

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUIZ ALBERTO JUNIOR LETTI

PRODUÇÃO DE L-LISINA POR PROCESSOS FERMENTATIVOS
E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO PARA NUTRIÇÃO
ANIMAL

CURITIBA
2014

LUIZ ALBERTO JUNIOR LETTI

PRODUÇÃO DE L-LISINA POR PROCESSOS FERMENTATIVOS
E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO PARA NUTRIÇÃO
ANIMAL

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA
2014

TERMO DE APROVAÇÃO

LUIZ ALBERTO JUNIOR LETTI

PRODUÇÃO DE L-LISINA POR PROCESSOS FERMENTATIVOS E DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO PARA NUTRIÇÃO ANIMAL

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR

Prof. Dr. Júlio César de Carvalho
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR

Prof.^a Dr.^a Susan Grace Karp
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e biotecnologia, Universidade Positivo

Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin
Departamento de Engenharia Química, UEM

Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez
Faculdade de Engenharia de Alimentos, UFPA

Curitiba, 13 de agosto de 2014

Aos amores de minha vida: meus pais,
a quem devo tudo que tenho e tudo
que sou; minha esposa, meu presente
de Deus; e também ao meu querido e
talentoso irmão.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida.

Aos Mestres que me auxiliaram durante o planejamento e execução deste trabalho, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Soccol.

Aos colegas de Departamento e da Pos-Graduação, pela amizade e companheirismo.

Aos técnicos de laboratório, em especial à Mitiyo Fukuda Miyaoka, pela amizade, companheirismo e pelo auxílio em diversas etapas dos trabalhos em laboratório.

Aos estagiários pela dedicação e pela valiosa ajuda na execução dos diversos experimentos.

Aos meus familiares e amigos, pelo carinho, confiança e suporte durante todos os momentos.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

RESUMO

A economia de mercado dos tempos atuais exige altas produções a baixos custos, e normalmente a relação custo-benefício determina a viabilidade ou a inviabilidade de um negócio. Para a agroindústria não é diferente. Quando se busca a criação de bovinos, suínos, aves, ovinos, dentre outros para o abate, em geral o objetivo é engordar os animais em um curto espaço de tempo e com a maior produção de proteína possível. Há mais de 50 anos o homem domina a técnica de produção de aminoácidos a partir de fermentações, e produtos a base de aminoácidos essenciais e limitantes ao crescimento são agregados às rações para acelerar o crescimento e ganho de peso dos animais. A L-Lisina é um dos 3 aminoácidos essenciais mais importantes para as fases iniciais do crescimento, e seu mercado, no Brasil é dominado por multinacionais. Os produtos mais recorrentes são vendidos em uma forma purificada, normalmente em forma de pó ou de cristais. O objetivo principal deste trabalho foi o de desenvolver um processo viável técnica e economicamente, tendo como produto final uma farinha rica em L-Lisina, e cujo suporte seja um resíduo, subproduto ou coproduto da agroindústria nacional. Inicialmente cepas de *Corynebacterium glutamicum* foram reativadas e selecionadas, de acordo com seu potencial de produção de L-Lisina. A cepa ATCC 21799 apresentou os melhores resultados, produzindo inicialmente 1,7g/l de L-Lisina, quando cultivada em meio a base de caldo nutriente, em shaker, a 120 rpm, temperatura de 30 °C e pH inicial de 7,0. Após otimização da composição do meio de cultivo, e com fontes mais baratas de nitrogênio e carbono (sulfato de amônio como fonte inorgânica de nitrogênio e melaço de cana como fonte de carbono), a produção atingiu 7,8 g/l. Após geração e seleção de mutantes pelo método clássico da luz ultravioleta, a produção atingiu 9,3g/l. Na etapa seguinte, o caldo fermentado rico em L-Lisina foi impregnado em matrizes sólidas secas, moídas e classificadas (farelo de trigo, casca de soja, bagaço de cana, polpa cítrica e resíduo de malte cervejeiro) e então submetido a ciclos de secagem e reimpregnações. As farinhas resultantes apresentaram conteúdos de até 13,% de L-Lisina em massa seca, e uma análise econômica preliminar mostrou que tais produtos possuem potencial de mercado, desde que os rendimentos da etapa fermentativa sejam maximizados. Neste caso, as farinhas desenvolvidas teriam custo variando entre R\$ 0,24 e R\$ 0,33 para alimentar um suíno por dia, enquanto que os produtos atualmente comercializados teriam um custo de R\$ 0,45.

Palavras-chave: L-Lisina. Nutrição animal. Processos fermentativos. Resíduos agroindustriais. *Corynebacterium glutamicum*

Abstract

The nowadays market economy requires high productions at low costs, and usually the cost-benefit ratio determines the viability or non-viability of a business. For agribusiness is no different. When cattle, pigs, poultry, sheep, among others are raised for slaughter, the general goal is to fatten the animals in a short time and with the greatest possible protein production. For over 50 years, human mastered the technique of production of amino acids from fermentation, and products based on essential and limiting amino acids for growth are aggregated to feed to accelerate growth and weight gain of the animals. L-Lysine is one of the three most important amino acids essential for the early stages of growth, and its market in Brazil is dominated by multinationals. The most frequent products are sold in a purified form, normally in the form of powder or crystals. The main objective of this work was to develop a technically and economically viable process, whose final product is a flour rich in L-Lysine, and whose support is a waste, a byproduct or a coproduct of the national agribusiness. Initially, strains of *Corynebacterium glutamicum* were reactivated and selected according to their potential for production of L-Lysine. The ATCC 21799 strain showed the best results, initially producing 1.7 g/l of L-Lysine, when growth in a medium based in nutrient broth in a shaker at 120 rpm, 30 °C and initial pH of 7.0. After optimization of the composition of the medium, and with cheaper sources of carbon and nitrogen (ammonium sulphate as inorganic nitrogen source and cane molasses as carbon source), production reached 7.8 g/l. After generation and selection of mutants by the classical method of ultraviolet light, production reached 9,3g/l. In the next stage, the fermented broth rich in L-Lysine was impregnated in dried, milled and classified solid matrices (wheat bran, soybean hulls, sugar cane bagasse, citrus pulp and brewer spent grain) and then subjected to cycles of drying and reimpregnation. The resulting flours presented contents up to 13% of L-Lysine in dry mass, and a preliminary economic analysis showed that these products have market potential, since the yields of the fermentation step are maximized. In this case, the developed flours would cost between R\$ 0.24 and R\$ 0.33 to feed one pig per day, while the currently marketed products have a cost of R\$ 0.45.

Key words: L-Lysine. Animal nutrition. Fermentative processes. Agroindustrial residues. *Corynebacterium glutamicum*

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Revisão bibliográfica.....	12
2.1. Aminoácidos.....	12
2.2. L-Lisina.....	12
2.2.1. Mecanismo de produção de L-lisina.....	13
2.2.2. Produção de L-lisina por bactérias.....	15
2.2.3. Capacidade máxima de produção de L-Lisina.....	16
2.2.4. Melhoramento genético.....	16
2.2.4.1. Melhoramento clássico.....	16
2.2.4.2. Engenharia metabólica da biossíntese de lisina.....	17
2.2.4.3. Engenharia metabólica do metabolismo de NADPH.....	19
2.2.4.4. Engenharia metabólica da fonte precursora.....	19
2.2.5. Fluxo metabólico na produção de L-Lisina.....	20
2.2.6. Produção de L-Lisina em escala industrial.....	20
2.3. Substratos.....	21
2.3.1. Polpa cítrica.....	21
2.3.2. Farelo de trigo.....	21
2.3.3. Bagaço de cana.....	22
2.3.4. Resíduo de Malte (Brewer Spent Grain).....	22
2.3.5. Casca de Soja.....	22

3. Objetivos.....	23
3.1. Objetivo Principal.....	23
3.2. Objetivos Complementares.....	23
4. Metodologias Analíticas.....	24
4.1. Quantificação de L-Lisina.....	24
4.2. Quantificação de Biomassa.....	24
4.3. Quantificação de Açúcares.....	25
5. Reativação, Conservação e Seleção de Cepas Produtoras de L-Lisina..	25
5.1. Testes Preliminares e Seleção das Melhores Produtoras.....	26
6. Otimização de Parâmetros de Fermentação para Produção de L-Lisina.	28
6.1. Fontes de Nitrogênio.....	28
6.1.1. Testes com Fontes Inorgânicas de Nitrogênio e em Meios com ausência e Presença de Sais e Vitaminas com a Cepa NRRL B33330.....	28
6.1.2. Testes com Fontes Inorgânicas de Nitrogênio com as Cepas ATCC 21513, ATCC 21543 e ATCC 21799.....	30
6.2. Sais e Vitaminas.....	31
6.2.1. Testes na Ausência e Presença de Sais e Vitaminas com a Cepa NRRL B3330 e ATCC 21799.....	31
6.2.2. Determinação da Influência individual dos Sais e Vitaminas para Produção de L-lisina pela cepa ATCC 21799.....	32
6.3. pH e Agentes Tamponantes.....	35
6.3.1. Importância do pH e Testes para Escolha de Tampão Adequado.....	35
6.4. Altas Concentrações de Fontes de Carbono e Nitrogênio.....	37
6.4.1. Testes com Altas Concentrações de Glicose e Sulfato de Amônio...	37
6.4.2. Otimização da Proporção entre Fonte Orgânica e Inorgânica de Nitrogênio para Produção de L-lisina pela Cepa ATCC 21799.....	41

7. Produção de L-Lisina em Meios Formulados.....	42
7.1. Produção de L-Lisina em Meio com Batata-Doce.....	42
8. Produção de L-lisina em Escala de Bancada e Cinética de Fermentação.....	46
9. Tentativas de Produção de L-Lisina em Meio Sólido.....	52
10. Geração de Mutantes com Maior Potencial de Produção de L-Lisina.....	53
10.1. Determinação da distância e tempo de mutação.....	54
10.2. Obtenção de linhagens mutantes.....	56
11. Uso de Mutantes e Produção de L-Lisina em Meios Formulados.....	65
11.1. Otimização das concentrações de melação de cana e sulfato de amônio.....	67
12. Desenvolvimento de um Produto para a Indústria de Ração Animal.....	70
13. Análise Econômica.....	83
14. Conclusões.....	85
15. Perspectivas para Trabalhos Futuros.....	86
16. REFERÊNCIAS.....	87
APÊNDICE.....	91

1. Introdução

Os aminoácidos são as subunidades básicas das proteínas, moléculas que são componentes estruturais e possuem imprescindível papel fisiológico e metabólico em todos os seres vivos. São 20 os aminoácidos comuns, mas mamíferos e aves não possuem a capacidade de sintetizar alguns deles, os chamados essenciais. Estes precisam ser adquiridos diretamente pela alimentação.

