

BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DO ANTITUMORAL HOLOMICINA POR *STREPTOMYCES CLAVULIGERUS*

A. S. BAPTISTA¹, A. P. CAVALLIERI¹, C. A. LEITE¹, A. J. G. CRUZ² e M. L. G. C. ARAUJO¹

¹ Universidade Estadual Paulista, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Araraquara - SP

² Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, São Carlos - SP
E-mail para contato: mlaraujo@iq.unesp.br

RESUMO - *Streptomyces clavuligerus* produz vários biocompostos de uso terapêutico, como os beta-lactâmicos ácido clavulânico e cefamicina C, e os não beta-lactâmicos holomicina e tunicamicina. Holomicina é conhecida por inibir a síntese de RNA polimerase de bactérias resistentes a rifamicina e é produzida em baixas concentrações (6 a 8 mg·L⁻¹) pela cepa selvagem (ATCC 27064) sob condições favoráveis à produção de beta-lactâmicos. Cultivos em biorreator convencional operado em batelada mostraram que a combinação de maltose e lisina promoveu a produção de cefamicina C e ácido clavulânico (90 a 100 mg·L⁻¹), sem produção de holomicina, e a mesma combinação (maltose e lisina) adicionada de glutamato estimulou a produção de holomicina (95 a 110 mg·L⁻¹), com produção de cefamicina C ou ácido clavulânico cerca de 65% menor para ambos. Os dados obtidos permitiram estimar parâmetros cinéticos e estequiométricos dos processos por meio de modelagem e simulação.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Streptomyces clavuligerus* foi inicialmente descrita como produtora dos importantes compostos beta-lactâmicos cefamicina C (CefC), utilizada na produção de antibióticos semi sintéticos bioativos inclusive contra bactérias anaeróbias, e ácido clavulânico (AC), um potente inibidor de beta-lactamases. Além de produzir mais de vinte clavamas, linhagens desta espécie também produzem bioativos não beta-lactâmicos, como holomicina (Hol) e tunicamicina (LIRAS e MARTÍN, 2006). Hol pertence à classe das pirrotinas, compostos que apresentam atividade antimicrobiana e antitumoral, sendo conhecida como precursor de um inibidor da síntese de RNA polimerase em bactérias resistentes à rifamicina (OLIVA *et al.*, 2001). Foi isolada de algumas espécies de *Streptomyces* e caracterizada quimicamente em meados da década de 1960, embora sua produção tenha sido atribuída a *S. clavuligerus* apenas vinte anos depois (KENING e READING, 1979). Pouco se sabe sobre a origem biossintética de Hol ou de outras ditiolopirrolonas, como aureotricina e xenorhabdinas. Apenas uma rota biossintética para Hol foi proposta, com base em ferramentas da bioinformática, havendo ainda relatos sobre a identificação e a caracterização do agrupamento de genes responsável pela sua biossíntese (LI e WALSH, 2010). Quanto à biossíntese do composto por *S. clavuligerus*, há escassos estudos comparativos de capacidades produtivas e diferenças genéticas observadas entre a linhagem selvagem e mutantes melhores produtores (DE LA FUENTE *et al.*, 2002; NÁRDIZ *et al.*, 2011). Dados da literatura sempre associaram a produção de quantidades desprezíveis de Hol à linhagem selvagem *S. clavuligerus* ATCC 27064. Por outro lado, cultivos em glicerol ou amido adicionados dos

