

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

A PRODUÇÃO DE LISINA POR
PROCESSOS FERMENTATIVOS

JOSÉ ARMANDO PEREA RÍOS
Engenheiro em Indústrias Alimentícias

Orientador.

Dr. Nestor Mascotti

Professor convidado pela FTA da
UNICAMP e catedrático na Univer
sidade de San Juan (Argentina)

Dissertação apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimen
tos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do tí
tulo de Mestre em Ciências em Tecnologia de Alimentos.

1972

À memória de meu pai

À minha mãe e irmãos

À minha esposa e filha

INDICE

página

RESUMO

SUMMARY

| | | |
|------|--|----|
| I. | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| | a. Generalidades..... | 1 |
| | b. A importância da lisina na alimentação humana e animal..... | 2 |
| | c. Possibilidade de produção de aminoácidos por diversos microrganismos..... | 6 |
| II. | MECANISMOS REGULADORES DA PRODUÇÃO DE LISINA..... | 7 |
| III. | BIOSSÍNTESE DA LISINA..... | 10 |
| IV. | FERMENTAÇÃO DA L-LISINA POR FUNGOS E LEVEDURAS.... | 12 |
| V. | FERMENTAÇÃO DA L-LISINA POR BACTÉRIAS..... | 17 |
| VI. | DISCUSSÃO E CONCLUSÕES..... | 38 |
| VII. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 43 |

AGRADECIMENTOS

Aos professores, Dr. Nestor Mascotti, pela sua orientação e dedicação na preparação deste trabalho, e ao Dr. Waldemiro Sgarbieri, professor-guia perante a banca examinadora.

Ao professor Ricardo Sadir e ao Farmacêutico Arlindo Moreira e muito especialmente ao Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Dr. André Tosello, por sua ajuda e facilidades proporcionadas ao autor.

À Organização dos Estados Americanos, pela oportunidade e ajuda econômica facultada, para que este trabalho fosse realizado.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

R E S U M O

A importância da lisina na alimentação humana e animal, tem estimulado a procura de novos processos para sua obtenção. No presente trabalho de investigação bibliográfica, estuda a produção de lisina por processos fermentativos. Desta investigação se verificou que a lisina pode ser produzida por fungos, leveduras e bactérias; dos quais, os fungos e leveduras até agora não provaram ser bons produtores de lisina, enquanto que as bactérias o são. Comercialmente é possível produzir lisina, mediante dois processos distintos. Em um deles, a produção o corre em duas etapas. Na primeira se utiliza um mutante de *Escherichia coli* que é incapaz de converter o ácido diaminopimélico (precursor da lisina) em lisina. Numa segunda etapa do processo, se utiliza outro microrganismo, como o *Aerobacter aerogenes* que possui um enzimo, a descarboxilase do ácido diaminopimélico, capaz de converter este ácido em lisina. Atualmente, a lisina vem sendo produzida com sucesso pelo processo fermentativo em uma única etapa, utilizando um mutante auxotrófico de *Micrococcus glutamicus* que requer para seu pleno desenvolvimento, homoserina e biotina. Neste processo o rendimento tem sido de aproximadamente 13 mg./ml., empregando-se melagos de várias naturezas como fonte de carbono. Posteriormente, outros mutantes auxotróficos foram obtidos em laboratórios, em muitos casos bons produtores de lisina, tendo-se conseguido rendimento de até 48,7 mg./ml. de meio, com um mutante de *Corynebacterium glutamicum* e melago como fonte de carbono. Outras fontes de carbono, tais como querosene, parafinas, acetatos, etc., estão sendo investigadas como substratos para a produção comercial de lisina.

Para a produção de lisina é indispensável trabalhar-se com o microrganismo apropriado, adequada fonte de carbono e nitrogênio, sais minerais, biotina e determinados fatores de crescimento, além de condições ótimas para controle de temperatura, pH, agitação e aeração.

Neste campo, existe amplas possibilidades para a América Latina explorar vantajosamente, uma vez que as principais matérias primas (melaios e amidos) se encontram em abundância.

S U M M A R Y

The importance of lysine in human and animal foods has stimulated research of new processes for its obtention. In this present work of bibliographic investigation, the production of lysine by fermentative processes has been studied. From this investigation, it is seen that lysine can be produced by fungi, yeast, and bacterias of which to date bacterias have proved to be good lysine produces, whereas fungi and yeasts have not. Commercially, it is possible to produce lysine by two distinct processes. In one of them production occurs in two stages. In the first stage, a mutant of Escherichia coli is used, which is unable to convert diaminopimelic acid (precursor of lysine) into lysine. In the second stage of the process, another microorganism is used, such as Aerobacter aerogenes. It possesses an enzyme, the decarboxylase of diaminopimelic acid, capable of converting this acid into lysine. At present, lysine has been successfully produced by fermentative process, in only one stage, using an auxotrophic mutant of Micrococcus glutamicus, which requires homoserine and biotin, for its full development. In this process the yield has been of approximately 13 mg/ml, using molasses of several kinds, as a source of carbon. Later on, other auxotrophic mutants were obtained in laboratories, in many cases as good produces of lysine, a yield of 48,7 mg/ml of media having been reached, with a mutant of Corynebacterium glutamicum and molasses as a source of carbon.

Other source of carbon, such as kerosene, paraffins, acetates, etc., are being investigated as substrates for the commercial production of lysine.

For the production of lysine it is necessary to apply appropriate microorganism, an adequate source of carbon and nitrogen, mineral salts, biotin, and specific growth factors besides optimum conditions of temperature, pH, agitation and aeration.

In this field, there are ample possibilities of profitable exploration for Latin America, since raw materials (molasses and starch) are plentiful.

I. INTRODUÇÃO

A alimentação das populações dos países latino americanos, como de outras partes do mundo, em geral, baseia-se no consumo de cereais. O conteúdo protéico dos cereais, via de regra, é baixo e de inferior qualidade nutricional, devido principalmente às deficiências em determinados aminoácidos essenciais.

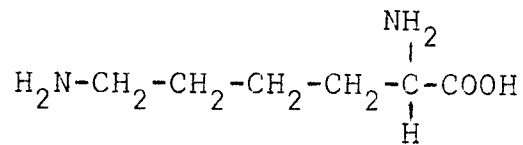
Estudos em diversos países têm demonstrado que é viável a complementação das dietas com adição de aminoácidos. Em tal sentido sugeriu-se que o trigo destinado a países como a Índia, fosse enriquecido com lisina. Apesar disso, atualmente, os aminoácidos de complementação custam mais caro que a proteína que se deseja suplementar.

O fato exposto, justifica por si só, a busca de processos economicamente viáveis para a obtenção de aminoácidos a baixo custo. Talvez seja esta a razão pela qual a produção de aminoácidos por fermentação constitua um ramo da microbiologia industrial de rápido desenvolvimento e expansão.

A finalidade do presente trabalho de investigação bibliográfica é reunir e discutir os dados na literatura sobre o assunto afim de que se possa tirar conclusões sobre os processos que parecem economicamente mais interessantes para a obtenção da lisina, por processos fermentativos.

a. Generalidades

A lisina (ácido α, ϵ -diamino capróico), tem a seguinte fórmula estrutural:



Foi descoberto em 1889, por Drechsel. É um dos aminoácidos essenciais. Do ponto de vista nutricional, os aminoácidos essenciais ou indispensáveis são aqueles que os organismos não podem sintetizar (ou não sintetizam em velocidade suficiente), por conseguinte, têm que ser fornecidos em quantidades adequadas pelas proteínas já formadas.

Uma grande vantagem da produção microbiana de lisina (em geral de todos os aminoácidos) sobre a produção por síntese química, é que os produzidos por microrganismos são exclusivamente da forma L, biologicamente ativa.

b. A importância da lisina na alimentação humana e animal

Em vários países do Istmo Centro Americano, assim como no México, o milho é consumido principalmente sob a forma de tortilhas e representa a fonte principal de proteínas e calorias da dieta habitual.

No meio rural da Guatemala, por exemplo, este cereal fornece até 75% do consumo diário per capita de calorias e 64% das proteínas (1).

As proteínas do milho têm sido objeto de extensas investigações, e são vários os autores que têm confirmado suas deficiências em aminoácidos essenciais. Alguns delas encontraram que a lisina é o aminoácido mais limitante.

Os estudos realizados por Kik, em 1965, revelaram que a lisina é o primeiro aminoácido limitante nas proteínas do arroz, ocupando a treonina o segundo lugar em ordem de deficiência.

A seguir damos um breve resumo de alguns dos trabalhos de suplementação de cereais com aminoácidos, realizados no INCAP em crianças hospitalizadas e já totalmente recuperadas de desnutrição protéica. A figura 1, mostra a retenção de nitrogênio em crianças alimentadas com proteínas de quatro cereais (coluna ponteadada), dos que receberam as dietas suplementadas com os aminoácidos em que estas eram deficientes (coluna achurada), e daqueles a quem se administrou leite (coluna branca), que serviram como controle (1).

Segundo se observa, o milho comum respondeu favoravelmente à suplementação com 0,5% de lisina, mais 0,3% de triptofânio, sobretudo quando a ingestão foi de 3,0 gr. de proteína/kg. de peso/dia; por outro lado, o balanço de nitrogênio foi negativo quando o milho não foi suplementado e se administrou a níveis de ingestão mais baixo.

A retenção de nitrogênio obtida com o milho opaco - 2 foi semelhante à produzida pelo leite. Sendo superior ao leite quando a ingestão foi de 2,0 gramas de proteína /kg de peso/dia.

Com respeito ao trigo, os resultados obtidos com a ingestão de 2,0 gr. de proteína/kg de peso/dia, sugeriram que 61 mg.de lisina/gr. de nitrogênio era suficiente para produzir a máxima retenção de nitrogênio.

A níveis maiores de ingestão, se requeria mais lisina, uma vez que a lisina é o aminoácido que limita a utilização biológica

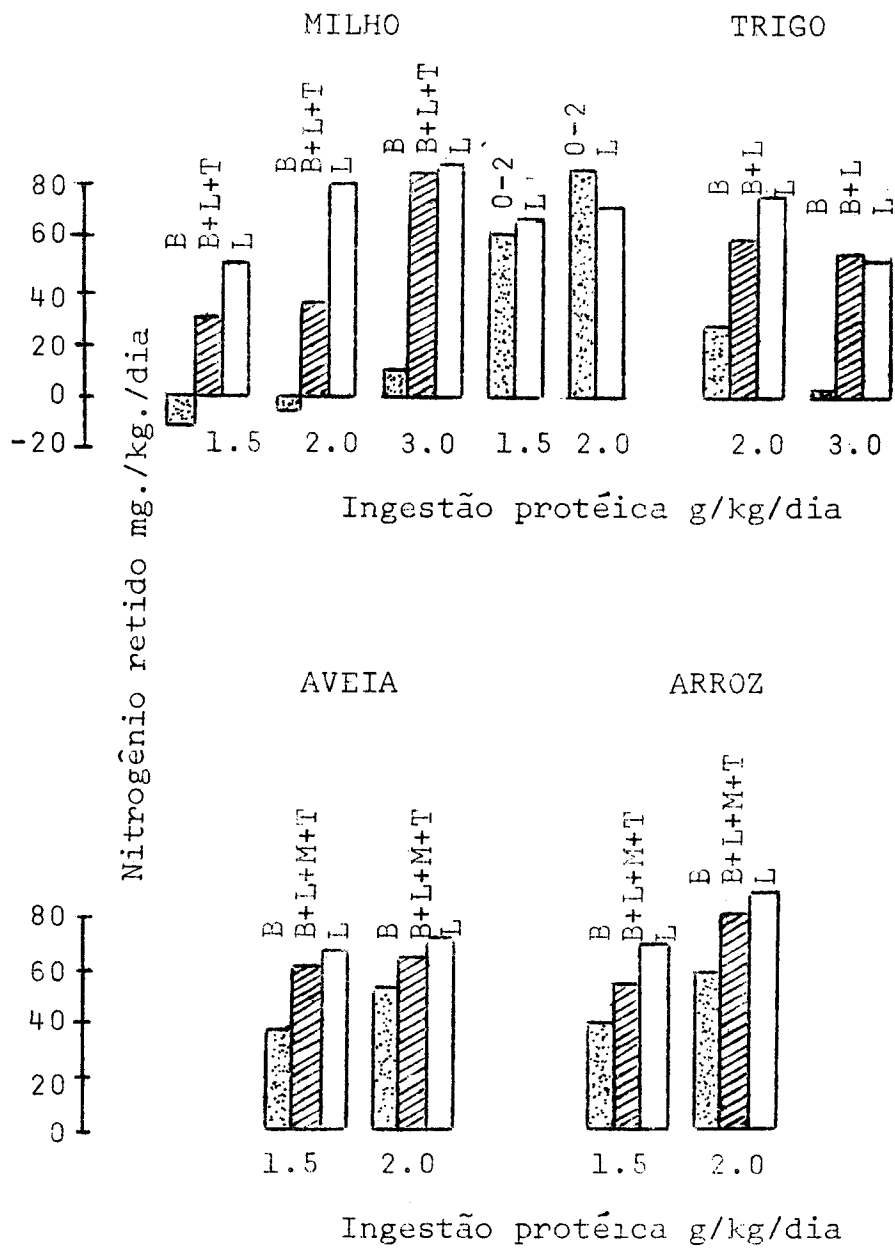


Figura 1 - Retenção de nitrogênio em crianças alimentadas com proteínas de cereais suplementadas com seus aminoácidos limitantes.