A L-lisina é um aminoácido essencial, e fundamental na alimentação não somente de humanos, mas também de animais de importância econômica, como frangos, suínos e bovinos. Normalmente a indústria agropecuária utiliza suplementos de aminoácidos em rações para acelerar o crescimento e ganho de peso dos animais, pois a maioria dos grãos como a soja e o milho são deficientes em vários aminoácidos.

O mercado mundial de L-lisina, atualmente, gira em torno de 1.300.000 ton ao ano, com um crescimento médio anual de 8% ao ano. Os maiores produtores são a japonesa Ajinomoto (com cerca de 24% da produção mundial) e a sul coreana CJ CheilJedang (cerca de 23% da produção mundial) ambas com plantas industriais em solo brasileiro.

A L-lisina é produzida por processos fermentativos, conduzidos por bactérias do gênero *Corynebacterium*, ou por cepas específicas de *E. coli*. Normalmente se usam fermentações líquidas (submersas) e o produto final é um sal de Lisina (a Lisina-HCl) que pode ser cristalizada e é bastante estável. As etapas que mais encarecem a produção são: matéria-prima para a fermentação (fonte de carbono e nitrogênio) seguida pelas operações unitárias de processamento. Sendo assim, a busca por matérias-primas baratas e métodos alternativos de separação/purificação do produto são pontos-chave para a viabilização econômica de novas tecnologias que tenham intuito de competir com as multinacionais que dominam o mercado atualmente.

Este trabalho visa o desenvolvimento de um bioprocessamento para produção de L-lisina que seja atrativo do ponto de vista econômico-ambiental, e que seja uma alternativa aos processos tradicionais já consagrados. Se propõe o uso de subprodutos agroindustriais de baixo valor agregado (e que muitas vezes são tratados como resíduos) gerados em grandes quantidades no Brasil como fontes de carbono e nitrogênio.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Aminoácidos

As proteínas são algumas das macromoléculas biológicas mais abundantes e diversas que ocorrem em todas as células e em todas as partes das células. Elas possuem uma enorme diversidade de funções biológicas. São os instrumentos moleculares por meio dos quais a informação genética é expressa.

As subunidades básicas das proteínas são os aminoácidos. São 20 os aminoácidos primários, que constituem uma espécie de alfabeto para virtualmente todas as proteínas encontradas na natureza. Todos os aminoácidos comuns são α -aminoácidos porque possuem um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono (o carbono α). Eles diferem entre si nas suas cadeias laterais, ou grupos R, que variam em estrutura, tamanho e carga elétrica e que influenciam a solubilidade dos aminoácidos em água. De acordo com as propriedades dessa cadeia lateral, os aminoácidos podem ser divididos em: grupos R alifáticos não-polares; grupos R aromáticos; grupos R não-carregados polares; grupos R carregados positivamente; grupos R carregados negativamente. Exceto na glicina, os carbonos α de qualquer aminoácido são centros quirais, o que implica na existência de pelo menos dois estereoisômeros para cada aminoácido. Quando processados por organismos, normalmente apenas um dos isômeros é encontrado, pois as enzimas envolvidas na síntese dos aminoácidos são estereoespecíficas. São os L-aminoácidos (chamados assim por possuírem conformação análoga a do L-gliceraldeído). (Nelson et al, 2011).

2.2. L-Lisina

A lisina (ácido 2,6-diaminocapróico ou ácido 2, 6-diaminoexanóico) pertence à classe de aminoácidos com grupos R carregados positivamente, e é, por isso, altamente hidrofílica (índice de hidropatia de -3,9, é menos hidrofílica somente quando comparada à arginina). Ela possui um grupo R com 4 carbonos, e com um grupamento amino no carbono 6 (o carbono mais distante do carbono α). O pKa do grupamento carboxila na lisina é de 2,18. O pKa do grupamento amino do carbono α é de 8,95, e o do grupamento amino do radical R é de 10,53. Portanto, em pH neutro a lisina possui carga global positiva. O ponto isoelétrico da lisina é 9,74. Sua ocorrência em proteínas gira em torno de 5,9%. (Nelson et al, 2011).

A forma comercial predominante é a Lisina-HCl (monocloridrato de L-Lisina). Ela é usada principalmente como aditivo alimentar na indústria de ração animal, visto que grande parte dos cereais são deficientes neste aminoácido essencial para algumas classes de animais, como frangos, gado e suínos. (Anastassiadis, 2007). Lisina é normalmente reconhecida como sendo o aminoácido limitante primário de vários grãos e sementes oleaginosas, tanto para humanos como para animais. Sendo assim, é preciso que ela seja adicionada a esses alimentos (Shah, 2002).

Três das principais fontes de carbono usadas para a produção de L-Lisina são frutose, glicose e sacarose. Segundo (Kiefer, 2002) a produção de L-Lisina é inferior quando se usa frutose como fonte de carbono. O uso de glicose proporciona resultados melhores, comparáveis aos resultados obtidos com o uso de sacarose. Os níveis de biomassa são similares para sacarose e frutose, e superiores para a glicose.

2.2.1. Mecanismo de produção de L-lisina

A maioria das cepas selvagens, tanto de bactérias quanto de fungos, não são capazes de sintetizar L-Lisina em grandes quantidades, devido à regulações metabólicas específicas. Entretanto, alterações destes mecanismos podem levar a produções significativas de L-lisina. São conhecidas duas vias biossintéticas para a produção de L-lisina. Uma das vias é a do ácido α -aminoadípico (comum em certos actinomicetos e em algumas algas, na qual o esqueleto de carbono para a L-lisina é proveniente do acetato e do α -cetoglutarato). A outra via é a do diaminopimelato (encontrado em alguns ficomicetos, plantas superiores, algas azuis e protozoários), mediante a qual L-lisina é biosintetizada a partir de piruvato e aspartato. (Shah, 2002).

Em microrganismos a lisina pode ser sintetizada por duas rotas completamente diferentes: tanto a partir do 2-oxoglutarato e acetil-CoA pela rota do α -aminoadipato ou do aspartato pela rota do diaminopimelato. Existem duas variantes da rota do α -aminoadipato. Uma delas ocorre em fungos superiores e em arqueobactérias, e a outra na bactéria *Thermus thermophilus*. Em bactérias e plantas, a lisina pode ser sintetizada a partir de aspartato por uma ou mais das quatro variantes da rota do diaminopimelato (figura 1). Algumas bactérias do gênero *Corynebacterium* são representantes dos poucos microrganismos capazes de operar com duas rotas biossintéticas da lisina simultaneamente. Uma característica comum envolvida nas

diferentes rotas diz respeito à regulação de fluxo das vias por inibição retroativa das aspartato quinase. Em *Corynebacterium glutamicum* existe apenas uma isoenzima de aspartato quinase, e é codificada por dois genes: *lysC α* e *lysC β* , representando as duas seqüências codificadoras para as duas subunidades da enzima. A sua atividade é bioquimicamente regulada por inibição retroativa concertada por lisina e treonina, que se ligam à subunidade *β* . (Wittmann, 2007).

A lisina pertence à família de aminoácidos do aspartato (mesma rota metabólica) e em *Corynebacterium glutamicum* é produzida a partir do piruvato, oxaloacetato e duas moléculas de amônia com suprimento adicional de quatro NADPH com poder de redução. Interessantemente, o organismo possui vias separadas para a biossíntese de lisina. Os dois ramos alternativos fornecem à bactéria *Corynebacterium glutamicum* uma maior flexibilidade para resposta a mudanças de condições do meio, como, por exemplo, variações nas concentrações de amônio (An et al, 1999).

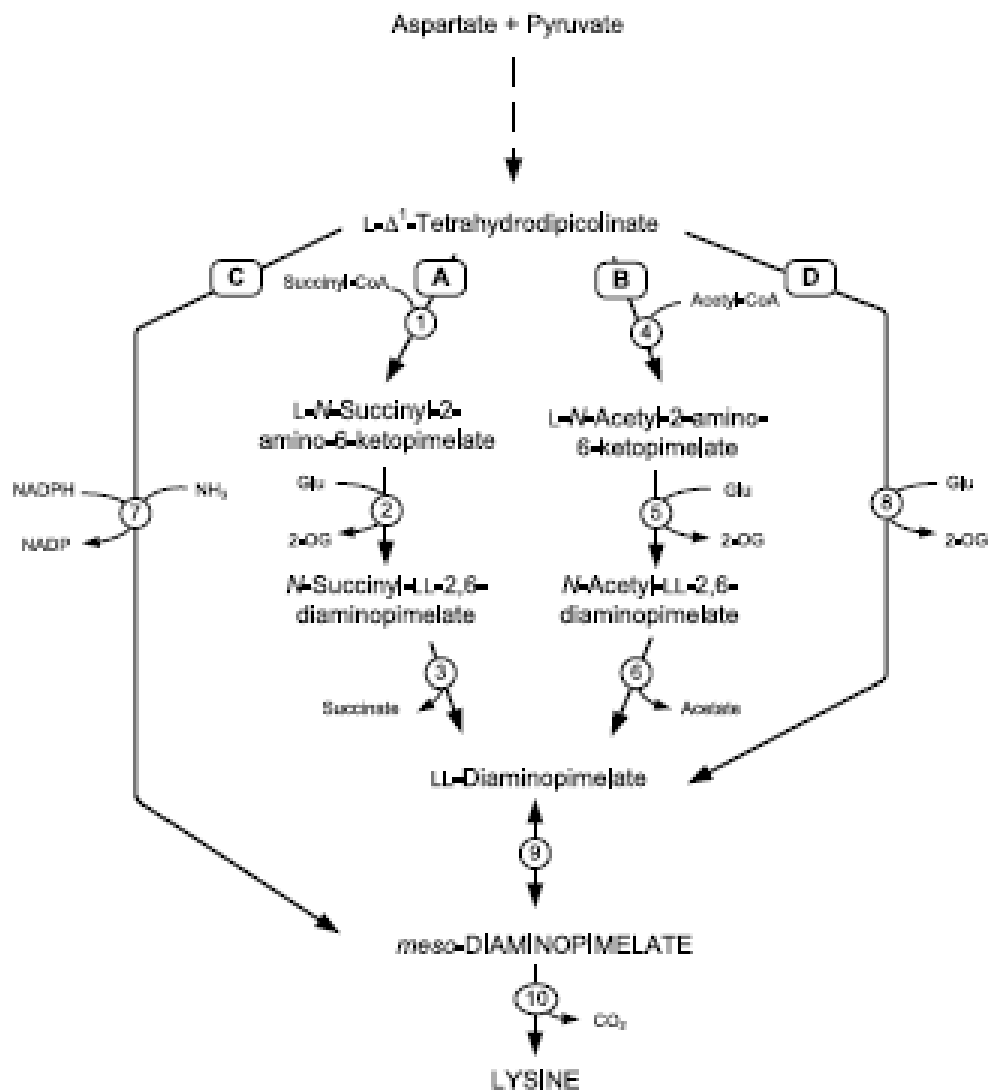


Figura 1: as 4 possíveis vias de produção de L-Lisina em procariotos

2.2.2. Produção de L-lisina por bactérias

Algumas linhagens produtoras de L-lisina tem sido obtidas. Destaque para *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* e *Methilophilus methylotrophus*. (Shah, 2002; Tsujimoto, 2006). Uma estratégia bastante comum para aumentar a produção de L-lisina é a obtenção de cepas auxotróficas para outros aminoácidos envolvidos na mesma rota de produção da L-lisina, como a metionina, homoserina e treonina.