aminoácidos lisina, ácido alfa-aminoadípico, arginina e/ou ornitina, ou da diamina 1,3 diaminopropano, promovem produções significativas de compostos beta-lactâmicos, como CefC ou AC, com destaque para este último (DOMINGUES *et al.*, 2010; LEITE *et al.*, 2013). No presente trabalho, a produção de biocompostos por *S. clavuligerus* foi investigada em dois meios quimicamente definidos contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Os dados experimentais obtidos em cultivos em batelada em biorreator convencional em escala de bancada foram comparados por meio de estudos de modelagem e simulação, com a obtenção de parâmetros estatisticamente significativos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Suspensão de esporos (10^8 esporos·mL⁻¹) de *Streptomyces clavuligerus* (ATCC 27064), conservada a -80°C em solução crioprotetora (glicerol a 20% v·v⁻¹), foi utilizada como inóculo inicial dos cultivos submersos. Os esporos foram germinados em meio contendo (g·L⁻¹): triptona (5,0), extrato de levedura (3,0), extrato de malte (10) e o tampão biológico ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico (MOPS) (21); pH ajustado em $6,8 \pm 0,1$. O inóculo principal foi preparado em meio contendo (g·L⁻¹): maltose (10), lisina (4,0), glutamato (5,5), extrato de levedura (1,0), K₂HPO₄ (0,80), MgSO₄·7H₂O (0,75), MOPS (21), 10 mL·L⁻¹ de solução de sais contendo (g·L⁻¹) MnCl₂·4H₂O (1,0), FeSO₄·7H₂O (1,0), ZnSO₄·7H₂O (1,0), e 1,0 mL·L⁻¹ de solução de elementos traços contendo (g/L) CuSO₄·5H₂O (0,49), CoCl₂ (0,28) e Na₂MoO₄ (0,15); pH ajustado em $7,2 \pm 0,1$. Foram utilizados dois meios de produção quimicamente definidos, contendo basicamente (g·L⁻¹): maltose (10), K₂HPO₄ (1,75), MgSO₄·7H₂O (0,75), CaCl (0,20), NaCl (2,0), MOPS (21), 5,0 mL·L⁻¹ da solução de sais e 1,0 mL·L⁻¹ da solução de elementos traços descritas acima, pH ajustado em $7,2 \pm 0,1$. Quanto às fontes de nitrogênio, um meio conteve (em g·L⁻¹) somente lisina (18,3) e o outro, lisina (9,2) e glutamato (9,4), mantendo-se o mesmo teor inicial de nitrogênio em ambos os meios. Os cultivos em frascos agitados foram realizados em mesa rotativa (260 rpm, 5 cm de excentricidade, 28°C), com amostragem em 24, 48 e 72 horas. Os experimentos em biorreator convencional (5 L de volume útil) foram realizados em batelada, com controles de temperatura (28°C), pH (6,8) e oxigênio dissolvido em 50% relativo à saturação, mantido por vazão de ar ajustada em 1 vvm e pela variação automática da velocidade de agitação (250 a 400 rpm). O volume reacional foi de 1,5 L de meio e utilizou-se apenas um impelidor (tipo Rushton). Todos os cultivos foram realizados em duplicata. As amostras foram centrifugadas (4°C, 11.000g), separando-se a biomassa do sobrenadante. A biomassa foi expressa em g·L⁻¹ de massa seca de células, determinada após lavagem do decantado, secagem (a 105°C por 24 horas) e pesagem em recipiente previamente calibrado. Com o sobrenadante foram determinadas as concentrações de maltose, lisina, glutamato, Hol, CefC e AC. O açúcar e os aminoácidos foram determinados por HPLC acoplado a um detector de índice de refração. Hol foi extraída do caldo fermentado com butanol (1:1) (KENING e READING, 1979) e sua concentração determinada por HPLC acoplado a um detector UV (LIRAS E MARTÍN, 2005). Em virtude da indisponibilidade comercial de CefC, este biocomposto foi determinado indiretamente por meio de bioensaio de difusão em ágar de acordo com método descrito por Liras e Martín (2005). Neste método utiliza-se cefalosporina C como composto padrão e *Escherichia coli* ESS 2235 como bactéria-teste, super sensível a antibióticos beta-lactâmicos. Ainda, as amostras foram previamente tratadas com penicilinase (Penase®, Difco) para eliminar a penicilina N, interferente na análise. AC foi determinado em espectrofotômetro UV-vis, após reação com imidazol, seguida de leitura do composto resultante da reação a 312 nm, conforme método descrito em BIRD *et al.* (1982). As Equações Diferenciais

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Crescimento celular em diferentes fontes de carbono

Os resultados de crescimento celular em frascos agitados utilizando-se como fontes de carbono maltose, lisina ou glutamato, individualmente, estão apresentados na Figura 1. Para o cultivo em maltose foi utilizada uma fonte inorgânica de nitrogênio (NH_4Cl), considerando-se uma proporção C:N compatível com a dos dois aminoácidos. O cultivo em glutamato do presente trabalho fez parte de uma série de experimentos anteriormente realizados utilizando-se este aminoácido em várias concentrações, com amostragem a cada 24 horas. Pode-se observar uma drástica queda da biomassa a partir de 24 horas (Figura 1C). Isto ocorreu porque, enquanto nos meios contendo maltose ou lisina os valores de pH mantiveram-se em torno de 7,0, em glutamato o pH atingiu valores próximos de 9,0. Ainda assim, mostrou-se que o glutamato é uma fonte apropriada para o crescimento celular, porém, sob controle adequado de pH durante o cultivo.