Extraído de Gomez (1).

gica da proteína do trigo.

A suplementação da aveia com 0,3% de lisina, 0,3% de metionina, e 0,2% de treonina melhorou notavelmente a retenção de nitrogênio com uma ingestão de 1,5 gr. de proteína/kg. de peso/dia. Os valores obtidos foram ligeiramente inferiores aos do leite, porém, com uma ingestão protéica maior não se obteve uma melhora significativa.

Os dados correspondentes ao arroz assinalam que com a adição de 0,05% de lisina, 0,1% de metionina e 0,08% de treonina, a retenção de nitrogênio melhorou aos dois níveis de ingestão protéica apresentado. Os valores obtidos para o arroz suplementado foram ligeiramente inferiores aos do leite quando a ingestão protéica foi de 2,0 gr. de proteína/kg. de peso/dia.

Em estudos com porcos alimentados com milho suplementados com lisina e triptofânio, a adição de 0,5% de lisina e 0,1% de triptofânio deu um ganho ponderal de 13,4kg no período de 10 semanas, enquanto que porcos que receberam somente milho ao mesmo nível protéico, perderam 0,2 kg. de seu peso original neste mesmo período.

Os trabalhos comentados, demonstraram que a suplementação dos cereais com aminoácidos puros, melhoram notavelmente o valor nutritivo destes alimentos. Embora para a alimentação humana subsistam problemas de caráter prático, como por exemplo, fazer com que estes alimentos enriquecidos cheguem à população e que tenham boa aceitabilidade do ponto de vista organoléptico, sem produzir modificações drásticas em seus hábitos dietéticos e culinários.

c. Possibilidade de produção de aminoácidos por diversos microrganismos

A excreção microbiana de substâncias nitrogenadas foi observada pela primeira vez no século anterior por Thenard, Pasteur, Duclaux e outros, durante seus estudos sobre fermentos (2).

Posteriormente, os estudos deste problema por diversos investigadores contribuíram com detalhes adicionais, especialmente devido ao rápido progresso da cromatografia em papel e outras técnicas de análises bioquímicas. Degley e colab. (2a), estudaram em algumas bactérias, tais como *Escherichia coli* e *Aerobacter aerogenes*. Morton e Broadben (2b) estudaram o mesmo problema usando diversos fungos. Várias espécies de *Streptomyces* (bactérias superiores) foram também estudadas por Corum e colab. (2c), e Perlman e O'Brien (2d). Estes investigadores encontraram substâncias orgânicas nitrogenadas no meio de cultivo, identificadas depois como aminoácidos livres ou peptídeos produzidos e liberados pelas células. Infelizmente, como o objetivo destes estudos, não foram a fermentação com critério de produção industrial, os trabalhos forneceram poucos dados relativos a resultados quantitativos.

Kinoshita (2), desde 1955, em seus estudos quantitativos de formação de aminoácidos por vários microrganismos, encontrou que quase todos são capazes de produzi-los nos meios de cultivo, apesar de que as quantidades de cada aminoácido produzido são em geral, tão pequenas que dificilmente são acusadas pela cromatografia em papel. Em termos gerais se encontrava presente no meio de cultura uma mistura de aminoácidos e só, em casos raros, uma acumulação de um determinado aminoácido em

quantidade suficiente para estimular seu aproveitamento econômico. Os mais comuns, presentes nos meios de cultivo eram o ácido glutâmico, aspártico, alanina, glicina, serina, valina e leucina.

II. MECANISMOS REGULADORES DA PRODUÇÃO DE LISINA

Como se sabe, a produção de metabólitos pelos microrganismos geralmente está controlada por mecanismos reguladores, tais como a retro-inibição ("feedback inhibition") e a repressão enzimática que ocorrem na presença de outros metabólitos, principalmente, dos produtos finais. Conseqüentemente, a quantidade de metabólitos nas células se mantém em determinado nível de concentração. Assim por exemplo, se um aminoácido se produz com velocidade maior que a necessária para a síntese de proteína, o mesmo aminoácido inibe a atividade do primeiro enzima da sequência que preside sua síntese. A síntese dos enzimas da série de reações podem ser posteriormente reprimida, conforme o esquema da figura 2 (3).

Tal mecanismo permite que a célula possa regular seu teor de enzima, em resposta direta à composição do meio. Também, permite uma utilização mais econômica dos nutrientes, já que previne a síntese do excesso de produto final, além do necessário para a síntese de proteína, e também, da quantidade de proteína enzimática supérflua. Portanto, se o que interessa é a superprodução de um determinado metabólito (por exemplo, um aminoácido) utilizando microrganismos, há a necessidade de que estes sejam liberados dos mecanismos reguladores. Sabe-se hoje que estes mecanismos reguladores estão sobre controle genético. Se ocorrer uma mutação, conduzindo à perda ou à modificações nos

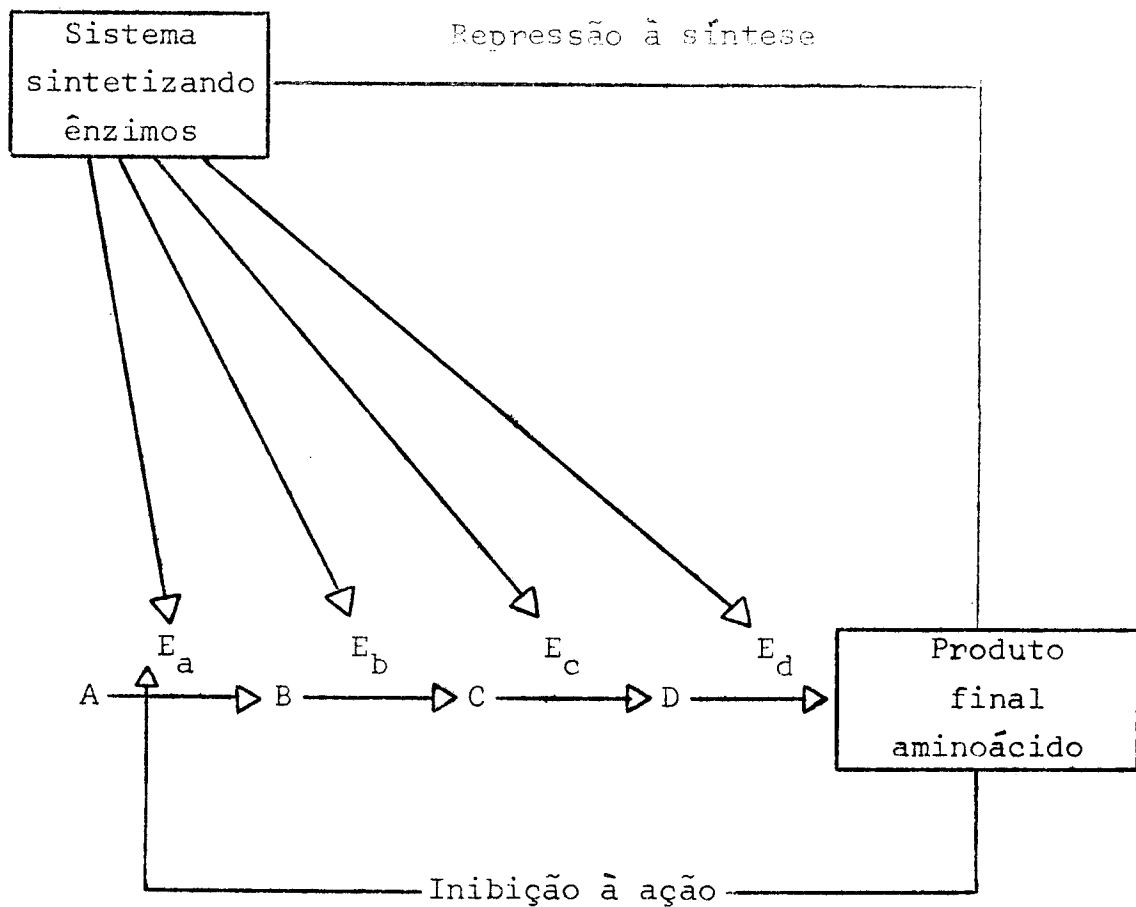


Figura 2 - Sistema para o controle de formação e ação de enzimas induzíveis envolvidos na biossíntese de um aminoácido.

Extraído de Aiba e colab. (3).

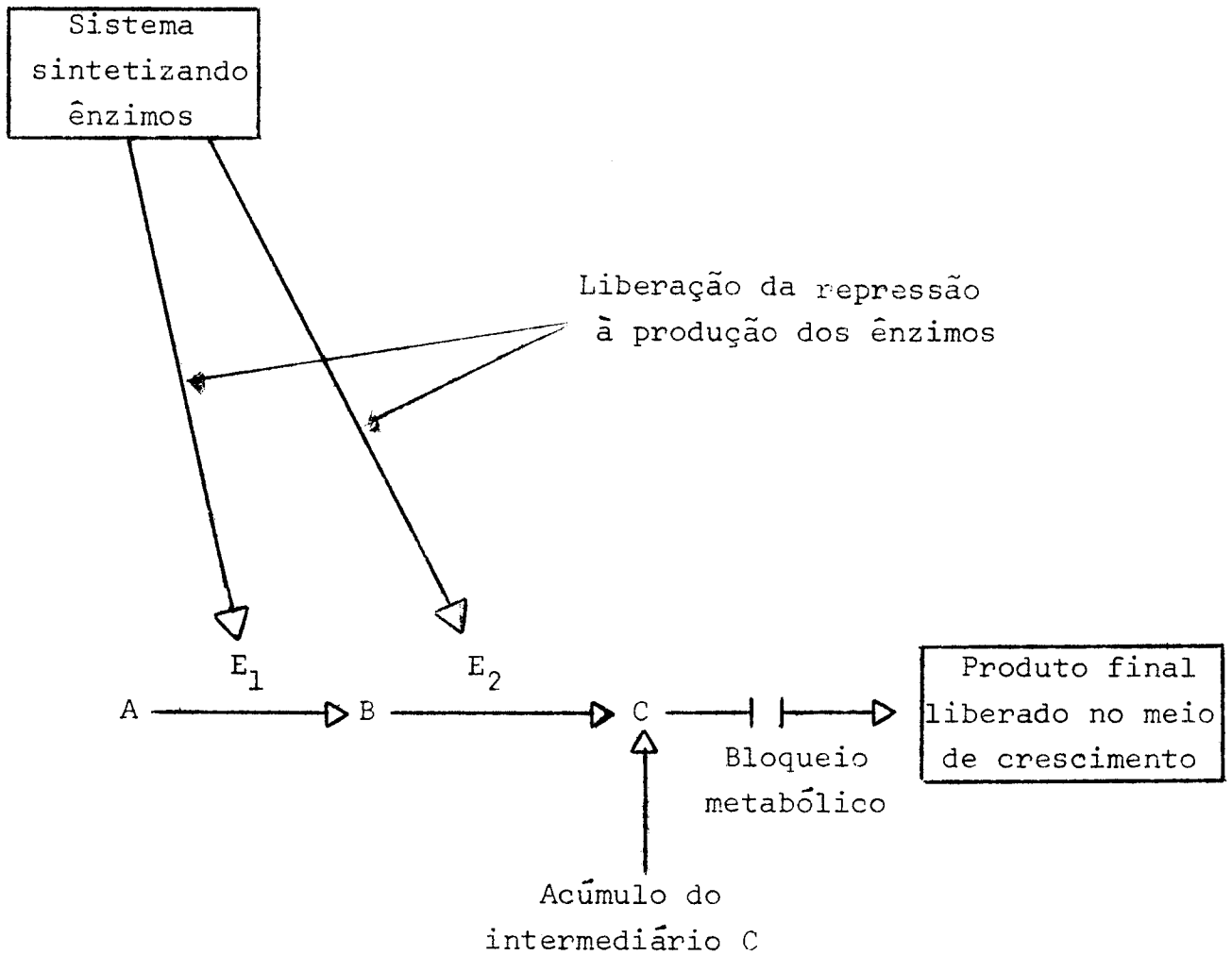


Figura 3 - Diagrama mostrando a liberação dos mecanismos do controle que ocorrem quando uma série de reações biossintéticas é bloqueada e as células são multiplicadas numa concentração limitante do produto final da síntese; isso permite o acúmulo de um intermediário da via. O bloqueio poderia resultar de uma mutação para um enzima deficiente ou poderia ser criado pela adição de um inibidor de enzima às células normais.
 Extraído de Aiba e colab. (3).

genes reguladores, esses mutantes podem ser utilizados industrialmente para permitir o acúmulo de grandes quantidades de um composto, como um aminoácido, que normalmente estaria presente em pequenas quantidades. Um exemplo de tais mutações, é aquela que conduz a formação de auxótrofos. Estes diferem das linhagens selvagens ou prototróficas, por não poderem sintetizar um ou mais fatores de crescimento, devido à perda de enzimas das vias biossintéticas, responsáveis pela formação destes fatores (3).