2.2.3. Capacidade máxima de produção de L-Lisina

A capacidade máxima, ou rendimento teórico máximo de uma célula de *Corynebacterium glutamicum* para a produção de lisina é uma característica importante, visto que ela fornece uma estimativa do potencial de otimização remanescente de um processo industrial em curso aos engenheiros de processos ou engenheiros genéticos. Segundo Hollander (1994), o rendimento molar máximo de glicose em lisina é de 75%. Análises de fluxo metabólico considerando as principais rotas metabólicas que podem ser usadas por *Corynebacterium glutamicum* para a produção de lisina indicam que tal rendimento teórico poderia ser de até 82%. (Shah, 2002).

2.2.4. Melhoramento genético

Após a descoberta da sua habilidade de produzir e excretar aminoácidos, *Corynebacterium glutamicum* foi usado para estabelecer um processo de produção biotecnológica para diversos aminoácidos. Através dos anos, vários métodos de melhoramento genético têm sido desenvolvidos para criar cepas produtoras mais eficientes.

2.2.4.1. Melhoramento clássico

As primeiras cepas produtoras foram desenvolvidas através de processos iterativos de mutagênese randômica com luz UV e mutagênicos químicos e subsequente seleção de cepas. A chave para aqueles sucessos era o uso de análogos tóxicos da lisina, como, por exemplo, a S-2-aminoetil-cisteína, para o screening de cepas resistentes à inibição retroativa. Mais tarde essas cepas revelaram mutações pontuais no gene responsável pela síntese da aspartoquinase, mutações estas que livravam a enzima da inibição retroativa por treonina e lisina. Outras cepas exibiam, por exemplo, produção insuficiente, ou mesmo inexistente de treonina (auxotróficas para treonina), e também para outros aminoácidos, vitaminas e outros metabólitos. Algumas das desvantagens da mutagênese convencional, são, justamente, a ocorrência de inúmeras mutações pontuais que se acumulam ao longo das gerações e

a consequente exigência nutricional (como é o caso dos auxotróficos para treonina). Após a identificação dos genes alvo para o incremento da produção de lisina, alelos de superprodutores puderam ser introduzidos em cepas selvagens, gerando linhagens com boa capacidade de produção e sem requerimentos nutricionais adicionais (Wittmann e Becker, 2007).

2.2.4.2. Engenharia metabólica da biossíntese de L-lisina

A possibilidade de realizar modificações genéticas específicas pelo desenvolvimento da biologia molecular e de ferramentas da engenharia genética deram início a um grande número de esforços para racionalizar a otimização de *Corynebacterium glutamicum*. Muitos desses estudos focaram na otimização do fluxo da biossíntese de lisina pela modificação direta das enzimas envolvidas nas vias. Em especial, a modificação de três enzimas foi essencial para o melhoramento na produção de lisina, a saber: aspartato quinase (lysC), dihidropicolinato sintase (dapA) e o exportador de lisina (LysE). A aspartato quinase é uma enzima chave na biossíntese de lisina, visto que ela é sujeita à inibição retroativa por lisina e treonina. (Malumbres e Martin, 1996). Diferentes mutações pontuais na região codificadora para a subunidade regulatória B (beta) da lysC têm promovido a perda da capacidade de controle retroativo da enzima e levado, conseqüentemente, a um aumento na produção de lisina (Sugimoto et al, 1997). A produção também pode ser incrementada pela superexpressão do gene da aspartato quinase. Plasmídios expressando codificações amplificadas do gene dapA aumentam significativamente a produção de lisina (Eggeling et al, 1998). A superexpressão de duas enzimas do ramo da succinilase, a saber: diaminopimelato epimerase e succinilaminocetopimelase transaminase, beneficiaram a formação de lisina (Kelle et al, 2005). Taxas mais altas de secreção de lisina foram obtidas pela superexpressão do gene exportador de lisina (lysE) (Bellmann et al, 2001). A figura 2 ilustra a rota de biossíntese da L-Lisina em *Corynebacterium glutamicum* e evidencia as principais enzimas envolvidas:

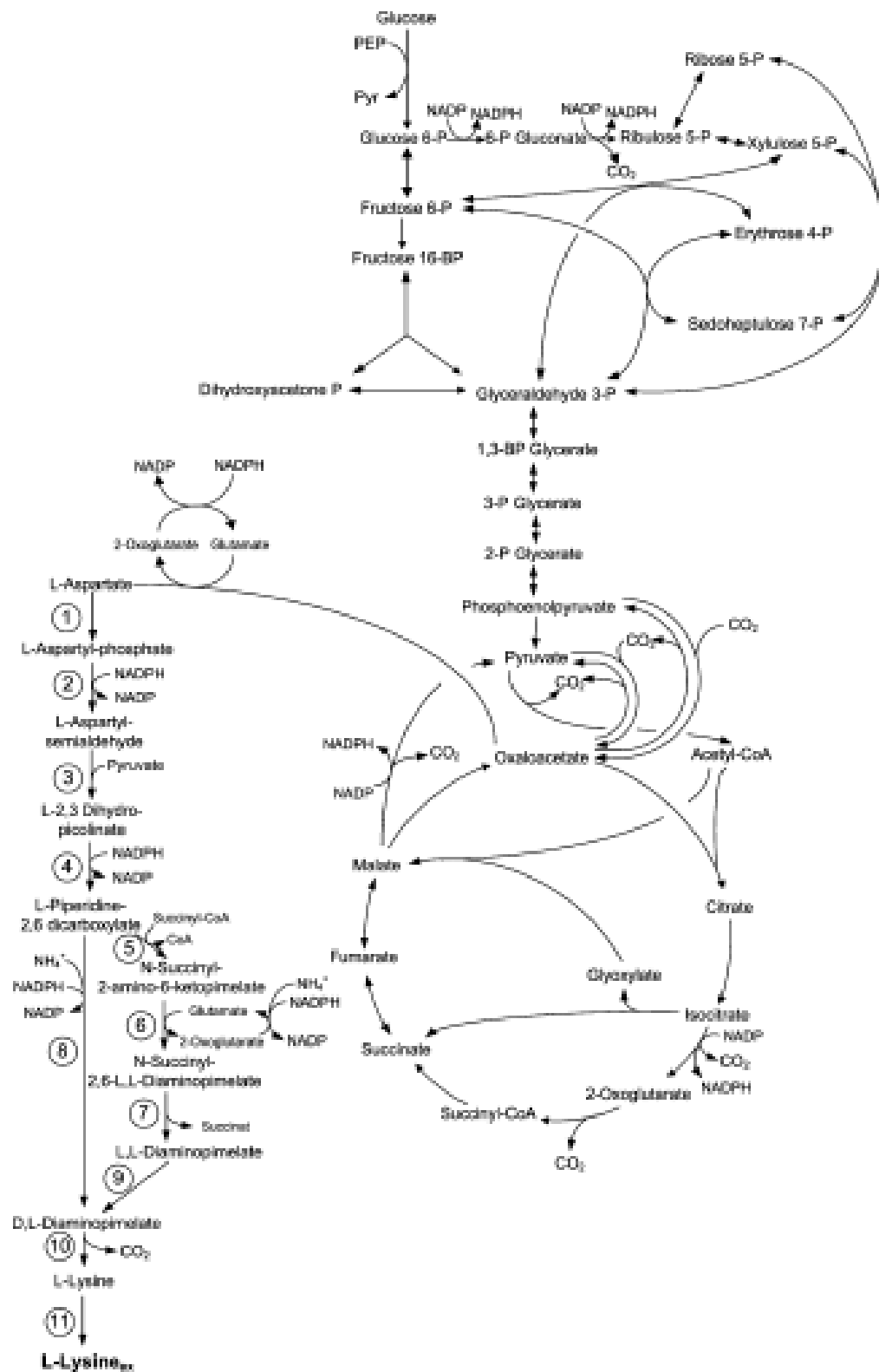


Figura 2: rotas metabólicas centrais e produção o de L-Lisina em *Corynebacterium glutamicum*

2.2.4.3. Engenharia metabólica do metabolismo de NADPH

NADPH é consumido na via biossintética de lisina em 4 etapas, seja direta ou indiretamente pela assimilação do amônio. O suprimento eficiente de amônio é fundamental para a superprodução de lisina. Segundo Wittmann (2007), a demanda é de 16,4 mmol NADPH/g biomassa, considerando as necessidades de crescimento celular e produção de lisina. O metabolismo do NADPH em *Corynebacterium glutamicum* é bastante flexível e se ajusta de acordo com diversos parâmetros, tais como: necessidades fisiológicas globais da célula, fonte de carbono usada, variabilidade genética da cepa. Como quatro moléculas de NADPH são requeridas para a produção de uma molécula de lisina, e pelo fato de a via das pentoses fosfato ser a melhor fornecedora de NADPH, boa parte das tentativas de melhoramento com o intuito de aumentar a produção de lisina visam o redirecionamento do fluxo de carbono para a via das pentoses fosfato. Um exemplo desta estratégia é a deleção do gene da fosfoglucoose isomerase (pgi), forçando a célula a metabolizar glicose somente pela via das pentoses fosfato (Marx et al, 2003). Os rendimentos de lisina a partir da glicose foram superiores aos obtidos com cepas não mutadas.