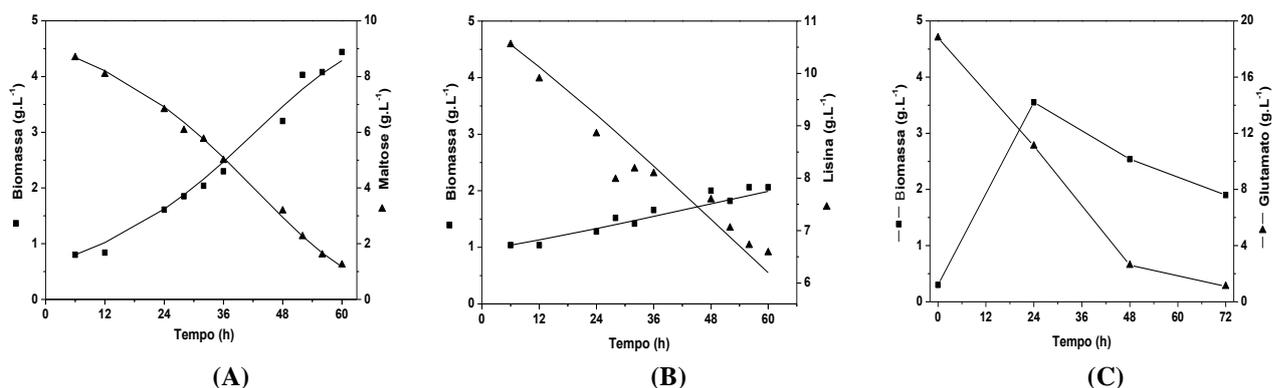


Figura 1 – Crescimento de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 em frascos agitados em meios contendo: maltose (A), lisina (B) e glutamato (C).

O modelo de Monod ajustou-se bem à cinética de crescimento em maltose e o modelo logístico foi o mais adequado ao crescimento em lisina. Os valores estimados de velocidade específica máxima de crescimento e a constante de Monod foram $\mu_{\text{máxMalt}} = 0,065 \pm 0,005 \cdot (\text{h}^{-1})$ e $k_{\text{Malt}} = 5,3 \pm 0,8 (\text{g}_{\text{Malt}} \cdot \text{L}^{-1})$. Os parâmetros estimados para o modelo de velocidade específica de crescimento em lisina foram $\mu_{\text{máxLis}} = 0,033 \pm 0,007 (\text{h}^{-1})$ e a constante do modelo logístico $k_{\text{Lis}} = 0,013 \pm 0,004 (\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$. Os valores estimados de coeficiente de rendimento de substrato a células foram (em $\text{g}_{\text{cél}} \cdot \text{g}_{\text{substrato}}^{-1}$) $Y_{\text{X/Malt}} = 0,46 \pm 0,01$ e $Y_{\text{X/Lis}} = 0,23 \pm 0,02$. O coeficiente de rendimento de glutamato a células foi calculado para 24 horas de cultivo, resultando em $Y_{\text{X/Glut}} \cong 0,4$, um valor da mesma ordem de grandeza do estimado para o crescimento em maltose.

3.2. Produção de compostos bioativos

Cultivo em maltose e lisina: O papel da lisina como estimulante da biossíntese de CefC tem sido bem reportado na literatura, uma vez que este aminoácido é convertido, via lisina

aminotransferase, no ácido alfa aminoadípico, o qual compõe o tripeptídeo aminoadipil-cisteinil-valina (ACV), precursor de todos os antibióticos beta-lactâmicos (DEMAIN e VAISHNAV, 2006). Com base nesta informação, um meio quimicamente definido contendo maltose e lisina como fontes de carbono e energia e de nitrogênio foi empregado. Os dados experimentais estão apresentados no conjunto de gráficos da Figura 2. Embora o objetivo fosse a produção de CefC, foram obtidas concentrações deste biocomposto e de AC da mesma ordem de grandeza, entre 90 e 100 mg·L⁻¹. Sabe-se que as rotas biossintéticas destes compostos são totalmente independentes, todavia a produção de ambos ocorre de forma concomitante. Isto se deve ao fato de que as biossínteses de ambos são reguladas pelo mesmo elemento multifuncional *ccaR* (*cephamycin and clavulanic acid Regulator*), codificado pelo gene *ccaR*. Desta forma, a presença e a concentração de determinados nutrientes no meio de cultivo podem favorecer a produção de um ou outro composto, todavia obter altos níveis de um destes bioativos em detrimento do outro é muito difícil. Quanto a Hol, sua produção foi desprezível, cerca de 5 mg·L⁻¹.