Tais mutantes, quando se desenvolvem em meio de cultivo com concentrações limitantes de um fator de crescimento, como por exemplo, a homosserina, a condição de carência desta substância libera os microrganismos dos mecanismos reguladores. Portanto, a produção dos precursores da síntese, inicia-se antes que o bloqueio genético comece a entrar em ação. Em outras palavras, a quantidade limitada desses fatores libera os auxótrofos dos mecanismos reguladores uma vez que, as substâncias responsáveis pela repressão ou inibição não são formadas nesses mutantes, permitindo dessa forma a acumulação do produto final da síntese no meio de cultivo (3).

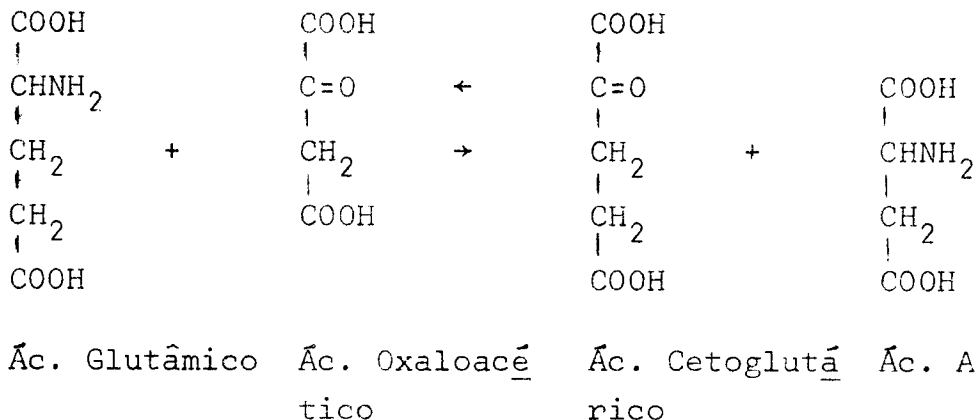
III. BIOSSÍNTESE DA LISINA

A síntese da lisina tem sido estudada sob muitos aspectos e em consequência disto conseguiu-se aclarar as vias biossintéticas. Tais estudos foram muito úteis para o desenvolvimento e compreensão dos processos microbiológicos de produção deste aminoácido em grande escala.

Em bactérias, plantas superiores, algumas algas e fungos, o

esqueleto carbônico deste aminoácido origina-se de piruvato e aspartato, com a formação de ácido α,β -diaminopimélico como produto intermediário. Por outro lado, em outras algas e fungos, o esqueleto carbônico da lisina se origina do acetato e do α -cetoglutarato, com uma sequência de reações nas quais o produto intermediário é o ácido α -aminoadípico(4). Por sua importância, se tratará somente da síntese via diaminopimelato, que é típica das bactérias.

Inicialmente, há uma degradação aeróbica da glicose pelas vias Embden-Meyerhof-Parnas(EMP) e hexose monofosfato (HMP) seguindo o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. O ácido aspártico é inicialmente formado, pela reação de transaminação entre um aminoácido (por exemplo, o ácido glutâmico) e o ácido oxalacético, formado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (4).



Em seguida a quinase do ácido aspártico cataliza a formação de fosfato de β -aspartila, que é, subsequentemente reduzido a aspartato β -semialdeído em uma reação em que toma parte o coenzima NADP. Este produto intermediário também é comum na síntese de treonina e metionina. Segue-se uma condensação entre

o aspartato β -semialdeído e o piruvato, produzindo-se, depois da desidratação, o ácido diidrodipicolínico. A redução desta substância, seguida pela abertura do anel por succinilação, produz o ácido N-succinil- ϵ -ceto-L- α -aminopimélico, que produz, por transaminação, o ácido diaminopimélico correspondente. A desacilação, epimerização e descarboxilação completarão a síntese. Figura 4.

Atualmente, a lisina também é produzida por síntese química, a partir de ϵ -caprolactama. A sequência das reações químicas da síntese é mostrada na figura 5 (5).

IV. FERMENTAÇÃO DA L-LISINA POR FUNGOS E LEVEDURAS

Diversos microrganismos possuem a capacidade de produção e excreção de pequenas quantidades de aminoácidos em um meio com glicose, uréia, e sais minerais. Richard e Haskins (6) cultivaram cerca de seissentas linhagens de fungos para investigar a capacidade de produção de lisina. Só alguns deles produziram apenas 5 a 15 mg. de lisina/lt. de meio.

Dulaney (7) selecionou uma linhagem de *Ustilago maydis* e de *Cliocladium sp.* dos cultivos estudados por Richards e Haskins, para investigar as condições ótimas de produção de lisina em frascos Erlenmeyer com agitação. O cultivo de *Ustilago maydis* que recebeu os maiores estudos produziu 400 mg. de lisina por litro de meio, tendo-se obtido posteriormente rendimentos de 700 a 800 mg./lt.. Os aminoácidos presentes na solução extracelular de *Ustilago maydis* foram determinados, encontrando-se que pelo menos 53% das 1,17 gr. por litro de nitrogênio orgânico extracelular, estava na forma de aminoácidos livres.

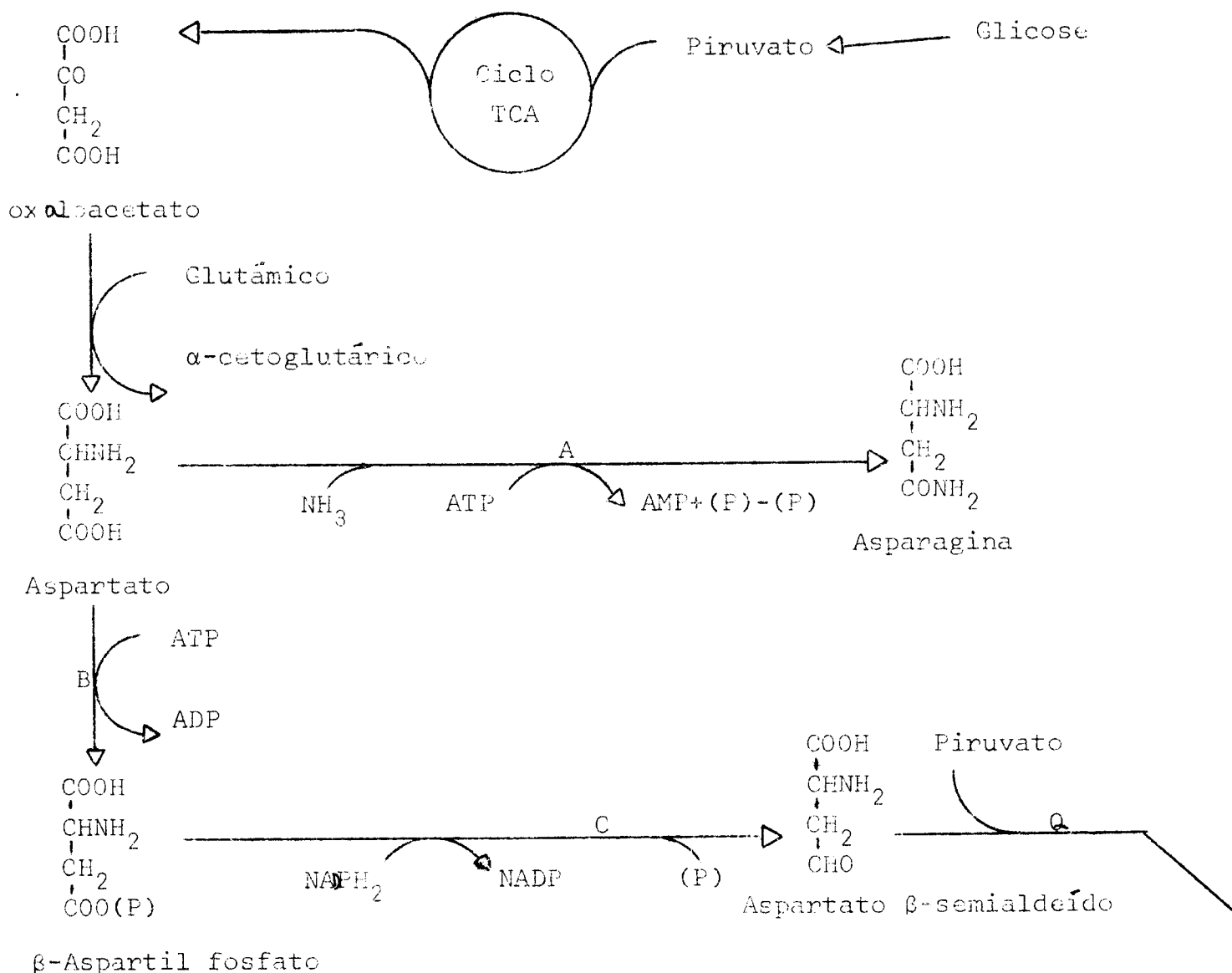
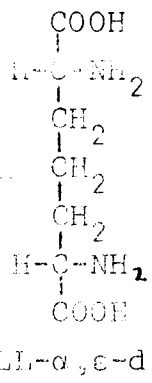
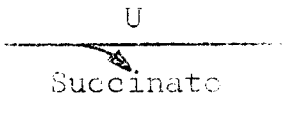
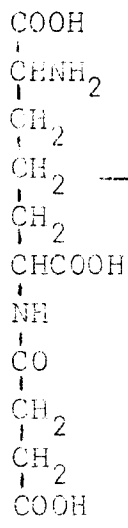
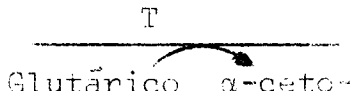
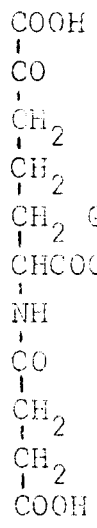


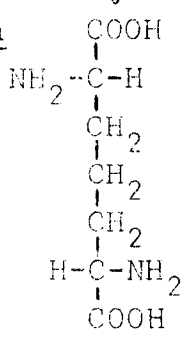
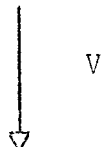
Figura 4 - Biossíntese de L-lisina. Enzimas A, B, C, e Q-W

- A - Sintetase da asparagina
- F - Quinase do ácido aspártico
- C - Desidrogenase do semialdeído aspártico
- Q - Sintetase do ácido dihidrodipicolínico
- R - Redutase do ácido dihidrodipicolínico
- S - Sintetase do ácido succinil-ceto-aminopimélico
- T - Aminotransferase do ácido succinil diaminopimélico
- U - Dessuccinilase do ácido succinil diaminopimélico
- W - Descarboxilase do ácido meso-diaminopimélico

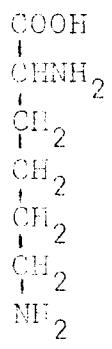
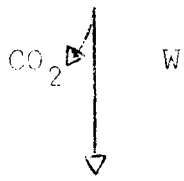
Extradido de Mandelstam (4).



LL- α,ϵ -diaminopimelato



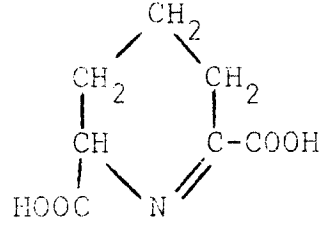
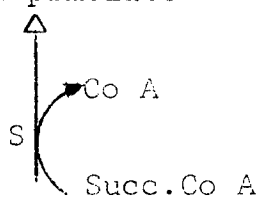
meso- α,ϵ -diaminopimelato



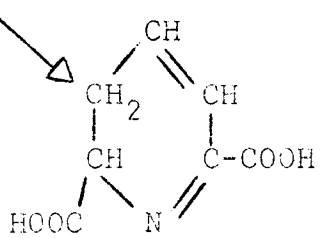
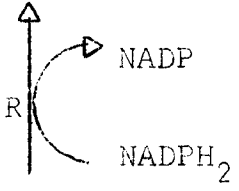
Lisina

N-Succinil- ϵ -ceto-L- α -aminopimelato

N-succinil-LL- α,ϵ -diaminopimelato



Piperideina 2,6-dicarboxilato



Diidrodipicolinato



Posteriormente, trabalhando em fermentadores de 5 litros sob condições ótimas obteve-se um rendimento de 1900 mg./lt. de lisina com *Ustilago maydis* (8).

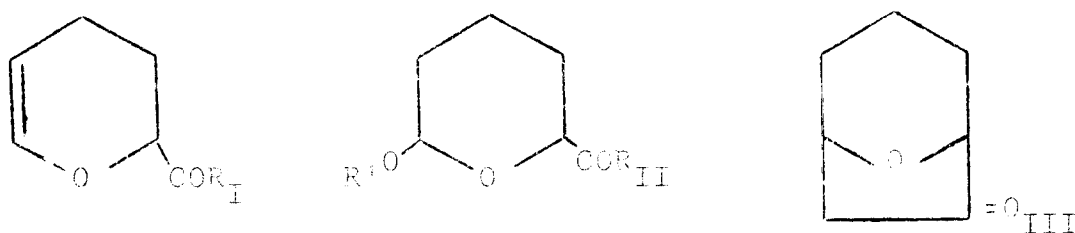
Estudou-se a possível conversão de um certo número de compostos incluindo o ácido α -aminoadípico até lisina, por célula em crescimento e em repouso, não se encontrando evidência de tal conversão. Infelizmente, somente o fluído extracelular, foi examinado e uma possível acumulação intracelular não foi investigada (7).