2.2.4.4. Engenharia metabólica da fonte precursora

O oxaloacetato é o precursor direto dos aminoácidos derivados do aspartato. Em *Corynebacterium glutamicum*, as enzimas anapleróticas fosfoenolpiruvato carboxilas (PPC) e e piruvato carboxilase estão envolvidas no suprimento de oxaloacetato. A superexpressão do gene da piruvato carboxilase aumentou a produção de lisina (Peters-Wendisch et al. 2001). Ainda, a superexpressão do gene ppc aumentou a produção dos aminoácidos da família do aspartato (Sano et al. 1987). A deleção do gene pckA (fosfoenolpiruvato carboxiquinase), que converte oxaloacetato em fosfoenolpiruvato, favoreceu a produção de lisina (Riedel et al., 2001). A deleção de genes que promovem a descarboxilação de compostos do ciclo do ácido cítrico para compostos da glicólise (que constituem um nodo ao redor do piruvato) é uma estratégia promissora para a obtenção de cepas superprodutoras de lisina.

2.2.5. Fluxo metabólico na produção de L-lisina

Segundo Eggeling (1993), pelo uso de glicose com carbono 13, concluiu-se que de 60 a 70% do carbono encontrado na L-lisina é proveniente da via das pentoses fosfato, enquanto que apenas 20% do carbono do glutamato provêm dessa via. Os dados estão de acordo com a alta demanda de NADPH necessário para a produção de L-lisina, que é suprido pela via das pentoses fosfato.

Becker et al. (2007) realizou um trabalho de engenharia de fluxo metabólico. A inserção de um promotor forte no gene *zwf* (que codifica a glicose 6P desidrogenase) em uma cepa de *Corynebacterium glutamicum* com aspartato quinase resistente a retroinibição (ATCC 13032 *lysC^{fbr}*) aumentou o fluxo de carbono na via das pentoses fosfato em cerca de 15% quando comparada à cepa sem a modificação. A produção de L-lisina foi maximizada.

(Kiefer 2002) testaram diferentes fontes de carbono como substrato para a produção de L-lisina por *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253. O cultivo em frutose exibiu rendimento em Lisina 30% inferior quando comparado aos cultivos em sacarose e glicose. Durante o cultivo com frutose houve maior produção de moléculas como o lactato. Além disso, a frutose 1,6-bifosfato entra na via glicolítica, e inibe a enzima glicose 6-fosfato desidrogenase. Esta é uma evidência de que o fluxo de carbono para as vias centrais é maior, em detrimento à via das pentoses fosfato, o que reduz o suprimento de NADH, e conseqüentemente, reduz a capacidade de síntese de Lisina.

(de Graaf et. Al, 2001) otimizaram a produção de Lisina por meio de um conjunto de técnicas, que envolve engenharia de fluxo metabólico (pela regulação da aspartato quinase, exportador de lisina, diidropicolinato sintase), análise bioquímica, engenharia genética e modelagem matemática.

2.2.6. Produção de L-Lisina em escala industrial

Anualmente são produzidas aproximadamente 700.000 toneladas de L-lisina. Os principais substratos usados para a produção de L-lisina são melaço de cana, melaço de beterraba, sacarose e dextrose (normalmente obtida pela hidrólise de

amido). O maior fator de custo na produção industrial de L-lisina é a fonte de carbono (Kelle 2001). Justamente por isso, o rendimento de lisina a partir das fontes de carbono é um parâmetro chave para viabilizar economicamente processos industriais de produção de L-lisina. A purificação e formulação do produto no *downstream* é também um importante fator de custo (Hermann 2003). Em processos industriais, a biomassa de *Corynebacterium glutamicum* pode ser utilizada separadamente como ração animal, visto que é classificada como GRAS (Onishi, 2005).

2.3. Substratos

2.3.1. Polpa cítrica

A produção mundial de “cítricos” é de 72,3 milhões de toneladas/ano, no período de 2007 a 2008, segundo o USDA/FAS. Por “cítricos”, se entende uma classe de frutas, das quais as mais importantes são: laranja doce, tangerina e limão. O Brasil é o maior produtor mundial de cítricos, com aproximadamente 22% da produção mundial. O resíduo mais importante do processamento de frutas cítricas é a polpa cítrica.

O farelo de polpa cítrica é composto por cascas, sementes e polpas de laranja, e corresponde, aproximadamente, a 50% do peso da fruta. Inicialmente possui 82% de umidade. Após ser triturada e seca, na indústria, é peletizado. O farelo é usado como suplemento para ração animal, e é um importante insumo para o rebanho bovino (leite e corte) (Bampidis, 2006). O material é rico em proteína (5%), fibra (14%) e minerais (8%). Nos anos de (2007/2008) o Brasil exportou cerca de 809 mil toneladas de polpa cítrica anualmente. Portanto, a polpa cítrica se constitui como um potencial substrato para formulação de produtos para o mercado de nutrição animal, tendo em vista seu teor de umidade, sua composição nutricional e os indicadores de mercado.

2.3.2. Farelo de trigo

O farelo de trigo é um material rico em hemiceluloses (30%), celulose (10-15%), amido (10-20%), proteínas (15-22%) e lignina (4-8%). Boa parte de suas reservas energéticas não podem ser aproveitadas diretamente pelos animais, e alguns

pré-tratamentos poderiam otimizar o aproveitamento de suas fontes energéticas, como biodegradação por intermédio de fungos. (Locci, 2008)

O farelo de trigo, além de ser um material rico em fibras, celulose e hemicelulose, se constitui como um potencial suporte para FES e também como suporte para formulações de produtos para o mercado de ração para animais.

2.3.3. Bagaço de cana

O bagaço de cana é constituído basicamente por celulose (50%), hemicelulose (25%) e lignina (25%), e contém baixo percentual de cinzas. (Soccol, 2000). Portanto, seu uso como suporte para o desenvolvimento de um produto para o mercado de ração animal é promissor.

2.3.4. Resíduo de Malte (*Brewer Spent Grain*)

É um material rico em amido (de 40 a 60%) e também em fibras (cerca de 20%). (Soccol, 2000) Possui baixos teores de sais, o que normalmente favorece processos fermentativos, por não inibir o crescimento dos agentes biológicos. Possui vantagens com relação ao bagaço de cana para o uso em fermentação no estado sólido, visto que, além de atuar como suporte, possui fontes de carbono mais facilmente assimiláveis (amido).

2.3.5. Casca de Soja

A casca de soja é um dos subprodutos do processamento do soja, e normalmente é destinada à suplementação para alimentação de animais. Contém cerca de 10% de proteína, 50% de fibra e não mais que 4% de gorduras totais (e baixo teor de carboidratos). Devido a alta concentração de proteínas e fibras, a casca de soja tem sido usada como suplemento para ração de animais, notadamente para peixes (Murray et. al, 2010).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Principal

Desenvolver um processo viável técnica e economicamente, cujo produto final seja uma farinha rica em L-Lisina.

3.2. Objetivos Complementares

São objetivos complementares:

- Seleção de cepas de *C. glutamicum* produtoras de L-Lisina
- Otimização de parâmetros do processo fermentativo para a maximização de produção de L-Lisina
- Obtenção de cepas mutantes com capacidade diferenciada de produção de L-Lisina;
- Seleção de suportes adequados, da agroindústria local ou nacional, para o desenvolvimento de uma farinha rica em L-Lisina para uso na alimentação animal.

4. Metodologias Analíticas

4.1. Quantificação de L-Lisina

As quantificações de L-Lisina descritas no presente trabalho foram determinadas (salvo quando especificado de outra forma) pelo protocolo de Chinard, um método colorimétrico (Chinard, 1952) (ver apêndice para curva de dosagem de L-Lisina).

O método de Chinard consiste na reação de ninhidrina (2,2-dihidroxi-hidrindeno-1,3-diona) com aminas primárias presentes em aminoácidos livres (particularmente com os de L-Lisina). A reação se dá em meio ácido (pH próximo de 1,0) e o produto formado possui cor avermelhada, que pode ser detectado e quantificado em espectrofotômetro.

4.2. Quantificação de Biomassa

Pelo menos 3 métodos foram empregados para a quantificação de biomassa ao longo deste trabalho, a saber:

- Contagem em placa (*drop plate*): 100 μ l do fermentado são coletados e diluídos de forma sucessiva em água peptonada, até se atingir diluição adequada. Em placa de Petri contendo meio sólido (ágar nutriente) são pingados 30 μ l da(s) diluição(ões) adequada(s). Após incubação em estufa (36 a 48 horas) e o crescimento das colônias procedia-se com a contagem manual e os cálculos eram feitos para fornecer resultado final em UFC/ml (unidades formadoras de colônia por ml).
- Peso seco: 1,8ml do fermentado foram coletados em tubos do tipo eppendorf e submetidos à centrifugação a 10.000rpm durante 10 minutos (centrífuga de eppendorfs Jouan A 14). Os eppendorfs foram previamente secos em estufas a 80 °C e tem seu peso aferido. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o conjunto eppendorf+sedimentado foi seco durante pelo menos 24h em estufa a 80 °C. A massa do conjunto foi aferida, e por diferença se estimou a massa do sedimentado (biomassa). Após cálculo de proporção, foi estimada a quantidade de biomassa do fermentado em g/l.
- Turbidimetria: 3ml do fermentado são coletadas em uma cubeta (e diluídas dependendo do caso, por um fator adequado, em água deionizada) e lidas a 660nm em espectrofotômetro UV-VIS (Spectrum SP-2000). Os resultados

foram comparados a uma curva de calibração previamente estabelecida, e convertidos a UFC/ml ou a g/l de biomassa (foi estabelecida também uma curva de conversão entre turbidimetria-peso seco ou turbidimetria-contagem em placa).

Em cada seção do trabalho onde se dosou biomassa, está especificada qual das técnicas foi utilizada (ver “Apêndice” para as correlações entre técnicas de dosagem de biomassa)

4.3. Quantificação de Açúcares

Quando necessário os açúcares redutores foram dosados pelo método do DNS (Miller, 1959).

5. Reativação, Conservação e Seleção de Cepas Produtoras de L-Lisina

Foram adquiridas inicialmente 7 linhagens bacterianas com potencial para produção de L-Lisina, de 3 Bancos Internacionais, a saber: Pasteur 828, Pasteur 7812, Pasteur 102640, NRRL B3330, ATCC 21513, ATCC 21543 e ATCC 21799.

As cepas foram recebidas na forma liofilizada e foram reativadas em erlenmeyers de 125ml (volume útil de 20ml) a 30 °C, sob agitação (120 rpm) em meio contendo caldo nutriente a 13g/l, durante 3 a 7 dias.

