultivo, uma vez que o valor ótimo de cada biocomposto está associado a concentrações distintas de lisina e glutamato de sódio; apesar disso, algumas condições específicas dos planejamentos experimentais (condições C-V do Experimento P1 e C-VII do Experimento P2) resultaram em produções relevantes e da mesma ordem de grandeza para ambos os biocompostos simultaneamente.
- O aumento do pH observado nos experimentos em frascos agitados afetou negativamente a produção dos bioativos, com destaque para o AC; neste contexto, o cultivo realizado em biorreator na condição C-VII do Experimento P2 (43,7 mmol/L de lisina e 18 mmol/L de glutamato de sódio) com controle de pH em 6,5, resultou em aumentos de 200% e 40% de AC e CefC respectivamente, com relação ao cultivo em frascos agitados.
- Altas concentrações de amônio afetam negativamente a produção dos bioativos, sendo o AC muito mais suscetível do que a molécula de CefC. As maiores concentrações de íons foram obtidas em condições com maiores concentrações de aminoácido, uma vez que o acúmulo de amônio está diretamente associado com o consumo das fontes de nitrogênio.

## REFERÊNCIAS

- AHARONOWITZ, Y. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 34, p. 209-233, 1980.
- AHARONOWITZ, Y.; DEMAIN, A. L. Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 61-67, Jan. 1979.
- ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O. Continuous clavulanic acid adsorption process. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 867-879, 2003.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water & waste water**. 21st ed. Washington, DC, 2005.
- BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Natural Products Reports**, v. 14, n. 4, p. 329-333, Aug. 1997.
- BASSIK, M. C.; KAMPMANN, M. Knocking out the door to tunicamycin entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 29, p. 11731-11732, July 2011.
- BELLÃO, C. **Produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em batelada e batelada alimentada**. 2010. 78 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites (review article). **Journal of Antibiotic**, v. 58, p. 1-26, Jan. 2005.
- BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O. Kinect studies on clavulanic acid degradation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 31-36, Mar. 2005.
- BIRD, A. E.; BELLIS, J. M.; GASSON, B. C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. **The Analyst**, v. 107, n. 1279, p. 1241-1245, Jan. 1982.
- BRAKHAGE, A. A. Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 547-585, 1998.
- BRAÑA, A. F.; PAIVA, N.; DEMAIN, A. L. Pathways and regulation of ammonium assimilation in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 1305-1317, 1986.
- BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J. D.; READING, C.; ROLINSON, G. N. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. **The Journal of the Antibiotic**, 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. **Journal of General Microbiology**, 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, June 2006.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: VANDAMME, E. J. (Ed.). **Biotechnology of industrial antibiotics**. New York: Marcel Dekker, 1984. p. 3-31.

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. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 42-53, Aug. 2016.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of the United State of America**, v. 100, p. 14555-14561, Dec. 2003.

COSTA, C. L. L. **Estratégia para melhoria da produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***. 2014. 131f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

DEMAIN, A. L.; Inhibition of penicillin formation by lysine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 67, p. 244-246, Mar. 1957.

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

DÉVI, S.; SRIDHAR, P. Optimization of critical parameters in immobilization of *Streptomyces clavuligerus* on alginate gel matrix for cephamycin C production. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 185-192, 1999.

DREW, S. W.; DEMAIN, A. L. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. **Annual Review Microbiology**, v. 31, p. 343-356, Oct. 1977.

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-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>] glutamic acid. **The Journal of Antibiotics**, v. 35, n. 1, p. 81-86, Feb. 1982.

ESSACK, S. The development of beta-lactam antibiotics in response to evolution of beta-lactamases. **Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 1391-1399, 2001.

FANG, A.; KEABLES, P.; DEMAIN, A. L. Unexpected enhancement of beta-lactam antibiotic formation in *Streptomyces clavuligerus* by very high concentrations of exogenous lysine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 705-709, Feb. 1996.

FUENTE, A.; LORENZANA, L. M.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible crossregulation of two unrelated secondary metabolic pathways. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6559-6565, Dec. 2002.

GRESSER, U. Amoxillin acid therapy maybe associated with severe side effects – review of the literature. **European Journal of Medicinal Research**, v. 20, n. 4, p. 139-149, Apr. 2001.

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

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

HODGSON, D. A. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. **Advances in Microbial Physiology**, v. 42, p. 47-238, 2000.

IVES, P. R.; BUSHELL, M. E. Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. **Microbiology**, v. 143, p. 3573-3579, Nov. 1996.

JENSEN, S. E.; PARADKAR, A. Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 123-133, 1999.

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*. **Biotechnology Progress**, 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, 2000. 613 p.

KONG, K. F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiotics to resistance and bacteriology. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 118, p. 1-36, Jan. 2010.

KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment- a review- part I. **Chemosphere**, v. 75, p. 417-434, Jan. 2009.

KURYLOWICZ, W. **Antibióticos**: uma revisão crítica. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1981. 341 p.

LEBRIHI, A.; LAMSAIF, D.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P. Effect of ammonium ion on spiramicyn biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 382-387, 1992.

LEITE, C. A. **Avaliação do processo de produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus***. 2014. 104 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

LEITE, C. A.; CAVALLIERI, A. P.; ARAUJO, M. L. G. C. Enhancing effect of lysine combined with other compounds on cephamycin C production in *Streptomyces clavuligerus*. **BMC Microbiology**, v. 13, Dec. 2013. doi:10.1186/1471-2180-13-296.

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 Microbiology Letters**, v. 363, 2016. doi:10.1093/femsle/fnv215.

LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 102-124, 1999.

LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*: microbial processes and products. In: BARREDO, J. L. (Ed.). **Methods in biotechnology**. New Jersey: Humana Press, 2005. v. 18, p. 149-163.

LIRAS, P.; RODRÍGUEZ-GARCIA, A. Clavulanic acid, a beta-lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 467-475, Oct. 2000.

LIVERMORE, D. M.; WOOD, M. J. Mechanism and clinical significance of resistance to new beta-lactam antibiotics. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 44, n 4, p. 252-258, Oct. 1990

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

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

MENDELOVITZ, S.; AHARONOWITZ, Y. A. I. R. Regulation of cephamycin C synthesis, aspartokinase, dihydrodipicolinic acid synthetase, and homoserine dehydrogenase by aspartic acid family amino acids in *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 21, p. 74-84, 1982.

MENDZ, G. L.; HAZELL, S. L. The urea cycle of *Helicobacter pylori*. **Microbiology**, v. 142, p. 2959-2967, Oct. 1996.

MERCK AND COMPANY (United States). E. Inamine; J. Birnbaum. **Cephamicin C by fermentation**. US3977942, 21 Nov. 1975, 31 Aug. 1976.

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*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 2308-2310, 1971.

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

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

ORTIZ, S. C. A. **Estudo da produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em diferentes concentrações de lipídeos e de fontes complexas de nitrogênio**. 2005, 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

OZCENGIZ, G.; DEMAİN, A. L. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 287-311, Apr. 2013.

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

READING, C.; COLE, M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 852-857, May 1977.

RIUS, N.; DEMAİN, A. L. Regulation of lysine  $\epsilon$ -aminotranferase by carbon source and lack of control by phosphate in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p. 735-737, 1997.

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*. **Journal of the Biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 69-76, Jan. 2013.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**: uma estratégia sequencial de planejamentos. Campinas: Casa do Pão, 2005. 326 p.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 318-325, Nov. 1984.

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

ROUBOS, J. A.; KRABBEN, P.; DE LAAR, W. T. A. M.; BABUSKAA, R.; HEIJEN, J. J. Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 3, p. 451-457, June 2002.

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

SANTAMARTA, I.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, A.; PÉREZ-REDONDO, R.; LIRAS, P. CcaR Is an autoregulatory protein that binds to the *ccaR* and *cefD-cmcl* promoters of the cephamycin C - clavulanic acid cluster in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 11, p. 3106-3113, June 2002.

SHARMA, A.; KUMARI, N.; MENGHANI, E. Bioactive secondary metabolites: an overview. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 5, n. 4, p. 1395-1407, 2014.

SPRATT, B. G. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. **Science**, v. 264, p. 388-393, Apr. 1994.

STEFFE, C. H. Alexander Fleming and penicillin. The chance of a lifetime? **North Carolina Medical Journal**, v. 53, n. 6, p. 308-310, June 1992.

TROVATTI, E.; BADINO, A. C.; HOKKA, A. C.; ARAUJO, M. L. G. C. Influence of free amino acids on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in synthetic medium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 173-179, 2006.

TZOLLAS, N. M.; ZACHARIADIS, G.; ANTHEMIDIS, A.; STRATIS, J. A. A new approach to indophenol blue method for determination of ammonium in geothermal waters with high mineral content. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 90, n. 2, p. 115-126, 2010.

VILJOEN, A. J.; KIRSTEN, C. J.; BAKER, B.; VAN HELDEN, P. D.; WIID, I. J. F. The role of glutamine oxoglutarate aminotransferase and glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Mycobacterium bovis* BCG. **PLoS One**, v. 8, n. 12, 2013. doi:101371/journal.pone.0084452.

WILLIAMS, W. M.; MOUGHAN, P. J.; FULLER, M. F. Comparison of three markers for the determination of bacterial protein in terminal ileal digesta in the growing pig. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p. 951-959, 2013.