Os dados apresentados no item 3.1 mostraram que a utilização de maltose ou lisina como fonte de carbono sustenta o crescimento de *S. clavuligerus*. A utilização conjunta de maltose e lisina, porém, resultou em perfis bem diferentes de crescimento e consumo dos substratos (Figura 2). Desta forma, no modelo matemático para este processo (Modelo 1) foi considerada a influência de ambos os compostos na velocidade de crescimento, os quais, porém, exercendo diferentes funções celulares, conforme cinética proposta por Megee (FREDRICKSON *et al.*, 1970). Assim, maltose participa essencialmente como substrato para a formação de biomassa e lisina atua majoritariamente como fonte de manutenção celular. Esta proposta fundamentou-se no fato de que o catabolismo de lisina gera duas moléculas de acetil-coenzima A, geralmente metabolizadas através do ciclo de Krebs, a principal via de fornecimento de energia para as células em condições de aerobiose. Ainda, foi assumido que o consumo de lisina é dependente de sua concentração de acordo com uma cinética de saturação. Para a produção dos compostos bioativos (CefC e AC), adotou-se uma cinética totalmente associada ao crescimento, conforme evidenciado pelos dados experimentais. As EDOs do Modelo 1 são apresentadas a seguir:

$$\mu_1 = \mu_{max1} \cdot \frac{C_{Malt}}{k_{Malt1} + C_{Malt}} \cdot \frac{C_{Lis}}{k_{Lis1} + C_{Lis}} \quad (1)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = (\mu_1 - k_{d1}) \cdot C_x \quad (2)$$

$$\frac{dC_{malt}}{dt} = -\frac{\mu_1}{Y_{xmalt1}} \cdot C_x \quad (3)$$

$$\frac{dC_{Lis}}{dt} = -m_{Lis1} \cdot \frac{C_{Lis}}{k_{Lis1} + C_{Lis}} \cdot C_x \quad (4)$$

$$\frac{dC_{CefC}}{dt} = \alpha_{CefC1} \cdot \mu_1 \cdot C_x \quad (5)$$

$$\frac{dC_{AC}}{dt} = \alpha_{AC1} \cdot \mu_1 \cdot C_x \quad (6)$$

Pode-se constatar pela Figura 2 o bom ajuste do Modelo 1 aos dados experimentais. Os parâmetros deste modelo estão apresentados na Tabela 1. O parâmetro estimado para a manutenção celular, $m_{Lis1} = 0,058 \text{ g}_{Lis} \cdot \text{g}_{cél}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, corresponde a $0,01 \text{ mols}_{ATP} \cdot \text{g}_{cél}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, considerando-se que a oxidação completa da lisina produz 32 ATPs ($\equiv 0,175 \text{ mols}_{ATP} \cdot \text{g}_{Lis}^{-1}$). Stephanopoulos *et al.* (1998) coletaram dados de energia de manutenção para vários microrganismos em diferentes

condições do cultivo e observaram uma ampla faixa de valores, de 10^{-3} a $1,9 \cdot 10^{-2}$ $\text{mols}_{\text{ATP}} \cdot \text{g}_{\text{cél}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, suportando, assim, o valor estimado no presente estudo.