Após a reativação, foram repicadas em placas de Petri (com ágar nutriente a 17g/l) e incubadas em estufa a 30 °C. Após o crescimento das colônias (2 a 4 dias), colônias individuais foram repicadas para meios líquidos (caldo nutriente – 30ml de volume útil) e novamente cultivadas. Após crescimento, cada uma delas foi misturada a uma solução de glicerol 20% na proporção 1:1 e várias cópias de cada cepa (pelo menos 20) foram conservadas em freezer a -4 °C, para posterior uso. A pelo menos cada 6 meses as cepas foram repicadas e o protocolo de conservação foi repetido.

5.1. Testes Preliminares e Seleção das Melhores Produtoras

As 7 cepas conservadas em glicerol foram testadas com relação a sua capacidade de produção de L-Lisina. O objetivo dessa triagem inicial foi identificar as melhores cepas produtoras em um meio de cultivo líquido básico, para seguir apenas com as melhores em testes mais minuciosos.

Materiais e Métodos

A tabela 1 mostra a composição do meio de cultivo utilizado, com baixa concentração de fontes de carbono (glicose) e nitrogênio orgânico (caldo nutriente) e com micronutrientes essenciais e vitaminas (concentrações de sais e vitaminas fixadas de acordo com a observação de outros trabalhos com cepas de *C. glutamicum*) (Coello, 2000; Ohnishi, 2005; Tada, 2001; Sassi, 1998; Becker, 2007).

Tabela 1 – composição dos meios de cultivo usados para os primeiros testes de produção de L-Lisina com 7 cepas reativadas

Componente	Concentração
Glicose	40g/l
Caldo nutriente	13g/l
Sais	
K ₂ HPO ₄	1g/l
KH ₂ PO ₄	3g/l
NaCl	1g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4g/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	10mg/l
MnSO ₄ .4H ₂ O	10mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	55mg/l
Vitaminas	
Biotina	400 ug/l
Tiamina	400 ug/l

Os componentes foram autoclavados separadamente para evitar a formação de compostos tóxicos, em autoclave vertical, durante 15 minutos a 1atm, exceto as vitaminas, que foram esterilizadas por filtração em membranas de 22 μ m (Milipore). As provas fermentativas foram conduzidas em erlenmeyers de 125ml (volume útil de 30ml). A taxa de inoculação foi padronizada em 5% (a partir das cepas conservadas, conforme descrito no tópico anterior), a temperatura em 30 °C, a agitação em 120 rpm e o pH inicial do meio foi ajustado a 7,2, e as coletas para análise de concentração de

L-lisina foram feitas as 72 horas de cultivo (a partir desse ponto essas condições serão denominadas “condições padrão”).

Observação: durante este relato, sempre que uma nova formulação for apresentada, ficará subentendido que se procedeu de forma similar (autoclavagem separada dos componentes e filtração das vitaminas). Caso haja algum detalhe particularmente importante no preparo do meio, será citado. Da mesma forma, caso alguma condição (como temperatura, pH, taxa de inoculação, agitação, tempo de fermentação) seja diferente das definidas anteriormente, o fato será evidenciado.

Resultados

Os resultados dos testes preliminares para identificação de cepas produtoras de L-lisina estão na tabela 2:

Tabela 2 – Produção de L-Lisina pelas 7 cepas reativadas em meio líquido sintético

Cepa	Produção de L-Lisina (g/l)
Pasteur 828	-
Pasteur 7812	0,14
Pasteur 102604	-
NRRL B3330	1,56
ATCC 21513	1,48
ATCC 21543	0,56
ATCC 21799	1,38

O experimento foi satisfatório, pois mostrou que algumas das cepas testadas têm potencial para produção de L-Lisina.

O melhor resultado foi obtido pela cepa NRRL B3330, seguido pelas cepas do ATCC. As cepas do Instituto Pasteur, por apresentarem produções muito baixas ou não detectadas, não foram mais utilizadas a partir deste momento.

Os resultados ainda são bastante modestos quando comparados aos dados de literatura – 20g/l por (Kiefer, 2002); 30 g/l por (Coello, 2000); 75g/l (Tada, 2001). No entanto, o objetivo desta etapa era identificar potenciais produtoras de L-Lisina, e a partir delas elaborar novos experimentos tendo em vista o aumento da produção do aminoácido.

6. Otimização de Parâmetros de Fermentação para Produção de L-Lisina

6.1. Fontes de Nitrogênio

6.1.1. Testes com Fontes Inorgânicas de Nitrogênio e em Meios com Ausência e Presença de Sais e Vitaminas com a Cepa NRRL B3330

Inicialmente a cepa NRRL B3330 foi escolhida para a sequência dos trabalhos, cujo objetivo imediato era a substituição da fonte orgânica de nitrogênio (caldo nutriente) por uma fonte inorgânica, e também a verificação da importância de se manter sais e vitaminas como componentes do meio de cultivo.

Materiais e Métodos

Foram feitas provas comparativas usando meios com e sem sais, com e sem vitaminas e com algumas fontes inorgânicas em substituição ao caldo nutriente.

A tabela 3 apresenta as formulações utilizadas de forma detalhada:

Tabela 3 – formulações usadas para o cultivo de *C. glutamicum* NRRL B3330 na ausência e presença de sais e vitaminas e com fontes variadas de nitrogênio

Meio	Glicose (g/l)	Caldo nutriente (g/l)	Sais*	Vitaminas**	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	NH ₄ NO ₃ (g/l)	Uréia (g/l)
AI	40	13	-	-	-	-	-
AII	40	13	Sim	-	-	-	-
AIII	40	13	-	Sim	-	-	-
AIV	40	13	Sim	Sim	-	-	-
BI	40	-	-	-	10	-	-
BII	40	-	-	-	-	10	-
BIII	40	-	-	-	-	-	10
BIV	40	-	-	-	3,3	3,3	3,3
CI	40	-	Sim	Sim	10	-	-
CII	40	-	Sim	Sim	-	10	-
CIII	40	-	Sim	Sim	-	-	10
CIV	40	-	Sim	Sim	3,3	3,3	3,3

* Foram utilizados os mesmos sais, e nas mesmas concentrações com relação à tabela 1

** Foram utilizadas as mesmas vitaminas e nas mesmas concentrações com relação à tabela 1

Foram dosadas a biomassa (por turbidimetria, e convertidas em peso seco segundo a metodologia descrita na seção “dosagem de biomassa”) e a produção de L-Lisina após 72 horas de cultivo.

Resultados e Discussão

Os resultados estão resumidos na tabela 4:

Tabela 4 – Resultados da produção de biomassa e L-Lisina pela cepa NRRL B3330 na ausência e presença de sais e vitaminas e com fontes variadas de nitrogênio

Meio	Biomassa (g/l)	L-Lisina (g/l)
AI	7,1	1,3
AII	7,8	2,2
AIII	6,8	1,5
AIV	7,6	1,8
BI	0,3	-
BII	0,6	-
BIII	0,3	-
BIV	0,9	-
CI	2,7	-
CII	1,9	-
CIII	0,3	-
CIV	1,7	-

Os resultados da tabela 4 mostram que a cepa NRRL B3330 não metaboliza de forma adequada fontes inorgânicas de nitrogênio, e não produz L-Lisina na ausência de fonte orgânica de nitrogênio. Fica também evidente que a presença de sais foi importante para a produção de biomassa (7,8g/l na presença de sais e com fonte orgânica de N contra 7,1g/l na ausência de sais e com fonte orgânica de N) e principalmente para a produção de L-Lisina (2,2g/l contra 1,3g/l). As vitaminas não exerceram impacto importante na produção de L-Lisina (em meio com fonte orgânica de N e ausência de sais, 1,5g/l contra 1,3g/l na presença e ausência de vitaminas respectivamente; em meio com fonte orgânica de N e presença de sais, 1,8g/l e 2,2g/l na presença e ausência de vitaminas respectivamente).

A análise dos resultados motivou estudos com outras cepas, no intuito de verificar se alguma delas possuía a habilidade de crescer e produzir L-Lisina em fontes inorgânicas de N, e ainda, chamam a atenção para uma investigação mais detalhada sobre o efeito da presença de sais e vitaminas no meio de cultivo.

6.1.2. Testes com Fontes Inorgânicas de Nitrogênio com as Cepas ATCC 21513, ATCC 21543 e ATCC 21799

Segundo os dados da tabela 1, após a cepa B3330, as cepas do ATCC foram as melhores produtoras de L-Lisina em meios sintéticos. Portanto, as 3 cepas do ATCC foram escolhidas para novos testes com fontes inorgânicas de nitrogênio.

Materiais e Métodos

O plano foi simplificado para reduzir o número de experimentos, de acordo com a tabela 5.

Tabela 5 - formulações usadas para o cultivo de *C. glutamicum* ATCC 21513, ATCC 21543 e ATCC 21799 com fontes variadas de nitrogênio

Meio	Glicose (g/l)	Caldo nutriente (g/l)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	NH ₄ NO ₃ (g/l)	Uréia (g/l)
I	40	13	-	-	-
II	40	-	10	-	-
III	40	-	-	10	-
IV	40	-	-	-	10
V	40	-	3,3	3,3	3,3

Para não tornar o experimento demasiadamente complexo, os sais e vitaminas foram mantidos, nas mesmas concentrações exibidas na tabela 1.

Resultados e Discussão

Os resultados para a produção de biomassa (determinados por turbidimetria e convertidos em peso seco) e L-Lisina são exibidos na tabela 6.

Tabela 6 – resultados de produção de biomassa e L-Lisina pelas cepas de *C. glutamicum* ATCC 21513, ATCC 21543 e ATCC 21799 com fontes variadas de nitrogênio

Meio	Biomassa (g/l)			L-Lisina (g/l)		
	ATCC 21513	ATCC 21543	ATCC 21799	ATCC 21513	ATCC 21543	ATCC 21799
I	6,9	4,8	7,1	1,6	0,5	1,5
II	1,6	1,3	5,9	0,0	0,2	1,7
III	1,2	0,7	1,7	0,0	0,0	0,0
IV	4,8	1,7	2,9	0,0	1,0	0,0
V	6,4	3,7	2,9	0,0	0,3	0,4

Todas as cepas (ATCC 21513, ATCC 21543 e ATCC 21799) produziram quantidades significativas de biomassa quando cultivadas em fonte orgânica de N (6,9g/l; 4,8g/l e 7,1g/l, respectivamente) e de L-Lisina (1,6g/l; 0,5g/l e 1,5g/l, respectivamente). Com fontes inorgânicas, os comportamentos foram variados. A ATCC 21513 se desenvolveu bem na presença de uréia (4,8g/l de biomassa) e na

mistura de uréia, sulfato de amônio e nitrato de amônio (6,4g/l de biomassa), mas em nenhum dos casos houve produção de L-Lisina. A cepa ATCC 21543 cresceu bem na mistura das 3 fontes inorgânicas (3,7g/l de biomassa) mas produziu apenas 0,3g/l de L-Lisina nessa condição, enquanto produziu uma quantidade um pouco menor de biomassa na presença exclusiva de uréia (1,7g/l), mas produziu mais L-Lisina (1,0g/l). Em presença exclusiva de sulfato de amônio ou de nitrato de amônio as produções de biomassa foram baixas, e houve pouca ou nenhuma produção de L-Lisina. A cepa ATCC 21799 se adaptou melhor ao meio contendo sulfato de amônio, com produções expressivas de biomassa (5,9g/l) e de L-Lisina (1,7g/l), com produções inferiores de biomassa e L-Lisina nas demais condições.