A conversão microbiológica do ácido 5-formil-2-oxovalérico foi investigada. Linhagens de *Saccharomyces* foram cultivadas em um meio sintético, contendo vários níveis de ácidos 5-formil-2-oxovalérico e incubadas durante 72 horas com agitação e a 24°C. Encontrou-se que a percentagem de conversão em lisina dependia do nível de precursor adicionado e da linhagem de levedura empregada (8).

Na procura de precursores de lisina, se estudaram o ácido α -ceto-adípico e o ácido α -aminoadípico. Estudou-se comparativamente a conversão destes compostos em lisina empregando *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida (Torulopsis) utilis*, em um meio sintético e em um meio complexo contendo licor de milho macerado. O *S. cerevisiae* deu 60% de conversão molar de ácido α -aminoadípico em lisina no meio sintético e 67.5% no meio contendo licor de milho. Obteve-se um rendimento de conversão mais elevado com ácido α -ceto-adípico no meio de solução de milho, que o obtido no meio sintético. Isto se interpretou como sendo devido, talvez, a uma falta de fatores nutritivos que contribuem para a conversão e que se encontraria, só no meio de cultivo com solução de milho (8).

Recentemente, Sanchez (9) empregando um meio com suco de cana de açúcar e um mutante de *Ustilago maydis* conseguiu um rendimento de 2900 mg. de lisina por litro de meio. As condições sob as quais encontrou este rendimento foram: inóculo, 5%; pH, 5,8 ; temperatura, 30°C; tempo de fermentação, 72 horas; e 0,14 mmoles de O₂/litro/min. nos fermentadores. Encontrou que a adição simultânea ou independente de MgSO₄, MnCl₂, NaCl, CaCl₂ não afetam a produção de L-lisina.

A L-lisina pode ser produzida aerobicamente por cultivo de uma levedura (assim por exemplo, dos gêneros *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Lyphomyces*, *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula*), em um meio líquido contendo uma fonte de carbono, os sais minerais usuais e um ou mais fatores de crescimento (por exemplo, extrato de levedura) com 10⁻⁵ a 10⁻¹ moles/litro de um dos precursores (I-III). Em I, R pode ser OH, OM (M representa um metal, preferivelmente do grupo I ou II), alquil, aril, cicloalquil, aralquil, alquenil, ou NH₂. Em II, R pode ser OH, alquil, aril, cicloalquil, aralquil, alquenil, e R' pode ser H ou um radical de hidrocarboneto monovalente, tal como um alquil, aril, cicloalquil, ou alquenil (11).



Atualmente, para produzir lisina em escala comercial, se conduzem processos que empregam bactérias como agentes de transformação, tema que será tratado nos parágrafos seguintes.

V. FERMENTAÇÃO DA L-LISINA POR BACTÉRIAS

Comercialmente, é possível produzir lisina por fermentação mediante dois processos distintos. Em um deles (12), a produção ocorre em duas etapas. Na primeira se utiliza um mutante de *Escherichia coli* que é incapaz de converter o ácido diaminopimélico em lisina, quando se desenvolve em meio de cultivo, no qual, esse aminoácido, é um fator limitante do crescimento. Em tais condições, se acumula no meio quantidades de ácido diaminopimélico, devido a liberação da repressão na formação do enzimo que governa a síntese do ácido diaminopimélico. Este é um exemplo da exploração comercial de reações fundamentais que conduzem ao controle da biossíntese celular pela concentração de produto final. Figura 6.

Em uma segunda etapa do processo, outro microrganismo, que não exige lisina para o crescimento, como o *Aerobacter aerogenes*, possui um enzimo, descarboxilase do ácido diaminopimélico, qual é capaz de converter este ácido em lisina.

Um dos meios empregados para a formação de ácido diaminopimélico consiste, segundo Casida (12), em 4,9% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 4,0% de milho macerado ("Corn steep liquor"), 6,0% de glicerol e 0,5% de CaCO_3 . O pH deve ser ajustado a 7,0, e o meio imediatamente esterilizado. Usa-se de 1 a 5% de inóculo e se incuba a 28°C com agitação e aeração (um volume de ar por volume de meio por minuto). Após tres dias o rendimento foi de 9mg./ml.

Para a conversão do ácido diaminopimélico, o *A. aerogenes* pode ser cultivado no mesmo meio que se emprega para o inóculo de *E. coli*. Depois da propagação, as células são separadas do

Esqueleto de carboidrato

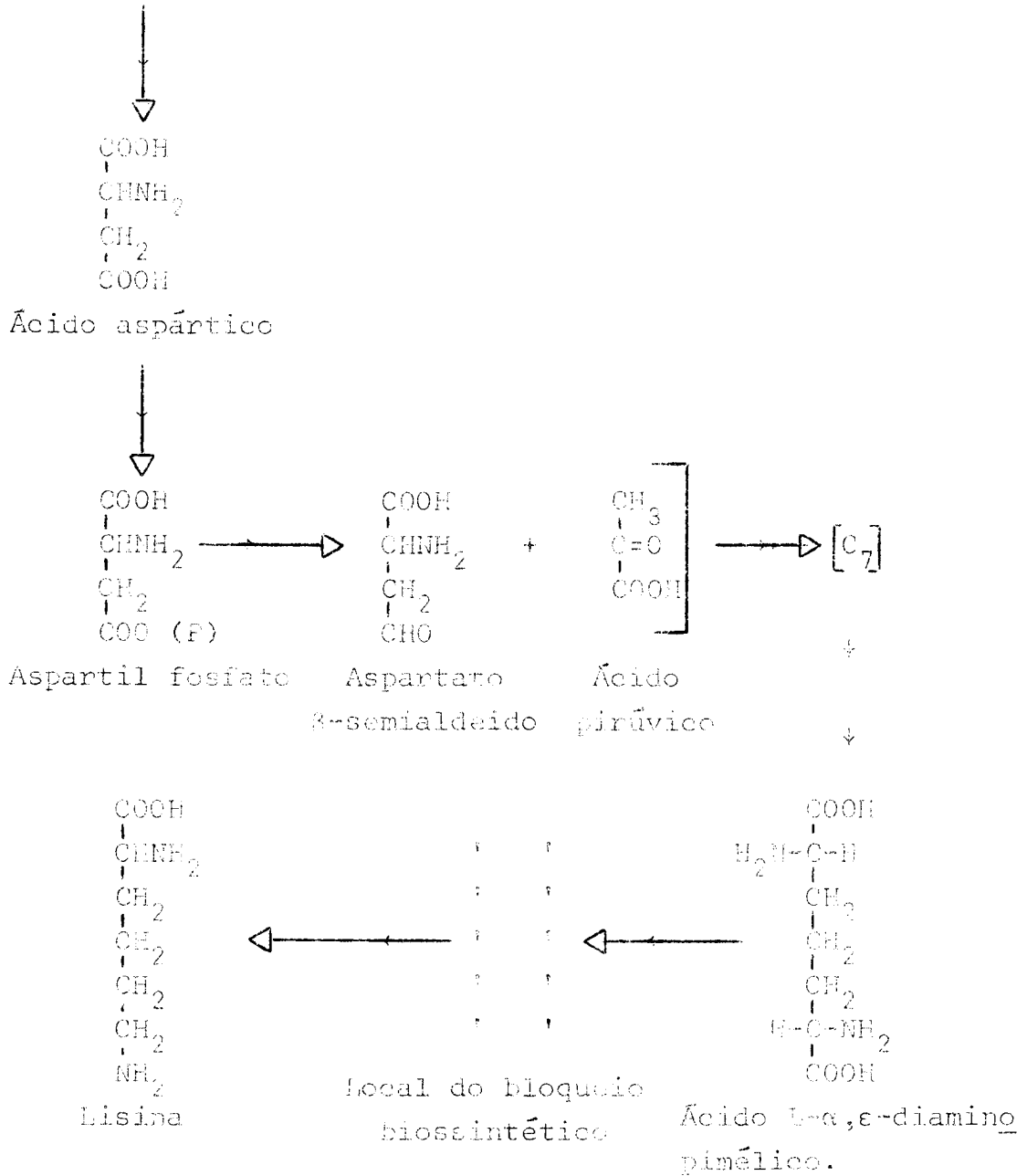


Figura 6-- Reações para mostrar a acumulação de ácido diamino pimélico com um mutante de *E. coli*, incapaz de sintetizar lisina. Quando o meio contém quantidades de lisina que limitam o crescimento, a repressão à formação dos enzimas dessa sequência é liberada, resultando em alta produção de ácido diaminopimélico.

Extraído de Aiba e colab. (3).

meio por centrifugação. Em geral, a conversão do ácido diaminopimélico em lisina se produz a uma temperatura de 24-25°C , aproximadamente. Depois da transformação, o líquido é filtrado e a lisina é adsorvida em uma forte resina de troca iônica, como a Amberlite IR-120, em seguida, é eluída em alcali diluído, passando logo após através de uma resina fraca de troca iônica, como a Amberlite IRC-50.

Uma modificação do processo descrito, foi feita por Kita e Huang. Se baseia na descoberta de que o auxótrofo de E. coli utilizado para produzir o ácido diaminopimélico continha também em suas células a descarboxilase do ácido diaminopimélico (3).

Atualmente, a lisina vem sendo produzida no Japão, Estados Unidos e França, por um processo fermentativo de uma única etapa que emprega um mutante auxotrófico de Micrococcus glutamicus, o que requer homosserina e biotina para o crescimento. A produção de lisina difere da produção de ácido glutâmico pelo fato de que, em um meio rico em biotina se produz uma apreciável acumulação de L-lisina.

A figura 7 é um gráfico da mobilização dos componentes em um processo de produção de lisina por fermentação com M. glutamicus.

Os fatores mais importantes que influem no rendimento de lisina são: a concentração dos aminoácidos exigidos e a presença de biotina no meio. Para essa linhagem, se consegue um rendimento elevado com um meio rico em biotina e com suprimento de homosserina. As quantidades de metionina, homosserina e treonina são críticas para a produção de lisina. Se a concentração

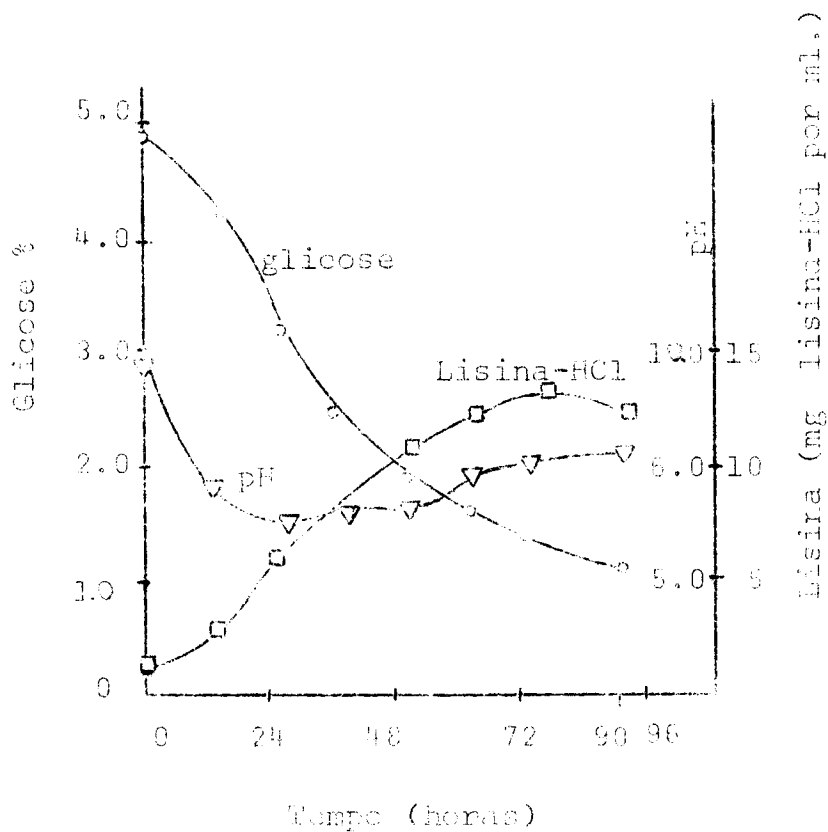


Figura 7 - Mudanças químicas na fermentação de lisina.

Microrganismos: *M. glutamicus* 513-1 (carente de homosserina).

Composição do meio (%) - Glicose, 5,0; NH_4Cl , 0,4; K_2HPO_4 , 0,05; K_2HPO_4 , 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,025; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,001; extrato de levedura, 0,1; CaCO_3 , 0,5.