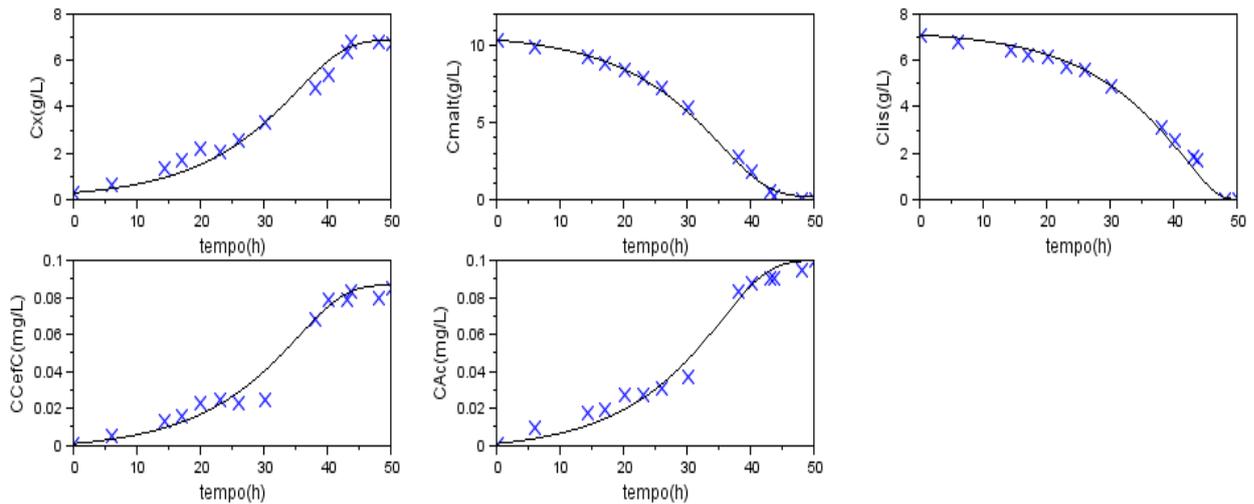


Figura 2 – Perfis de concentração de células (Cx), maltose (Cmalt), lisina (Clis), cefamicina C (CCefC) e ácido clavulânico (CAc) de cultivo em biorreator convencional operado em batelada (× - dados experimentais; — - ajuste do Modelo 1).

Tabela 1 – Valores estimados dos parâmetros do Modelo 1

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

Cultivo em maltose, glutamato e lisina: O catabolismo da lisina ocorre via cadaverina, através da qual todo o nitrogênio do aminoácido é transaminado para alfa-cetoglutarato resultando em duas moléculas de glutamato (MADDURI *et al.*, 1989). Assim, a adição de glutamato ao meio contendo lisina poderia suprir a demanda por nitrogênio do metabolismo primário, promovendo a diminuição do consumo de lisina via cadaverina e aumentando a disponibilidade do aminoácido para a biossíntese de CefC. Com base nesta suposição, utilizou-se um meio quimicamente definido contendo maltose, lisina e glutamato como fontes de carbono e energia e de nitrogênio visando um aumento da produção de CefC. Os resultados experimentais estão apresentados no conjunto de gráficos da Figura 3. Pode-se observar que esta estratégia não surtiu o efeito esperado, obtendo-se cerca de 65% menos CefC ou AC do que foi obtido destes compostos em meio contendo apenas maltose e lisina. Possivelmente a adição de glutamato alterou a regulação do metabolismo do nitrogênio diminuindo a produção destes bioativos. Um comportamento semelhante também foi observado por Romero *et al.* (1984) em meios sem lisina. Todavia, a combinação de maltose, glutamato e lisina resultou em uma alta concentração de Hol, $110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, uma produção nunca relatada para a linhagem selvagem.