A análise dos resultados elege a cepa ATCC 21799 para os ensaios com ausência e presença de sais e vitaminas, e destaca o sulfato de amônio como possível substituinte de fontes orgânicas para experimentos futuros.

6.2. Sais e Vitaminas

6.2.1. Testes na Ausência e Presença de Sais e Vitaminas com a Cepa ATCC 21799

Experimentos anteriores com a cepa NRRL B3330 evidenciaram a importância da presença de sais para a produção de L-Lisina. Todavia, o uso de biotina e tiamina não se mostraram imprescindíveis. Um novo teste foi feito para verificar se tal comportamento se repete para a cepa ATCC 21799 (que se mostrou eficiente na utilização de fonte inorgânica de nitrogênio).

Materiais e Métodos

Foram preparados 4 meios de cultivo, todos com glicose e caldo nutriente: um na ausência de sais e vitaminas, um na presença apenas de sais, um na presença apenas de vitaminas e finalmente um na presença de sais e vitaminas, conforme a tabela 7:

Tabela 7 - formulações usadas para o cultivo de *C. glutamicum* ATCC 21799 na ausência e presença de sais e vitaminas

Meio	Glicose (g/l)	Caldo nutriente (g/l)	Sais*	Vitaminas*
I	40	13	-	-
II	40	13	Sim	-
III	40	13	-	Sim
IV	40	13	Sim	Sim

* Foram utilizados os mesmos sais, e nas mesmas concentrações com relação à tabela 1

** Foram utilizadas as mesmas vitaminas e nas mesmas concentrações com relação à tabela 1

Resultados e Discussão

A tabela 8 exibe a produção celular e a produção de L-Lisina pela cepa ATCC 21799 nos meios apresentados na tabela 7:

Tabela 8 – Resultados de produção de biomassa e L-Lisina pela cepa ATCC 21799 na ausência e presença de sais e vitaminas

Meio	Biomassa (g/l)	L-Lisina (g/l)
I	4,3	-
II	5,8	1,7
III	4,2	0,4
IV	7,1	1,4

Os resultados deixam claro que a presença de sais foi fundamental para a produção de L-Lisina pela cepa ATCC 1799 (produção de 1,7g/l e 1,4g/l na presença de sais; produção não detectada e de 0,4g/l na ausência de sais). No entanto, não fica evidente que as vitaminas têm papel relevante (produção não detectada e de 1,7g/l na ausência de vitaminas; produção de 0,4g/l e 1,4g/l na sua presença).

A análise desses resultados motiva um teste mais detalhado para verificar a importância individual de cada sal e de cada vitamina na produção de L-Lisina pela cepa ATCC 21799.

6.2.2. Determinação da Influência individual dos Sais e Vitaminas para Produção de L-lisina pela cepa ATCC 21799

Materiais e Métodos

Para testar individualmente o efeito de cada sal e de cada vitamina sobre a produção de L-Lisina pela cepa ATCC 21799, foi proposto um planejamento experimental do tipo Plackett-Burmann. A tabela 9 exibe a matriz usada.

Tabela 9 – Matriz de experimentos (tipo Plackett-Burmann) para verificação do efeito individual de cada sal na produção de L-Lisina pela cepa ATCC 21799

Ensaio	*K ₂ HPO ₄ + KH ₂ PO ₄	MnSO ₄ .4H ₂ O	FeSO ₄ .7H ₂ O	MgSO ₄ .7H ₂ O	NaCl	CaCl ₂ .2H ₂ O	Biotina	Tiamina
1	1	-	1	-	-	-	1	1
2	1	1	-	1	-	-	-	1
3	-	1	1	-	1	-	-	-
4	1	-	1	1	-	1	-	-
5	1	1	-	1	1	-	1	-
6	1	1	1	-	1	1	-	1
7	-	1	1	1	-	1	1	-
8	-	-	1	1	1	-	1	1
9	-	-	-	1	1	1	-	1
10	1	-	-	-	1	1	1	-
11	-	1	-	-	-	1	1	1
12	-	-	-	-	-	-	-	-

* Por se tratar de um par de sais com conhecida função conjugada, foram tratados conjuntamente

Na tabela 9, o nível 1 corresponde à presença do respectivo sal ou vitamina (na concentração definida na tabela 1), e o símbolo “-“ corresponde a sua ausência.

Em cada um dos 12 ensaios foi utilizado um meio contendo 40g/l de glicose e 13g/l de caldo nutriente e condições padrão. As amostras foram colhidas ao final de 72 horas para análise do conteúdo de L-Lisina.

Além dos 12 ensaios também foram executados 3 ensaios adicionais (ponto central), contendo também 40g/l de glicose e 13g/l de caldo nutriente e todos os sais e vitaminas presentes (concentrações dadas na tabela 1).

Resultados e Discussão

A tabela 10 mostra os resultados para os ensaios descritos anteriormente:

Tabela 10 – Produção de L-Lisina pela cepa ATCC 21799 para o ensaio Plackett-Burmann para avaliação do efeito individual de sais e vitaminas

Ensaio	L-Lisina (g/l)
1	1,6
2	1,8
3	1,4
4	1,5
5	1,7
6	2,5
7	2,6
8	1,4
9	1,1
10	1,0
11	1,6
12	0,7
Ponto Central	1,9
	1,8
	2,2

E a figura 3 mostra o gráfico de Pareto (Statistica 5.0) para esses resultados:

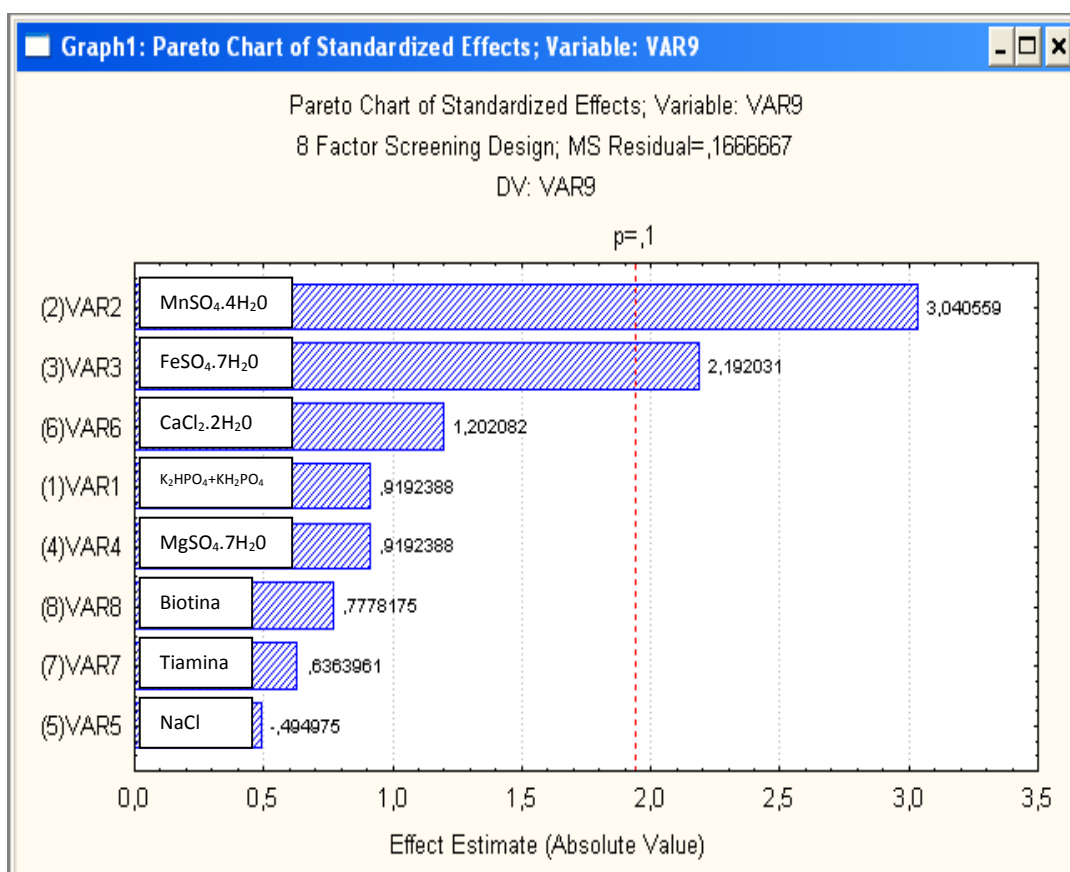


Figura 3 – Gráfico de Pareto ao nível de significância de 90% exibindo o efeito relativo individual de sal e de cada vitamina sobre a produção de L-Lisina para a cepa ATCC 21799

A análise dos resultados permite concluir que apenas os sais de Manganês e de Ferro tem efeito significativo individual ao nível de significância de 90% (3,04 e 2,19, respectivamente). No entanto, todos os sais (exceto o cloreto de sódio) possuem efeito positivo sobre a produção, muito embora mais modestos. Sendo assim, todos os sais foram considerados importantes e mantidos para experimentos futuros, exceto o cloreto de sódio, que foi excluído a partir deste ponto, por apresentar efeito levemente negativo (-0,49) sobre a produção de L-Lisina. Sobre as vitaminas, são compostos caros, e demandam esterilização diferenciada (uso de microfiltros), dificultam os processos de formulação do meio e muitas vezes seu uso, pela manipulação adicional, favorecem a contaminação dos meios de cultivo. Os resultados apresentados no tópico anterior (tabela 8) e no tópico atual (tabela 9 e gráfico 1) justificam a retirada de ambas para os experimentos seguintes, por apresentarem impacto muito baixo sobre a produção de L-Lisina (da figura 3, 0,78 para a biotina e 0,64 para a tiamina, resultados inferiores a todos os sais, exceto o cloreto de sódio).