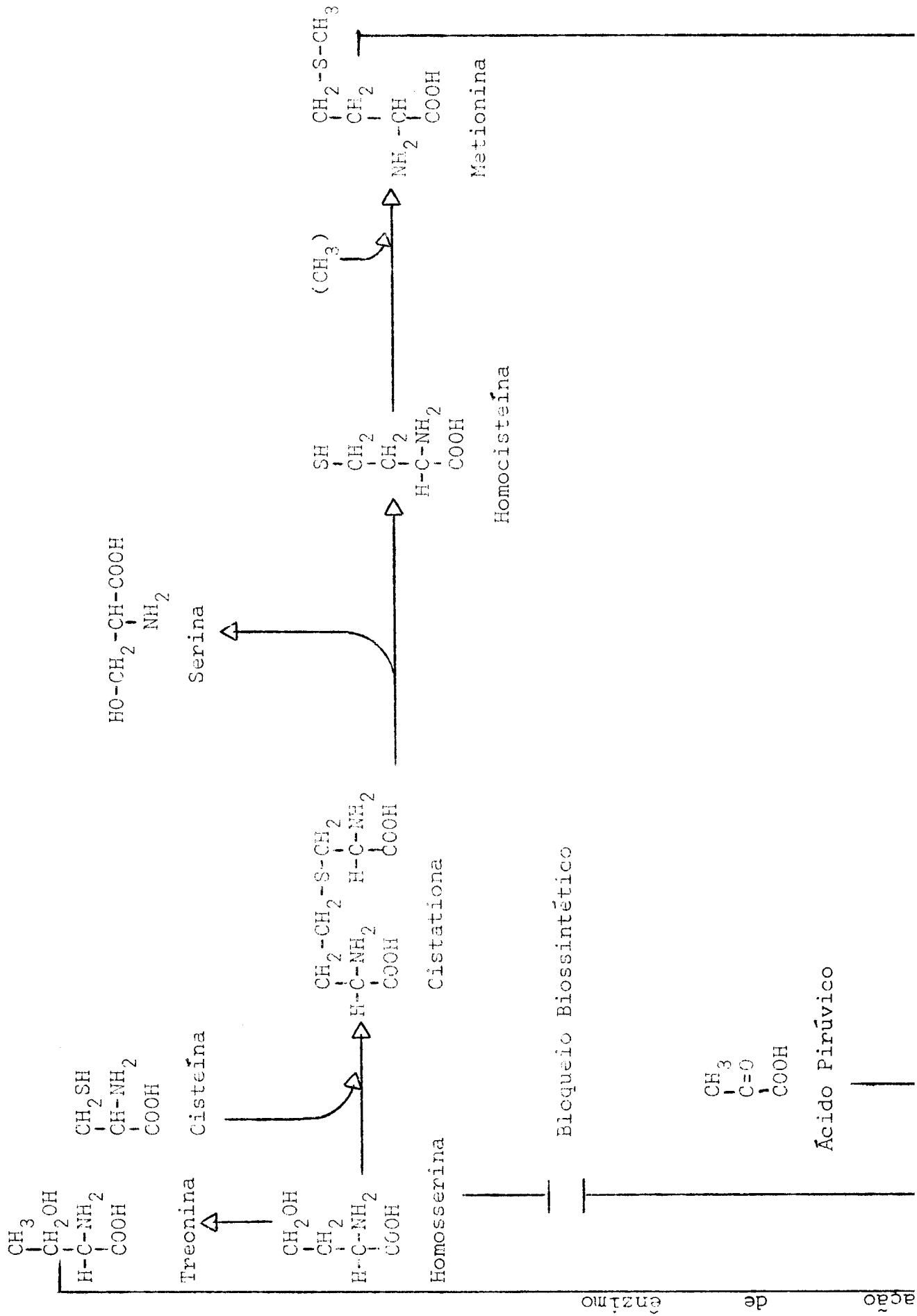
Temperatura: 28°C

Extraído de Kinoshita (2).

desses aminoácidos for muito baixa, o crescimento pode ser bastante estimulado, porém, com uma queda acentuada no rendimento em lisina.

A sequência das reações que conduzem a acumulação de lisina está condensada na figura 8, em que se observa os principais "pontos" dos mecanismos reguladores exercidos pela ação dos produtos finais da biossíntese. Assim, quando a metionina está presente em um excesso em relação às necessidades imediatas para o crescimento, há uma repressão da formação de enzimas que convertem o ácido aspártico em aspartato β -semialdeído. Isto por sua vez, reduz a quantidade de carboidratos a ser transformado em lisina via ácido aspártico. Possivelmente a treonina, reage também provocando inibição da quinase aspártica bem como da desidrogenase do semialdeído aspártico. O efeito do excesso de treonina na formação da lisina também é semelhante ao efeito do excesso de metionina. Da mesma forma, quando a homoserina é adicionada em excesso, os mecanismos retrorreguladores, tanto por inibição como por repressão, ou ambos, também reduzem a quantidade de lisina formada. Quando todos estes aminoácidos estão presentes em baixas concentrações, a síntese de enzimas não é reprimida e a atividade não é inibida e, portanto, o ácido aspártico é convertido em aspartato β -semialdeído. Uma vez que este mutante auxotrófico não pode converter esse produto em homoserina, já que lhe falta o enzimo necessário, a sequência de reações prossegue via formação de lisina.

Tal sistema de produção em que se emprega mutantes auxotróficos, fortemente dependente da concentração dos componentes do meio, torna este processo teoricamente ideal para a produção em cultura contínua. Neste processo, o meio que alimenta o



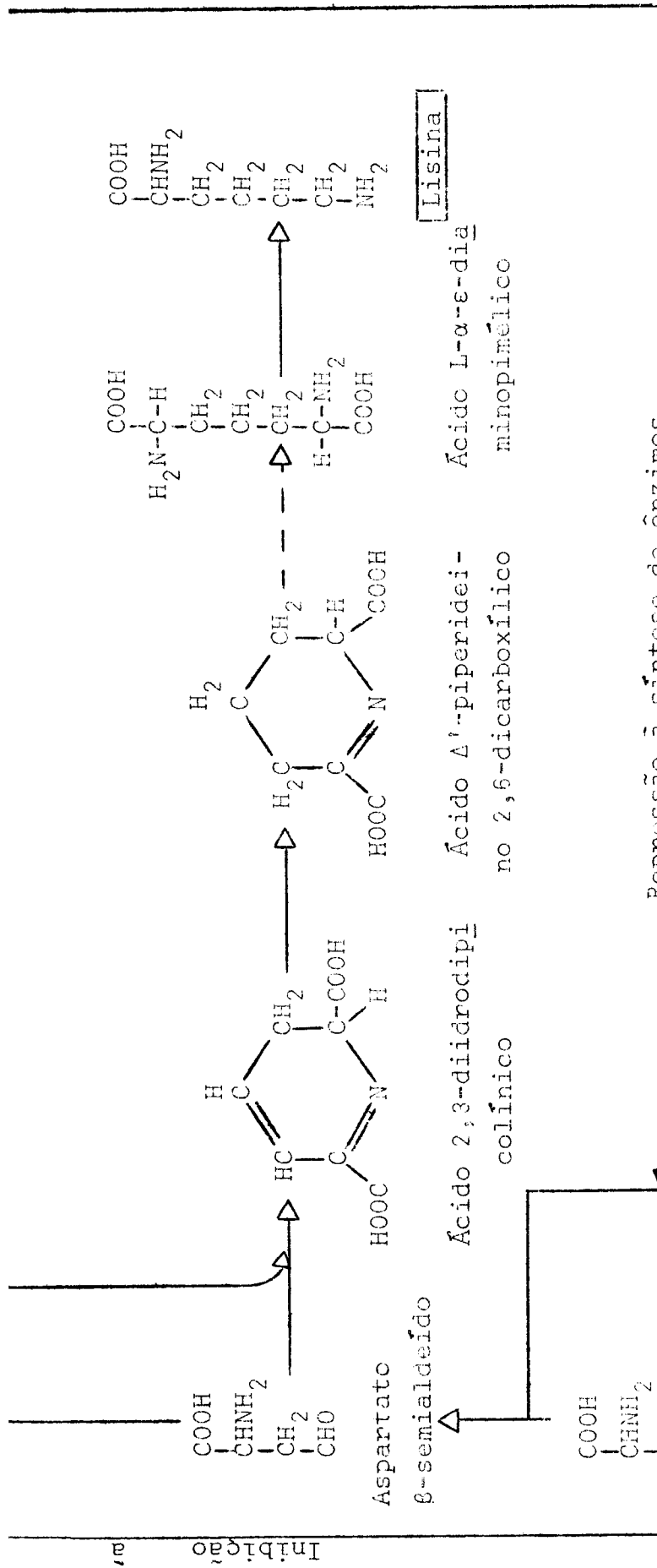


Figura 8 - Biossíntese da lisina, treonina e metionina num mutante de *Morococcus glutamicus* requerendo homoserina e biotina. Metionina e treonina em excesso, impulsionam os mecanismos de autocorreção ("feedback") que diminuem a conversão de carboidrato em lisina.

Extraído de Aiba e colab. (3).

fermentador pode ser formulado de tal maneira, que os microrganismos nunca estejam expostos a grande quantidade dos produtos controladores da síntese dos aminoácidos. Isto permite que as células microbianas possam conter uma quantidade máxima de enzimas responsáveis pelas sínteses e que além disso, essas enzimas não sejam inibidos pelo produto final.

Recentemente, Sano e Shilo (14) obtiveram mutantes auxotróficos de *Brevibacterium flavum*, elaboradores de lisina, mediante o emprego de raios X e um composto químico, o N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NG), como agentes mutagênicos.

Utilizou-se a técnica da réplica e o método auxonográfico tanto para isolar como para caracterizar estes mutantes, para diversos aminoácidos. Assim, se identificaram auxótrofos para a homoserina, treonina, metionina e isoleucina. Sua distribuição está representada no quadro 1.

Afim de verificar a capacidade de produção de aminoácido, as linhagens foram cultivadas em um meio de cultura com glicose, sais minerais, biotina e os aminoácidos exigidos. Depois de cultivar com agitação por 72 horas, a 30°C, os aminoácidos acumulados foram determinados pelos métodos colorimétricos e microbiológicos. A figura 9 e o quadro 2, mostram a capacidade de produção de lisina e de outros aminoácidos pelos mutantes auxotróficos obtido por estes autores.

Como se observa, a capacidade de produção de lisina pelos mutantes auxotróficos para a homoserina, foi bastante grande. Os autores assinalaram que para o caso de auxótrofos, a metionina poderia incluir mutantes bloqueados em quatro etapas



Quadro 1 - Isolamento de auxótrofos de *Streptococcus flavus* nº 2247

| nº Experimentos | Mutagene a | Linhagem parental b | nº de co- lônias testadas | nº de auxótrofos surgidos | | | | |
|-----------------|---------------|------------------------|---------------------------------|------------------------------|------|-----|------|----------|
| | | | | hsc- | met- | tr- | ile- | tr-,met- |
| 1 | raio-X | 2247 | 33.400 | 1 | 5 | 8 | - | - |
| 2 | " | " | 19.800 | 2 | 4 | 3 | - | - |
| 3 | NG | " | 15.000 | 5 | 22 | 14 | 16 | - |
| 4 | " | " | 2.100 | 1 | 3 | 19 | - | - |
| 5 | " | " | 15.000 | - | 11 | 7 | - | - |
| 6 | " | T-36 (tr-) | 9.400 | - | - | - | - | 11 |

a-Dose de raio-X no ensaio 1 foi de 144.000 R e no ensaio 2, 9.600. NG significa N-metil-N-nitro-N'-nitrosoguanidina. A dose empregada foi de 200 mg/ml. no meio, durante 30 minutos, sob agitação a 30°C.

b-T-36 foi o melhor produtor de L-lisina nos auxótrofos de treonina obtidos e carentes de atividade de quinase da homoserina.

Extraído de Sano e Shilo (14).

diferentes (figura 8). O exame auxonográfico revelou, que 6 mutantes são exigentes cistationa, isto é, responde a DL-cistationa, DL-homocisteína, e L-metionina; nenhum dos mutantes é exigente a homocisteína, isto é, respondendo a adição de DL-homocisteína e L-metionina, e 36 mutantes são exigentes metionina, ou seja, respondiam apenas a metionina. Todos os mutantes para a metionina, produziam um pouco mais de lisina que a linhagem selvagem. Como valor médio, a produção foi de 3 gr./lt.. Posterior omissão da L-treonina no meio, não produziu nenhum efeito e aumento da produção de lisina. Além disso, os quinze mutantes auxotróficos para a isoleucina acumularam pequenas quantidades de aminoácidos (inclusive lisina) no meio de cultivo complementados com 200 mg./lt. de isoleucina. Por outro lado, os auxótrofos para a homosserina e treonina produziram bastante lisina no meio. Destes últimos, quase a metade produziram quantidades apreciáveis de lisina em uma média de 17 gr./lt.(figura 9). A capacidade produtora das outras linhagens é desprezível.