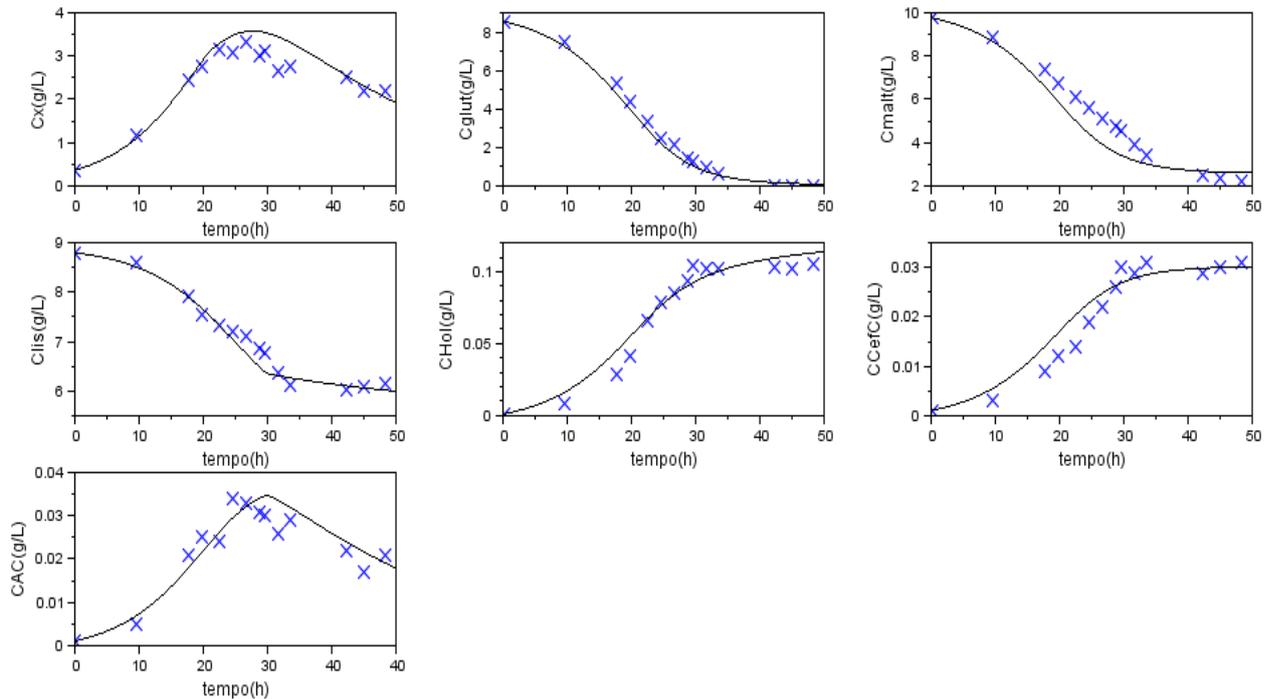


Figura 3 – Perfis de concentração de células (Cx), glutamato (Cglut), maltose (Cmalt), lisina (Clis), holomicina (CHol), cefamicina C (CCefC) e ácido clavulânico (CAC) de cultivo em biorreator convencional operado em batelada (× - dados experimentais; — - ajuste do Modelo 2).

De la Fuente *et al.* (2002) mostraram que mutantes de *S. clavuligerus* bloqueados em determinadas etapas da rota biossintética de AC produzem quantidades significativas de Hol. Os autores sugeriram que o acúmulo de intermediários da rota de AC direciona o metabolismo secundário para a produção de Hol. A alta produção de Hol pela linhagem selvagem obtida no presente estudo pode estar associada à inibição da produção de AC ocasionada pelo acúmulo de espécies nitrogenadas no meio de cultivo. O comportamento do processo permitiu propor um modelo (Modelo 2) no qual lisina, devido ao seu baixo consumo, não influencia diretamente no crescimento, atuando apenas na manutenção celular. O glutamato e a maltose, por sua vez, foram considerados determinantes da velocidade de crescimento assumindo-se a cinética de Megee e para a produção dos biocompostos foram assumidos o modelo totalmente associado ao crescimento para CefC ou AC e o modelo parcialmente associado ao crescimento de Leudeking e Piret para Hol (FREDRICKSON *et al.*, 1970). As EDOs do Modelo 2 são apresentadas a seguir:

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

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

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

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

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

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

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

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

O Modelo 2 ajustou-se de maneira bem satisfatória aos dados experimentais. Com relação ao cultivo em meio contendo apenas maltose e lisina, a velocidade específica máxima de crescimento estimada foi cerca de 2,5 vezes maior, justificada pela ambientação prévia do microrganismo em glutamato durante a preparação do inóculo principal. Entretanto, o acúmulo de biomassa foi 50% menor. Isto pode ser explicado pela baixa resistência de *S. clavuligerus* a Hol, mais evidente em concentrações do biocomposto acima de 60 mg·L⁻¹, observando-se o dobro da taxa de morte celular e velocidade de manutenção por lisina cerca de 85% menor. Também, acredita-se que esta toxicidade exercida por Hol acarretou uma maior demanda energética do microrganismo, de forma que o coeficiente de lisina para a manutenção celular estimado no Modelo 2 foi cerca de 3 vezes maior que o ajustado para o Modelo 1. Os parâmetros do Modelo 2 estão na Tabela 2.