6.3. pH e Agentes Tamponantes

6.3.1. Importância do pH e Testes para Escolha de Tampão Adequado

Em diversos testes realizados até este ponto do trabalho, percebera-se que o pH dos meios fermentados era bastante baixo, geralmente entre 4,0 e 5,0 (resultados não exibidos). Na expectativa de estabilizar o pH do meio líquido ao longo da fermentação, e o deixar mais próximo da faixa ideal para o crescimento das linhagens de *Corynebacterium glutamicum* e consequente produção de L-Lisina (entre 7,0 e 7,4) alguns tampões clássicos foram testados: tampão acetato, tampão fosfato e carbonato de cálcio.

Materiais e Métodos

Foram preparados meios de cultivo com glicose (40g/l), caldo nutriente 13g/l) e sais (conforme seleção feita ao final do tópico anterior, ou seja, todos os sais da tabela 1 exceto o cloreto de cálcio). Esse meio será chamado “meio base”.

Os compostos usados para estabilizar o pH do meio foram: tampão acetato; tampão fosfato e carbonato de cálcio. As molaridades dos tampões acetato e fosfato no meio final foram ajustadas (conforme exibido na tabela 11) de forma que estivessem na região de tamponamento da neutralidade (ao redor do pH 7,0). A

concentração do carbonato de cálcio foi definida com base na literatura. A cepa ATCC 21799 foi cultivada em cada um desses meios, amostras foram coletadas ao final do 3º dia de cultivo, e foram dosadas a biomassa, a L-Lisina produzida, os açúcares remanescentes e foi medido o pH final (lembrando que o pH inicial foi ajustado em 7,2 para todos os meios).

A tabela 11 mostra a composição final dos meios de cultivo utilizados:

Tabela 11 – Composição dos meios utilizados para a seleção de compostos estabilizadores do pH em fermentações com a cepa ATCC 21799

Meio	*Meio base	Acetato (M)	Fosfato (M)	CaCO ₃ (g/l)
I	Sim	-	-	-
II	Sim	0,26	-	-
III	Sim		0,12	-
IV	Sim	-	-	30

* Definido em “Materiais e Métodos” da seção presente

Resultados e Discussão

Os resultados são exibidos na tabela 12

Tabela 12 – Produção de biomassa e L-Lisina, concentração remanescente de açúcar redutor e medição do pH após 3 dias de fermentação pela cepa ATCC 21799 em meios com diferentes agentes tamponantes

Meio	Açúcares (g/l)	Biomassa (g/l)	L-Lisina (g/l)	ph
I	7,4	6,2	1,9	4,45
II	23,7	2,3	1,8	4,63
III	26,6	1,9	1,8	4,81
IV	1,3	7,6*	4,6	6,76

* A determinação de biomassa em meio contendo carbonato de cálcio é inviável por turbidimetria. Quando necessário, é feita uma contagem celular pelo método do drop plate, e o resultado é convertido a g/l pela correlação estabelecida na seção “Dosagem de Biomassa”

Os resultados da tabela 12 mostram que a maior produção de biomassa, o maior consumo de açúcares e a maior produção de L-Lisina (7,6g/l; 38,7g/l e 4,6g/l) ocorreram quando o carbonato de cálcio foi usado como agente tamponante. Também fica claro que o pH final foi fortemente influenciado pela presença do carbonato de cálcio (6,76, contra 4,45 do controle). Os outros tampões, por motivos ainda não esclarecidos, não favorecem o desenvolvimento de biomassa, o que se pode observar pelas baixas concentrações de biomassa obtidas e pelo baixo consumo de açúcares do meio, muito embora a produção de L-Lisina seja similar à do controle.

O carbonato de cálcio passou a ser usado deste ponto em diante do trabalho como agente tamponante.

Observação: alguns testes foram feitos para definir a melhor concentração de carbonato de cálcio no meio. Os resultados (não exibidos) indicaram que não foi necessário usar mais do que 20g/l de CaCO₃. Esse valor foi estabelecido como padrão a partir daqui.

6.4. Altas Concentrações de Fontes de Carbono e Nitrogênio

6.4.1. Testes com Altas Concentrações de Glicose e Sulfato de Amônio

Os resultados até aqui apresentados sugerem que a cepa ATCC 21799 poderia ter sua capacidade de produção de L-Lisina aumentada se cultivada em meios com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, com sais e com carbonato de cálcio como agente tamponante. Ainda, não ficara claro se a presença de fontes orgânicas de nitrogênio era ou não dispensável, e também ainda não se podia afirmar se meios com quantidades mais altas de fonte de carbono poderiam melhorar a produção de L-Lisina.

Os testes a seguir buscaram responder às questões levantadas. Neles, ainda, foram consideradas outras duas cepas, para que se pudesse certificar que a cepa ATCC 21799 é de fato a melhor produtora em condições já diferentes daquelas testadas nos passos iniciais do trabalho.

Materials e Métodos

Foram utilizados dois meios de cultivo distintos: um “controle” com relação à fonte de nitrogênio (somente com fonte orgânica de N) e outro com altas concentrações de glicose e sulfato de amônio, e com uma quantidade baixa de caldo nutriente (concentrações definidas previamente – resultados não exibidos). A tabela 13 mostra em detalhes a composição dos meios:

Tabela 13 – Composição dos meios para testes com altas concentrações de fontes de carbono

Meio	Glicose (g/l)	Caldo nutriente (g/l)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)
A	80	13	-
B	80	2,6	75

Ambos os meios possuíam 20g/l de CaCO₃ e sais conforme a tabela 1 (exceto o NaCl). Foram cultivadas as cepas ATCC 21513, ATCC 21543 e ATCC 21799 em cada um dos meios, foram coletadas amostras a cada 24 horas de fermentação até o

quinto dia e foram determinadas as quantidades de açúcares redutores remanescentes, a produção de L-Lisina e o pH do meio.

OBS: foi coletado um ponto adicional para análise de açúcares e pH no tempo 156h (6 dias e meio).

Resultados e Discussão

Apenas os resultados das 72 horas de cultivo são exibidos na tabela 14, para facilitar eventuais comparações com outras tabelas deste trabalho.

Tabela 14 – consumo de açúcares (exibido na forma de açúcares remanescentes), produção de L-Lisina e pH final em meios com altas concentrações de carbono às 72 horas de fermentação – cepas ATCC 21513, ATCC 21543 e ATCC 21799

Meio	Açúcares (g/l)			L-Lisina			*pH		
	21513	21543	21799	21513	21543	21799	21513	21543	21799
A	13	38	54	4,2	1,1	4,3	6,2	5,6	6,2
B	73	47	22	0,1	4,9	5,7	8,1	7,4	7,5

* o pH inicial, previamente à autoclavagem, é ajustado a 7,2, como de costume, no entanto, após a autoclavagem pode haver alterações em seu valor. No presente experimento o pH inicial, para a maior parte dos frascos, imediatamente após autoclavagem e mistura dos componentes, ficou em torno de 7,5, como pode ser visto em detalhes na figura 5.

A cinética detalhada do experimento é exibida nas figuras 4, 5 e 6.

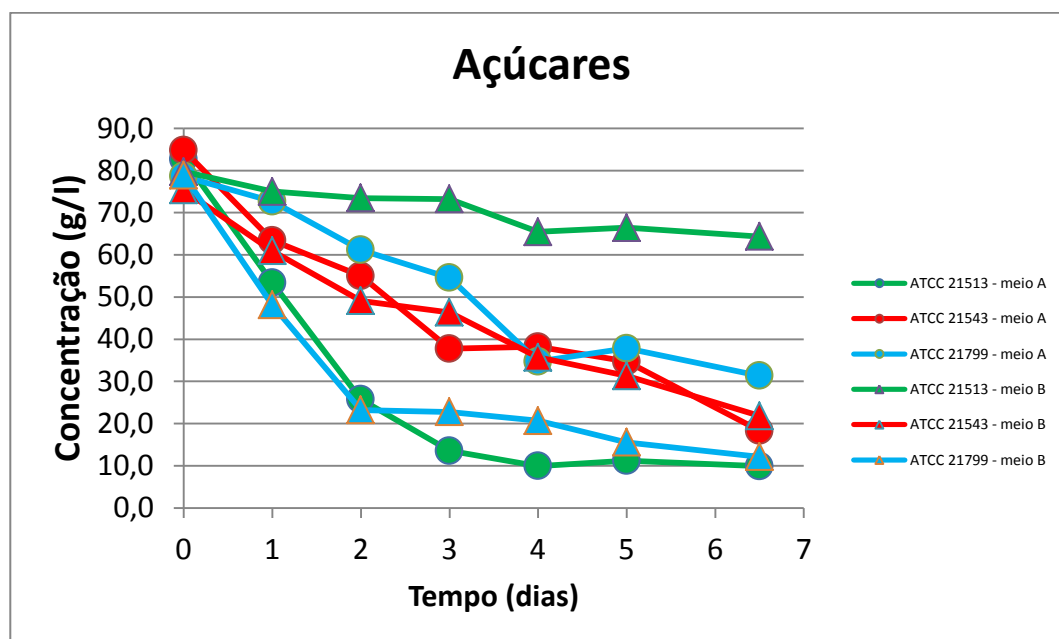


Figura 4 – perfil de consumo de açúcares pelas cepas ATCC 21513, ATCC 21543 e ATCC 21799 em meios com altas concentrações de fonte de carbono.