O primeiro grupo (B), também apresenta melhor capacidade de produzir outros aminoácidos, que os membros do grupo A. Todos os auxótrofos pertencentes ao grupo A, exceto dois mutantes que produziram quantidades apreciáveis de glicina, não produzem nenhum outro aminoácido. Estes resultados, levaram os autores a julgar que a capacidade de produzir lisina por mutantes auxotróficos para a treonina, está relacionada com o bloqueio genético na via biossintética. Para determinar o ponto de bloqueio, Shio e Sano (15) estudaram as atividades enzimáticas de dez mutantes para a treonina, cuja capacidade de produzir lisina variava de acordo com o grupo a que pertenciam. Os enzimas estudados foram: quinase da homosserina e sintetase da treonina, que estavam relacionados com a formação de

Quadro 2 - Produção de aminoácidos por vários auxótrofos de *Brevibacterium flavum* nº 2247.

| Caráter | Nº mutantes | Linhagem típica | Quantidade de produtos (g/litro) | | | | | |
|----------------------|----------------|--------------------|----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | | L-lisina HC | L- Hsc. | L- Gli. | L- Pro. | L- Ala. | L- Val. |
| tr-(A ₁) | 16 | T-15 | 1,4 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,5 |
| tr-(A ₂) | 2 | T-28 | 1,7 | 0,0 | 3,9 | 0,0 | 0,7 | 1,9 |
| tr-(B) | 24 | T-36 | 20,4 | 11,6 | 0,4 | 0,9 | 0,5 | 1,6 |
| Homoss. | 7 | H-1013 | 42,6 | 0,0 | 0,4 | 0,0 | 0,0 | 1,6 |
| tr-,met- | 11 | TM-15 | 20,4 | 10,6 | 0,2 | 0,4 | 0,5 | 1,4 |
| met- | 42 | M-78 | 1,6 | 0,0 | 0,5 | 0,0 | 1,0 | 2,1 |
| Selvagem | 1 | 2247 | 0,1 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,1 | 2,1 |

Extraído de Sano e Shio (14).

Produção de L-lisina por Auxótrofos

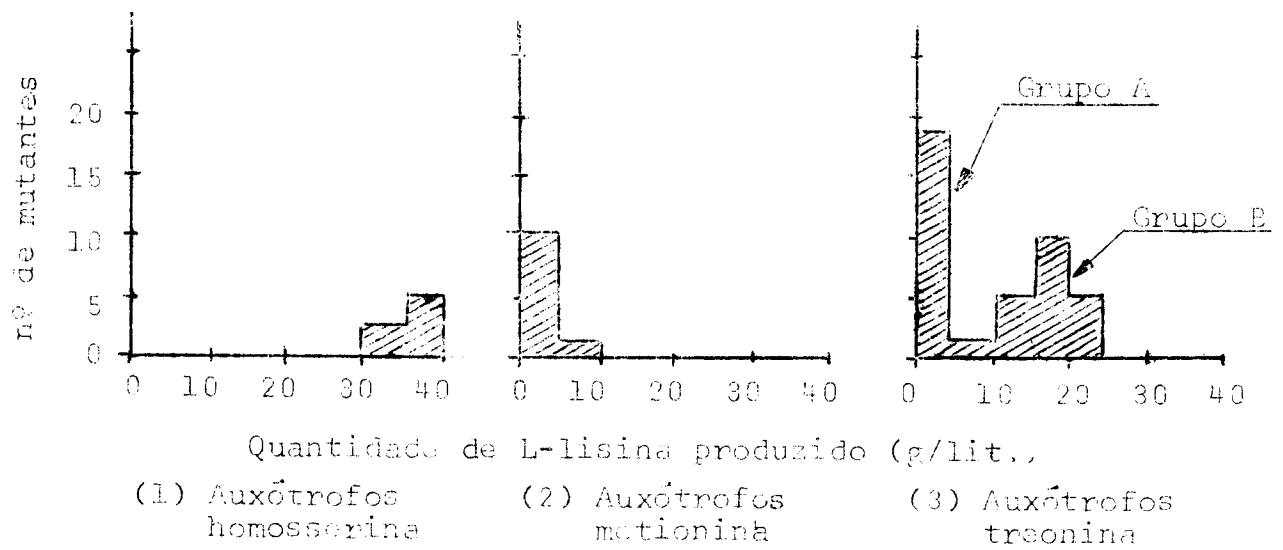
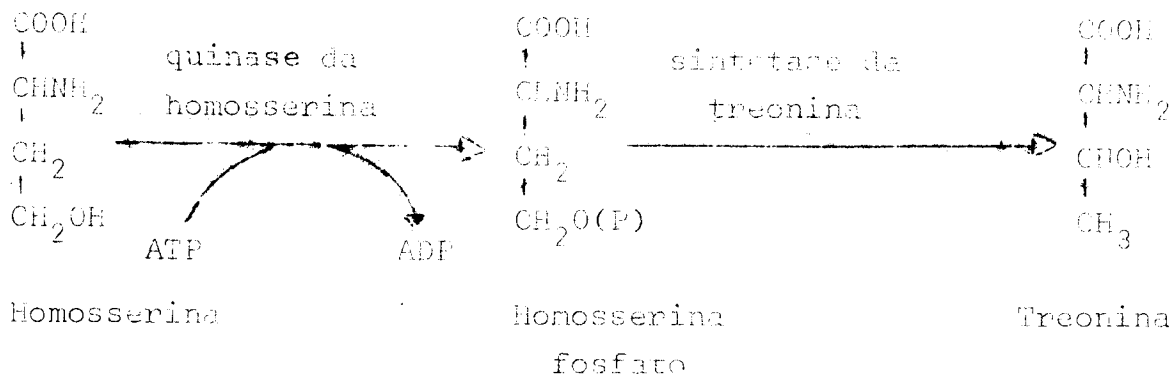


Figura 9 - Modelo de desvio da habilidade de produção de L-lisina por vários auxótrofos

Extraído de Sans e Shim (14)

treonina, já que catalizam as seguintes reações:



Os resultados revelaram que todos os auxótrofos para a treonina não possuem a quinase da homoserina ou a sintetase da treonina. Os primeiros são elaboradores de lisina (grupo B), enquanto que os segundos (grupo A), acumulam pequenas quantidades de lisina no meio.

Poder-se-ia esperar que os auxótrofos para a treonina sem a síntese de treonina, produzissem fosfato de homoserina, da mesma forma que os auxótrofos para a treonina que perderam a quinase da homoserina produzem L-homoserina, que é o substrato para a quinase da homoserina. A acumulação de homoserina fosfato no meio, serviria para comprovar que o bloqueio genético se produz no ponto da sequência onde se verifica a ausência de sintetase da treonina. De fato, o teor de fosfato de homoserina nas células varia para os dois grupos de mutantes. Para um deles, o teor é bem baixo, cerca de 1 umol/gr. de células, enquanto que para o outro, a média é de 80 umol/gr. de célula. Neste segundo grupo, o bloqueio genético estaria ao nível de sintetase da treonina, fazendo com

que esse mutante contivesse maior teor de fosfato de homoserina. Além disso, não foi detectado fosfato de homoserina no tipo selvagem e nos auxótrofos para a homoserina e metionina. O teor de fosfato de homoserina também foi maior no caldo (mosto) dos cultivos dos auxótrofos para a treonina, que perdeu a atividade da cintetase da treonina.

Os autores explicam que a baixa produção de lisina por esses mutantes, apesar das condições de deficiência da treonina, pode ser atribuída ao efeito do fosfato de homoserina.

Estes trabalhos mostram que entre os auxótrofos de *Brevibacterium flavum* obtidos, os mutantes para a homoserina, são os melhores produtores de lisina. Os resultados foram semelhantes aos auxótrofos de homoserina de *Micrococcus glutamicus*. Viriam em seguida, os mutantes para a treonina que perderam a atividade da quinase da homoserina. Este último também está acompanhado pela produção de homoserina, e deca que, a quantidade total de lisina e homoserina é praticamente a mesma nos dois auxótrofos, isto indicaria que a atividade da quinase do ácido aspártico é semelhante nestes dois mutantes.

Igualmente como no *M. glutamicus*, a quinase do ácido aspártico reage na primeira etapa da biossíntese da L-lisina, L-treonina e L-metionina, e recebe uma retroinibição pela L-treonina mais a L-lisina. Se a quinase do ácido aspártico fosse geneticamente alterada para tornar-se resistente à retroinibição pela treonina e lisina, a biossíntese da lisina não seria afetada pela treonina e, portanto, se produziria grandes quantidades de lisina, independentemente da concentração de treonina.

Os mesmos autores, Sano e Shio (16) obtiveram um mutante de *B. flavum* resistente ao S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), que é um aminoácido análogo à L-lisina, e que acumulava grandes quantidades de lisina, mesmo em presença de consideráveis teores de treonina. O melhor desses mutantes produzem cerca de 32 gr. de lisina a partir de 100 gr. de glicose. O fato de que a adição de treonina aumentou o efeito inibidor de AEC na linhagem selvagem, também sugeriu que a mutação provocava a inibição da quinase do ácido aspártico neste mutante.

Posteriormente, em outro trabalho, Sano e Shio (17) conseguiram mutantes sensíveis a baixas concentrações de treonina ou metionina, derivados de *B. flavum* nº 2247 (ATCC 14007) aplicando o método da réplica e com a adição do composto N-metil-N-nitro-N'-nitrosoguanidina. De desenove mil colônias empregadas, obtiveram 93 mutantes (quadro 3) e que foram divididos em 6 tipos: tipo 1 (14 linhagens), tipo 2 (21 linhagens), tipo 3 (2 linhagens), tipo 4 (11 linhagens), tipo 5 (19 linhagens), e tipo 6 (26 linhagens).

A habilidade de produção de lisina destes seis grupos de mutantes foi estimada pelo cultivo num meio que continha:

100 gr. de glicose, 40 gr. de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 gr. de KH_2PO_4 , 0,4 gr. de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg. de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7 mg. de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 300 ug. de biotina, 200 ug. de tiamina.HCl, 2 ml. de uma mistura de aminoácidos, 50 gr. de CaCO_3 , e 1000 ml. de água destilada; a uma temperatura de 30°C, durante 72 horas. Os resultados aparecem na figura 10. Cinco tipos produziram um máximo de 5 gr. de lisina/lt.. Exceto o tipo 1 que produziu 17,2 gr./lt.. No tipo 1, que é sensível à deficiência de treonina e metionina, seu crescimento é restaurado pela coexistência desses dois aminoácidos.

Quadro 3 - Método de seleção de mutantes sensíveis a treonina ou metionina

O símbolo + , significa crescimento positivo

O símbolo - , significa crescimento negativo

Abreviações:

T^S = sensível a treonina

M^S = " " metionina

thr⁻ = auxótrofo de treonina

met⁻ = " " metionina

hse⁻ = " " homoserina

Resposta ao crescimento no meio

| Caráter | A | B-1 | B-1 | B-1 | B-1 | tipo (a) | auxótrofos surgidos (b) |
|--------------------------------|---|-----|-----------------------|------------------------|-----------------------|----------|-------------------------|
| | | | L-treonina (lmg./ml.) | L-metionina (lmg./ml.) | L-treonina (lmg./ml.) | | |
| T ^S .M ^S | + | + | - | - | + | 1 | 14 |
| " | + | + | - | - | - | 2 | 21 |
| T ^S | + | + | - | + | + | 3 | 2 |
| " | + | + | - | + | - | 4 | 11 |
| M ^S | + | + | + | - | + | 5 | 19 |
| " | + | + | + | - | - | 6 | 26 |
| thr ⁻ | + | - | + | - | + | | |
| met ⁻ | + | - | - | + | + | | |
| hse ⁻ | + | - | - | - | + | | |
| Selvagem | + | + | + | + | + | | |

(a) - Os mutantes sensíveis a treonina ou metionina são divididos em seis tipos de acordo com sua resposta ao crescimento

(b) - Número de colônias testadas: 19.000

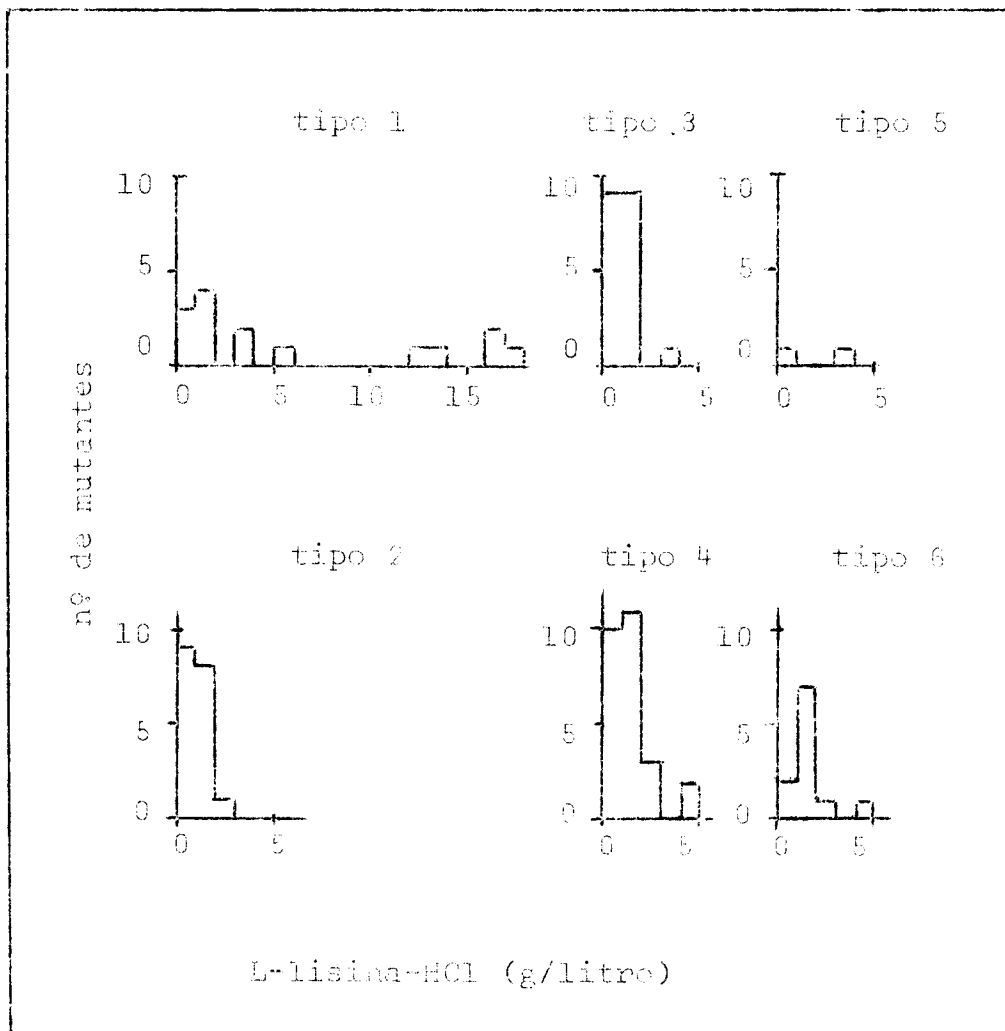


Figura 10 - Produção de lisina por mutantes sensíveis à treoni_n na e/ou metionina.