O complexo metabolismo de *S. clavuligerus* é extremamente susceptível a alterações no ambiente. Condições de meio inicialmente propostas para melhorar a produção de CefC, por ex., não surtiram o efeito esperado, porém, mostraram-se adequadas à produção de altas concentrações de Hol. Os modelos cinéticos propostos, fundamentados em informações bioquímicas e metabólicas, refletiram muito bem o comportamento dos processos investigados.

Tabela 2 – Valores estimados dos parâmetros do Modelo 2

Velocidade específica máxima de crescimento	μ_{max2}	$0,242 \pm 0,049 \text{ (h}^{-1}\text{)}$
Constante do modelo de Megee para maltose	k_{Malt2}	$4,12 \pm 4,24 \text{ (g}_{Malt}\cdot\text{L}^{-1}\text{)}$
Constante do modelo de Megee para glutamato	k_{Glut2}	$2,54 \pm 1,35 \text{ (g}_{Glut}\cdot\text{L}^{-1}\text{)}$
Constante de morte celular	k_{d2}	$0,023 \pm 0,001 \text{ (h}^{-1}\text{)}$
Coef. de rendimento de glutamato a células	Y_{XGlut2}	$0,064 \pm 0,01 \text{ (g}_{Glut}\cdot\text{g}_{cél}^{-1}\text{)}$
Coef. de rendimento de maltose a células	Y_{XMalt2}	$0,79 \pm 0,02 \text{ (g}_{Malt}\cdot\text{g}_{cél}^{-1}\text{)}$
Coef. de manutenção celular pela lisina	m_{Lis2}	$0,175 \pm 0,076 \text{ (g}_{Lis}\cdot\text{g}_{cél}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$
Coef. de saturação da velocidade de manutenção	k_{Lis2}	$24,24 \pm 12,44 \text{ (g}_{Lis}\cdot\text{L}^{-1}\text{)}$
Coef. do modelo de Leudeking-Piret para Hol, associada ao crescimento	α_{Hol2}	$0,016 \text{ (g}_{Hol}\cdot\text{g}_{cél}^{-1}\text{)}$
Coef. do modelo de Leudeking-Piret para Hol, não associada ao crescimento	β_{Hol2}	$0,0002 \text{ (g}_{Hol}\cdot\text{g}_{cél}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$
Coef. do modelo de Leudeking-Piret para CefC, associada ao crescimento	α_{CefC2}	$0,0052 \text{ (g}_{CefC}\cdot\text{g}_{cél}^{-1}\text{)}$
Coef. do modelo de Leudeking-Piret para AC, associada ao crescimento	α_{AC2}	$0,0068 \text{ (g}_{AC}\cdot\text{g}_{cél}^{-1}\text{)}$
Constante de degradação de AC	k_{dAC2}	$0,04 \text{ (h}^{-1}\text{)}$

4. Referências

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.

DE LA FUENTE, A.; LORENZANA, L. M.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce

- large amounts of holomycin: possible crossregulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J. Bacteriol.*, v. 184, p. 6559-6565, 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.
- FREDRICKSON, A. G.; MEGEE, R. D.; TSUCHIYA, H. M. Mathematical models for fermentation processes. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 13, p. 419-465, 1970.
- KENING, M.; READING, C. Holomycin and an antibiotic (MM 19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Antibiot.*, p. 549-554, 1979.
- 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, n. 296, 2013.
- LI, B.; WALSH, C. T. Identification of the gene cluster for the dithiolopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *PNAS*, v. 107, n. 46, p. 19731-19735, 2010.
- LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. *Methods in biotechnology*. New Jersey: Humana Press v. 18, p. 149-163, 2005.
- LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *Int. Microbiol.*, v. 9, p. 9-19, 2006.
- 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.
- MARQUARDT, D. W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.*, v. 11, n. 2, p. 431-441, 1963.
- NÁRDIZ, N.; SANTAMARTA, I.; LORENZANA, L. M.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. A rhodanese-like protein is highly overrepresented in the mutant *S. clavuligerus* oppA2::aph: effect on holomycin and other secondary metabolites production. *Microbiol. Biotechnol.*, v. 4, n. 2, p. 216-225, 2011.
- OLIVA, B.; O'NEILL, A.; WILSON, J.M.; O'HANLON, P.J.; CHOPRA, I. Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, n. 2, p. 532-539, 2001.
- 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.
- STEPHANOPOULOS, G. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic Engineering*. 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.