Extraído de: Sano e Shio (17).

Novos mutantes auxotróficos de treonina foram obtidos de mu tantes sensíveis a treonina e metionina (que são bons produtores de lisina); dos quais 29 auxótrofos de treonina foram seleccionados pelo método da réplica e cultivados durante 72 horas em um meio contendo: 100 gr. de glicose, 40 gr. de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 gr. de KH_2PO_4 , 0,4 gr. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg. de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7 mg. de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 300 ug de biotina, 200 ug de tiamina.HCl, 2 ml. de uma mistura de aminoácidos, 600 mg. de L-treonina, 200 mg. de L-metionina, 50 gr. de CaCO_3 e 1000 ml. de água destilada. A acumulação de L-lisina está representada na figura 11, na qual se observa que a máxima quantidade de L-lisina acumulada foi de 35,0 gr./lt.; enquanto que a linhagem original só produziu 25,4 gr./lt.

Investigações recentes informam que, com uma composição ótima do meio, aeração e cultivando *Brevibacterium* 22, o rendimento obtido em lisina é de 38-40 gr./lt. depois de 60 horas de fermentação. Porém, quando pequenas doses de penicilina (2 a 4 U.I. por mililitro) são adicionadas durante as primeiras etapas de fermentação (4-5 horas depois de iniciada a fermentação), a habilidade biossintética do cultivo deriva para a produção de ácido glutâmico, dando uma produção de aproximadamente 30 gr./lt., depois de 20-30 horas de fermentação. Parece que a penicilina, não somente é capaz de alterar a permeabilidade da membrana celular, mas também, inibiria o sistema enzimático que participa na síntese da lisina (18).

Também, a lisina foi obtida cultivando linhagens de mu tantes de *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 21254, 21255, 21299 ou 21300) sob condições aeróbicas, em um meio nutritivo aquoso contendo homoserina ou treonina, metionina ou treonina

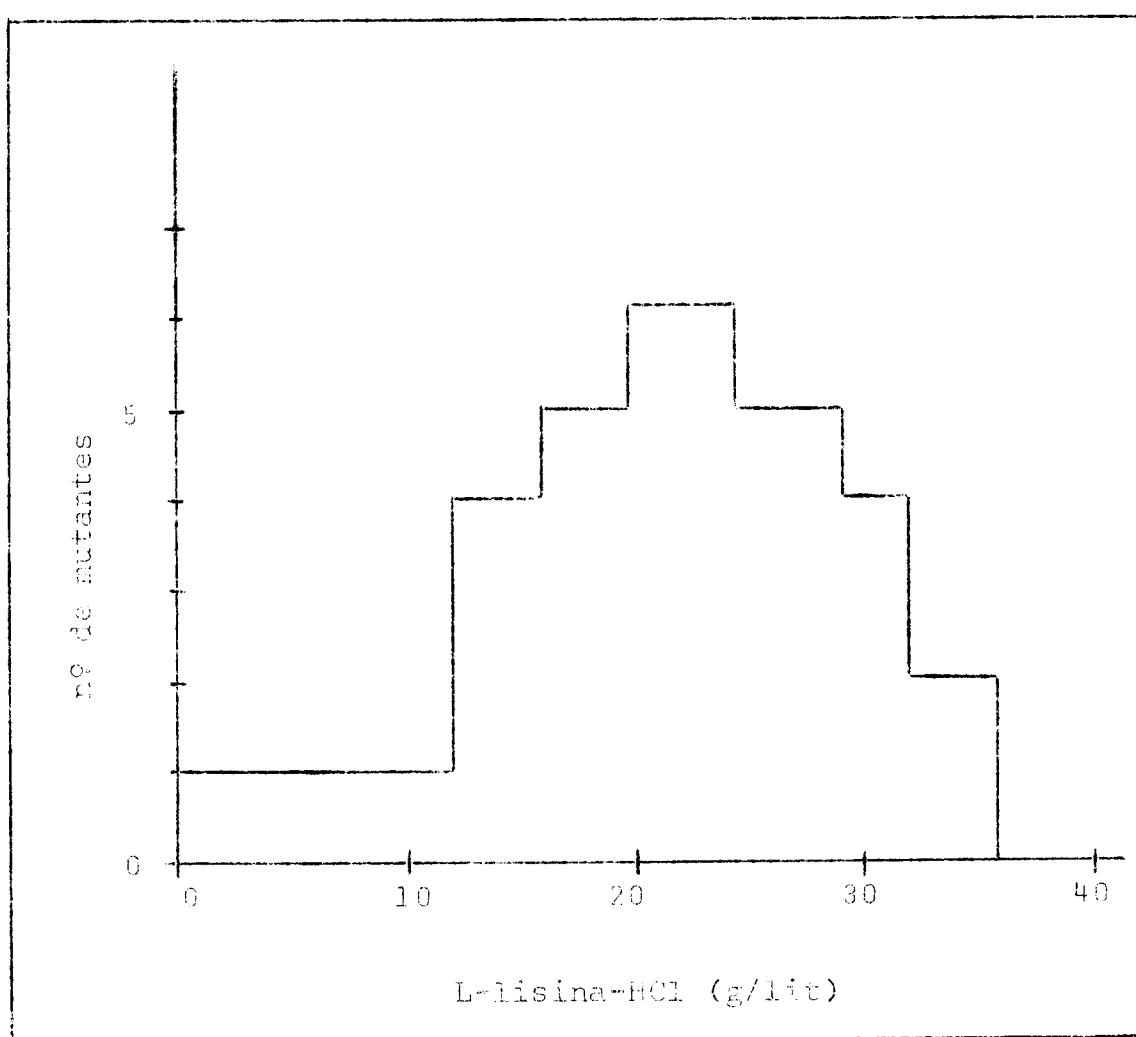


Figura 11 - Produção de lisina por auxótrofos de treonina, derivado de um mutante sensível à treonina e metionina.

Extraído de Sano e Shiio (17)

e cistationa, ou treonina e homocisteína, todos contendo leucina ou isoleucina ou histidina. Quando o *C. glutamicum* foi incubado em um meio contendo melaco (como glicose) como fonte de carbono, com uma aeração de 3 lt./min. temperatura de 30°C, pH de 6,8-7,0 (controlado pela adição de NH_4OH), e duração de fermentação de 70 horas conseguiu-se um rendimento de L-lisina de 48,7 mg./ml. (19).

Atualmente estão investigando novos produtos e subprodutos como fonte de carbono para a produção de lisina. Assim por exemplo, Dronov e colab. (20), obtiveram lisina a partir do linter de semente de algodão hidrolizado ou de celolignina de madeiras coníferas. Também, Stejkal e colab. (21), com *M. glutamicus* e utilizando a polpa seca de beterraba (previamente esterilizada a 120°C), a qual é misturada com um meio líquido contendo farinha de amendoim hidrolizada, melacos e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Este conjunto é mantido em agitação durante 24 horas a 29-30°C. A biossíntese da lisina prossegue durante os subsequentes 4-5 dias a 29°C, dando um rendimento em L-lisina de 11,5 mg./ml. na fase líquida.

A L-lisina pode ser produzida, cultivando sob condições aeróbicas; microrganismos tais como: *Brevibacterium flavum* ATCC 21127, *B. flavum* ATCC 21128, *B. flavum* ATCC 21129, *B. flavum* ATCC 21474, *B. lactofermentum* ATCC 21096, *Corynebacterium acetoxidophilum* ATCC 21476, *Micrococcus glutamicus* ATCC 13286, ou *M. glutamicus* ATCC 13287 ou um mutante destes, em um meio contendo $^*\text{OAc}^-$ como a principal fonte de carbono e com adição

(*) - Radical acetato

posterior de mais OAc^- e uma fonte de nitrogênio, com o fim de manter o pH em torno de 7,0-8,5 e uma concentração de OAc^- inferior a 1,5% em peso. Outras fontes de carbono podem ser adicionados ao meio, quando a quantidade de carboidratos for inferior a 20% em relação a quantidade total de OAc^- adicionado. O meio pode ser alimentado continuamente ou intermitentemente, com uma mistura de soluções de HOAc e NH_4OAc na proporção de 1:0,05 - 0,75; o OAc^- pode ser fornecido como HOAc ou seus sais de sódio, potássio, amônio e cálcio, enquanto que, a fonte de nitrogênio pode ser: NH_3 , NH_4OAc ou uréia. Assim, um inóculo é preparado por incubação aeróbica durante 11 horas a uma temperatura de 31,5°C com o *B. flavum* ATCC 21129, em um meio contendo: 1,5% de hidrolizado de amido (calculado como dextrose), 0,3% de NH_4OAc , 0,1% de KH_2PO_4 , 0,04% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2ppm de Fe e de Mn, 3ppm de uma proteína de soja hidrolizada, 1 mg. de DL-metionina/dl., 50 ug. de biotina/lt. e 200 ug./ml. de vitamina $\text{B}_1 \cdot \text{HCl}$ (pH 8,0). Posteriormente, porções (300 ml.) de meio de produção (o qual contém: NH_4OAc 1,5%, KH_2PO_4 0,2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,04%, Fe 2ppm, Mn 2ppm, proteína de soja hidrolizada 4,0 ml./dl., Letreonina 50 ug./lt., tiamina.HCl 40 ug./lt., e uréia 0,2% (pH 6,5)) são inoculados com 15 ml. do inóculo anterior e incubado a 31,5°C com a aeração desejada. Depois de 5 horas de fermentação o pH sobe a 8,2. Então, uma solução aquosa de 40% de HOAc e NH_3 são introduzidas, respectivamente, com o objetivo de manter a concentração de HOAc abaixo de 1,5% em peso e um pH entre 7,5-8,0. Depois de 48 horas, 15,7 gr. de cristais cru de L-lisina foram obtidos de 390 ml. de mosto fermentado (22).

Também está se investigando com parafinas para a produção de L-lisina. Assim temos que a L-lisina é preparada cultivando

uma linhagem de um mutante de *Corynebacterium hydrocarbocla-*
tus ATCC 21267 (que requer L-treonina para seu desenvolviment
to) em um meio nutritivo adequado, sob condições aeróbicas e
a uma temperatura de 28-37°C. Com 5% de parafinas C₁₂₋₁₄ no
meio, com um pH de 7,2, num período de 4 dias de fermentação
se obteve 2,4 mg. de L-lisina por ml (23). Por outro lado, Ta
naka e colab. (24), cultivou *M. smegmatis* ATCC 21293 em um
meio contendo C₁₂₋₁₄ 5%, CaCO₃ 2,0%, NH₄NO₃ 1,0%, extrato de
levedura 0,5%, KH₂PO₄ 0,2%, Na₂PO₄ 0,2%, MgSO₄.7H₂O 0,1% ,
CuSO₄, Fe, Mn, Zn, em 0,001% cada um deles, borato de sódio 5
ppm, e molidato de sódio 5ppm. A fermentação foi conduzida
com agitação durante 4 dias e a 28°C, obtendo-se um rendiment
to de 3 mg. de L-lisina por ml.

Tem-se realizado estudos com o gênero *Nocardia*, o qual é cult
tivado em um meio contendo uma fonte de carbono apropriada co
mo por exemplo, querosene, etanol, parafinas e, uma fonte de
nitrogênio. Além disso, são adicionadas sais minerais e agent
tes nutritivos. O processo fermentativo é levado a cabo em
condições aeróbicas e uma temperatura de 28-27°C por 3-5 dias.
O microrganismo é um mutante que requer homosserrina, treonina
ou metionina para seu crescimento. Depois de terminado o temp
po de cultivo, as células microbianas são separadas e a L-lis
sina recuperada do meio por filtração através de uma resina
catiônica, por exemplo, Daion SKI de H⁺. A L-lisina adsorvida
é eluída com NH₄OH, que em seguida é descorada com carvão ativ
vado (10).

Estes trabalhos mostram como o conhecimento dos mecanismos gen
néticos reguladores da síntese de proteínas, que foram desenv
volvidos por Jacob e Monod (25), encontraram enormes aplicaç
ções na produção de metabólitos por microrganismos, e poder
riam ser comercialmente explorados no campo das fermentações
industriais.

VI. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A importância da lisina na alimentação humana estimulou o desenvolvimento de processos para a sua obtenção. Surgiu então a possibilidade de se obter este aminoácido através de microrganismos. Desde a obtenção de pequenas quantidades de lisina nos meios de cultivo, até a sua obtenção em escala industrial, este ramo da ciência e da tecnologia, sofreu um dos mais rápidos desenvolvimentos.

Os fatores mais significativos no desenvolvimento dos processos de obtenção de lisina por fermentação têm sido:

- a) melhor conhecimento dos mecanismos reguladores da síntese de metabólitos tais como a repressão enzimática e a retro-inibição.
- b) Conhecimento detalhado do ciclo biossintético da lisina.
- c) A obtenção de mutantes auxotróficos que são dependentes da concentração de determinados metabólitos.
- d) O desenvolvimento de técnicas de seleção e mutação que auxiliaram grandemente na obtenção de linhagens com "lesões" mutacionais específicas.

Na atualidade se dispõe de dois processos para a produção de lisina em escala industrial. Um deles em duas etapas, utilizando-se de duas espécies de microrganismos e o outro em uma só etapa valendo-se de uma única espécie.

Processo em duas etapas:

Carboidrato $\xrightarrow{E. coli}$ Ácido diaminopimélico—
 $\xrightarrow{A. aerogenes}$ lisina

Processo em uma etapa:

Carboidrato $\xrightarrow{M. glutamicus}$ lisina

Nos dois processos são utilizadas bactérias (mutantes) como agentes de transformação, dos quais o *micrococcus glutamicus*, que produz lisina em uma só etapa, dá os maiores rendimentos (13 gr/lt. de meio), enquanto que, no processo em duas etapas, só se consegue um rendimento de 7-8 gr. de lisina/litro de meio. Embora, o emprêgo de *M. glutamicus* resulte em um maior rendimento em lisina, é também certo, que a sua manipulação em escala industrial requer um pessoal técnico bem treinado e equipamento com certa precisão, que permita um controle adequado do processo. Isto se faz necessário porque este microrganismo é altamente dependente da concentração de determinados metabólitos, que devem estar presentes no meio de cultivo. É necessário que se tomem precauções para controlar os efeitos repressores sobre a síntese da lisina, devido à alteração do balanço desses metabólitos no meio. Sem estas, o rendimento da síntese pode ser seriamente afetado. Este fato determinou que somente as indústrias mais bem equipadas e especializadas na obtenção de produtos de fermentação pudessem adotar este processo. Consequentemente, países como o Japão, França e Estados Unidos produzem lisina, preferencialmente, pelo processo de fermentação em uma única etapa. Contudo, o processo mais generalizado para a obtenção de lisina na atualidade, é através de duas etapas.

Nos processos mencionados usam-se melaços de cana de açúcar e de beterraba açucareira como matérias primas provedoras de carbono e de energia. Pode-se conseguir resultados similares com farinhas de tubérculos e grãos de cereais previamente hidrolizados. É importante mencionar que estas matérias primas, possuem, em forma natural, as quantidades adequadas de biotina que são requeridas, como fator de crescimento, para que haja produção substancial de lisina. Também, para a produção comercial deste aminoácido, é importante que na formulação do meio de cultivo sejam adicionadas em quantidades e proporções adequadas fontes de: nitrogênio, certos fatores de crescimento e sais minerais, além, das fontes de carbono e biotina. É necessário ainda, um cuidadoso controle da temperatura, pH, tempo e aeração.

Com respeito à produção de lisina por fungos e leveduras, estes, até o presente, não provaram ser bons produtores. O maior rendimento já conseguido foi através de *Ustilago maydis* que alcançou 1900 mg de lisina/litro de meio; rendimento este que de nenhuma maneira poderá competir com os obtidos com as bactérias já citadas. Na literatura consultada não foram encontradas explicações ou teorias que esclarecessem os baixos rendimentos da produção de lisina pelos fungos e leveduras, contudo, é possível que as leveduras e fungos têm uma maior tendência em acumular compostos nitrogenados no interior das células, excretando uma menor quantidade de metabólitos no meio de cultivo, talvez, devido ao fato de possuírem paredes celulares espessas e quitinosas.

Atualmente se investiga intensamente com o objetivo de se obter novos mutantes auxotróficos. Como resultado de algumas destas investigações obtiveram-se mutantes de *Brevibacterium*

flavum. Destes, o que deu melhor rendimento produziu 35 gr.de lisina/litro de meio, após 70 horas de fermentação (17). Por outro lado, a fermentação com um mutante de *Brevibacterium 22*, deu um rendimento de 38-40 gr/litro, após 70 horas (18). Em um estudo (19) em que se utilizou o *Corynebacterium glutamicum* - obteve-se um rendimento de 48,7 gramas de lisina/litro de meio, depois de 70 horas de fermentação.

Em todos estes casos as condições de cultivo foram similares, indicando que os rendimentos obtidos estiveram na dependência dos mutantes empregados, e por conseguinte, do tipo de "lesão" mutacional ocorrida. Não foi encontrada nenhuma indicação de que esses mutantes já estejam em uso industrialmente. Acredita-se que a produção desses mesmos mutantes em escala industrial, seria talvez, menor que a obtida em laboratório, porque tais mutantes são muito sensíveis às pequenas variações nas condições de cultivo, variações estas, muitas vezes difíceis de serem controladas em um processo de fermentação industrial.

Por outro lado, investiga-se também novos produtos e sub-produtos agrícolas como provedores de carbono, usando diversos microrganismos para a fermentação dos mesmos. Como exemplo podemos citar produtos como acetatos, querosene, parafinas, e sub-produtos como celolignina provenientes de coníferas e palha seca de beterraba. Entre os microrganismos estudados podemos citar a *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium hydrocarbonoclastus* e *Microbacterium smegmatis*. Até a data presente não se conseguiu rendimentos com esses microrganismos, suficientes para justificar a utilização comercial dos mesmos. É possível que em um futuro próximo esses produtos e sub-produtos venham a ser utilizados para a produção de lisina.

Atualmente, também se obtém lisina pela síntese química, sendo evidente que tais processos não podem competir com a obtenção de lisina por fermentação, uma vez que as matérias primas (me^lço e amidos) são de baixos custos, oferecendo ainda a vantagem sobre a síntese química de produzir lisina exclusivamente na forma L (biologicamente ativa).

Até a presente data, a lisina é mais extensamente usada com finalidades terapêuticas e em menor proporção como ativador do sabor (em forma de succinato de L-lisina, succinato hidrogenado de L-lisina, adipato hidrogenado de L-lisina). Um uso óbvio, seria o de suplementar dietas baseadas principalmente em proteínas vegetais, que em geral são deficientes em lisina. Este constitui um problema muito sério, particularmente para a A. Latina, onde o crescimento populacional é dos maiores, podendo dentro de alguns anos tornar-se dependente das proteínas vegetais e, neste caso, o balanceamento das proteínas com lisina seria, em muitos casos, altamente desejável.

Do anteriormente exposto, pode-se tirar as seguintes conclusões:

- 1) As bactérias são melhores produtoras de lisina que os fungos e leveduras.
- 2) Dos processos desenvolvidos até o presente, o de uma só etapa deu os maiores rendimentos, porém, apresenta maiores dificuldades na sua execução. O processo em duas etapas ainda encontra maior aplicação industrial.
- 3) Alguns auxótrofos que deram em laboratório rendimentos superiores ao obtidos industrialmente pelos processos convencionais, não foram ainda aplicados para fins industriais.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GOMES, R.A. Enriquecimiento de los cereales y sus productos con concentrados proteínicos y aminoácidos, o ambos: Aspectos nutricionales. Revista, Recursos Proteínicos en América Latina (INCAP), p.333-335 (1971).
2. KIMOSHITA, S. The production of amino acids by fermentation processes. Adv. Appl. Microbiol. 1:201. (1959).
 - 2a. DEGLEY, S., DAVES, E.A., and MORRISON, G.A., Nature 165, 437-438. (1950).
 - 2b. MORTON, A.G., and BROADBENT, D.J. Gen. Microbiol. 12, 248-258. (1955)
 - 2c. CORUM, C.J., STARK, W.M., WILD, G.M., and BIRD, H.L., Jr. Appl. Microbiol. 2 : 236-329. (1954)
 - 2d. PERLMAN, D., and O'BRIEN, F. J. Bacteriol. 75, 611. (1958)
3. AIBA, H.R., HUMPHEY, A.E. & MILLS, N.F. Biochemical Engineering. Academic Press, p.38-41 and 63-68. (1965).
4. MANDELSTAM, J. & Mc QUILLEN, K. Biochemistry of bacterial Growth. John Wiley and Sons Inc. p. 666-675. (1966)
5. PARK, Y.K. Produção de Proteínas e aminoácidos para alimentos. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos. nº 24: 47-64. (1970)
6. RICHARD, M. & HASKINS, R.H. Extracellular lysine production by various fungi, Can. J. Microbiol. 3 : 543-546. (1957)
7. DULANEY, E.L. Formation of extracellular lysine by *Ustilago maydis* and *Cliocladium* sp. Can. J. Microbiol. 3:467-476.

8. PEPPLER, H.J. Microbial Technology. Reinhold Publishing Corporation. N. York. p. 309-310. (1967)
9. SANCHES, A., LEDEZMA, M., and CARRENO, E. Sugar Substrates for L-lysine fermentation by *Ustilago maydis*. J. Gen. Appl. Microbiol. 20: 687-692. (1970).
10. KYOWA FERMENTATION INDUSTRY. Co., Ltd. L-lysine by fermentation, using *Nocardia* microorganisms. Chem. Abst. Vol. 75 (5). n^o 33965v. August 2. (1971).
11. DAVIDSON, MICHEL and TEMPE-HERMANN. L-lysine. Chem. Abst. Vol. 75 (21). n^o 128518r. November 22. (1971).
12. CASIDA, L.E. Jr. Preparation of diaminopimelic acid and lysine. U.S. Patent 2.771.396. Nov. 20. (1956).
13. KITA, H. U.S. Patent 2.841.532. Jul. 1. (1958).
14. SANO, K. & SHIIO, I. Microbiol production of L-lysine. J. Gen. Appl. Microbiol. 13: 349-358. (1967).
15. SHIIO, I. & SANO, K. Microbiol production of L-lysine J. Gen. Appl. Microbiol. 267-287. (1969)
16. SANO, K. & SHIIO, I. Production of L-lysine. J. Gen. Appl. Microbiol. 16: 372-391. (1970).
17. SANO, K. & SHIIO, I. Microbiol production of L-lysine. J. Gen. Appl. Microbiol. 17: 97-113. (1971).
18. KUTSEVA, L.S., KLYNEVA, N.M. Controlled biosynthesis of lysine and glutamic acid by a *Brevibacterium* 22 culture. Chem. Abst. Vol. 72(22). n^o 11366m. June 1. (1970)
19. KYOWA FERMENTATION INDUSTRY Co., Ltd. Chem. Abst. Vol.

- 73 (11). n^o 54617g. September 14. (1970)
20. DRONOV, S.F., LUPOVA, L.M., USPENS KAYA, A.A., BELOVA, V.V., SOKOLOVA, L.B., KHOKHLOVA, V.K. L-lysine Chem. Abst. Vol. 72 (6). n^o 239025, February 9. (1970).
 21. STEJSKAL, J.; BRECKA, J.; BENDA, A.; HEJDANEK, S.; HOUDAR, J. CERMOSEK, A. L-lysine - Chem. Abst. 75(5). n^o 33966w. August 2. (1971).
 22. AJINOMOTO Co., Inc. L-lysine by fermentation. Chem. Abst. Vol. 75(11). n^o 74920v. September 13. (1971).
 23. KYOWA FERMENTATION INDUSTRY Co., Ltd. L-homoserine and L-lysine production by fermentation. Chem. Abst. Vol. 73 (11). n^o 54618h. September 14. (1970).
 24. TANAKA, K.; OSHIMA, K.; TOKORO, Y. OKII, M. L-lysine by hydrocarbon fermentation. Chem. Abst. Vol. 75 (21). N^o 128501e. November 22. (1971).
 25. JACOB, F. & MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3: 318. (1961).

Este volume foi datilografado e impresso na
FUNDAÇÃO CENTRO TROPICAL DE PESQUISAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
Rua Dr. Pelágio Lobo nº 63 - Tels. 96886 e 87822
CAMPINAS - SP