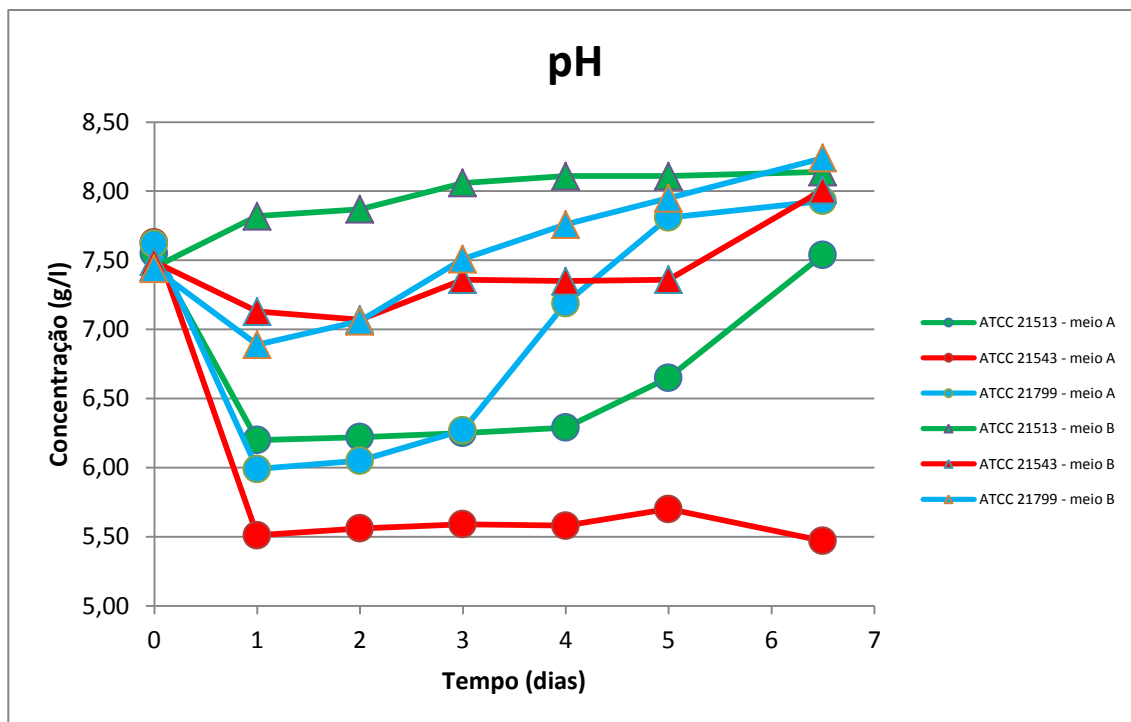


Figura 5 – perfil de pH durante o processo fermentativo com as cepas ATCC 21513, ATCC 21543 e ATCC 21799 em meios com altas concentrações de fonte de carbono.

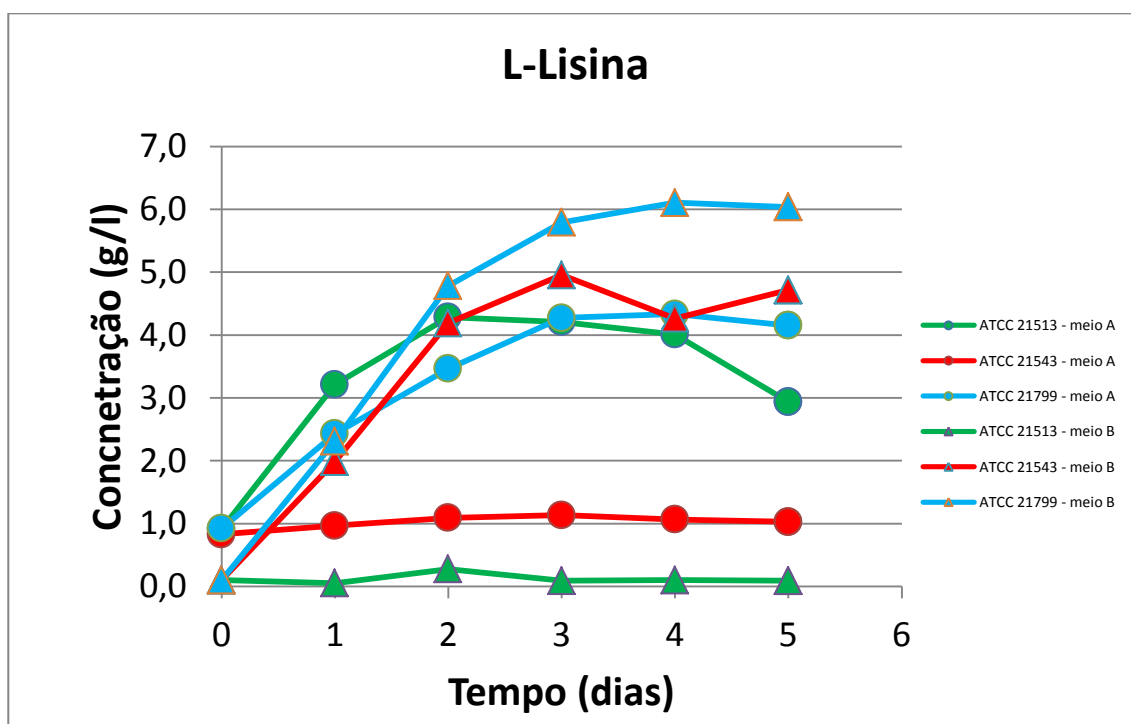


Figura 6 – perfil de produção de L-Lisina pelas cepas ATCC 21513, ATCC 21543 e ATCC 21799 em meios com altas concentrações de fonte de carbono.

Os resultados da tabela 14 e das figuras 4 e 6 deixam claro que a cepa ATCC 21513 possui grande dificuldade para se desenvolver em meio contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (o que já se esperava por resultados anteriores) e, conseqüentemente, para produzir L-Lisina, no entanto, pode produzir quantidades razoáveis de L-Lisina em meios com fonte orgânica de nitrogênio (até 4,6g/l de L-Lisina, ver tabela 12).

A cepa ATCC 21543 foi capaz de consumir de forma satisfatória os açúcares (e com perfis similares – ver figura 4) de ambos os meios, e de forma inesperada, produziu quantidade significativa de L-lisina no meio B (4,9g/l ao terceiro dia), enquanto no meio A produziu apenas 1,1 g/l. Os resultados contradizem experimentos anteriores, mas podem ser explicadas as diferenças, possivelmente, pela presença de carbonato de cálcio.

Os melhores resultados, no entanto, continuam sendo apresentados pela cepa ATCC 21799. Ela se adaptou muito bem ao meio B, apresentando altas taxas de consumo de açúcares nos primeiros dias de cultivo, e com pico de produção de L-Lisina ao redor do terceiro dia (próximo a 6,0g/l).

A evolução do pH foi similar considerando as diferentes cepas. Para o meio A, o pH cai rapidamente nos primeiros dias de fermentação (em uma faixa de 5,5 a 6,2) e sobe para a faixa de neutralidade após o quarto dia (exceto para a cepa ATCC 21543, para a qual o pH estabiliza em zona de baixa acidez). Para o meio B o pH tem leve tendência de queda durante os primeiros dias mas se manteve na faixa da neutralidade durante todo o cultivo, para as 3 cepas. O experimento mostra que o carbonato de cálcio realmente foi capaz de tamponar o meio, e tal tendência foi acentuada nos meios com altas concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que, ao que tudo indica, também colabora para a manutenção da neutralidade em altas concentrações.

A análise dos resultados, portanto, indica mais uma vez a cepa ATCC 21799 como melhor produtora, indica a possibilidade de se continuar usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio e CaCO_3 como um eficiente agente tamponante, e mostra que a linhagem foi capaz de se desenvolver e produzir L-Lisina em concentrações mais interessantes em meios com altas concentrações de fonte de carbono.

6.4.2. Otimização da Proporção entre Fonte Orgânica e Inorgânica de Nitrogênio para Produção de L-lisina pela Cepa ATCC 21799

O objetivo deste experimento foi determinar o ponto ótimo para a relação entre as concentrações de fonte orgânica (caldo nutriente) e inorgânica ((NH₄)₂SO₄) de nitrogênio para maximizar a produção de L-Lisina pela melhor cepa produtora (ATCC 21799)

Materials e Métodos

Foram preparados meios de cultivo com concentração fixa de glicose (80g/l), carbonato de cálcio (20 g/l) e sais (conforme descrito na tabela 1, exceto pelo NaCl) e com concentrações variáveis de caldo nutriente e (NH₄)₂SO₄, de acordo com um planejamento Composto Central Rotacional, como descrito na tabela 15:

Tabela 15: definição dos níveis de caldo nutriente e (NH₄)₂SO₄ para um DCCR , cuja variável a ser otimizada é a produção de L-Lisina pela cepa ATCC 21799

Variável	Nível				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	1	$\sqrt{2}$
(NH ₄) ₂ SO ₄	39,6	50,0	75,0	100,0	110,4
Caldo nutriente (g/l)	0,76	2,00	5,00	8,00	9,24

Os ensaios foram conduzidos em duplicata (exceto pelo ponto central, em triplicata). Amostras foram coletadas ao término do terceiro dia de fermentação e a concentração de L-Lisina foi determinada para cada ponto.

Resultados e Discussão

Os resultados, com os respectivos desvios-padrão são apresentados na tabela 16:

Tabela 16: Resultados do DCCR para otimização da produção de L-Lisina pela cepa ATCC 21799 com relação às concentrações de nutriente e (NH₄)₂SO₄

*Caldo nutriente	*(NH ₄) ₂ SO ₄	L-Lisina (g/l)	Desvio padrão (g/l)
-1	-1	5,0	0,16
-1	1	4,1	0,95
1	-1	5,3	0,61
1	1	2,9	0,85
$-\sqrt{2}$	0	4,9	0,55
$\sqrt{2}$	0	5,1	0,11
0	$-\sqrt{2}$	5,4	0,04
0	$\sqrt{2}$	2,8	0,30
0	0	6,0	0,46

* Dados pelos níveis, conforme definidos na tabela 15

Os dados foram submetidos à análise usando o Programa Statistica 5.0, e a equação da superfície quadrática que melhor se ajustou aos dados experimentais (pelo método de redução das diferenças quadráticas) é descrita a seguir:

$$Z = 5,92 - 0,067X - 0,37X^2 - 0,81Y - 0,782Y^2 - 0,34XY \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

- Z é a produção de L-Lisina
- X é o nível de caldo nutriente (de acordo com a tabela 15)
- Y é o nível de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (de acordo com a tabela 15)

O par (X,Y) que otimiza a função dada pela equação 1 foi (0,16;-0,55) e convertendo tal para concentrações reais de caldo nutriente e sulfato de amônio (ver tabela 15) o ponto teórico ótimo para a maximização da produção de L-Lisina seria:

* Caldo nutriente: 5,5g/l e sulfato de amônio: 61g/l

Usando o par (0,16;-0,55) na equação 1 teríamos a seguinte produção ótima de L-Lisina: 6,14g/l.

Um teste em triplicata foi feito usando a condições ótimas (5,5g/l de caldo nutriente e 61g/l de sulfato de amônio) e os resultados de produção de L-Lisina obtidos foram: 5,6g/l; 6,3g/l e 5,8g/l. A média foi de 5,87g/l, com desvio-padrão de 0,31g/l. Ou seja, o valor predito pelo modelo está na faixa $5,87 \pm 0,31$ g/l.

A partir deste ponto, passou-se a usar as concentrações de caldo nutriente em 5,5g/l e de sulfato de amônio em 61g/l nas formulações.

7. Produção de L-Lisina em Meios Formulados

7.1. Produção de L-Lisina em Meio com Batata-Doce

Após otimização do meio de cultivo sintético, buscou-se utilizar uma fonte de carbono mais barata para substituir a glicose, e a escolha foi a batata-doce, por uma série de motivos: ser um dos produtos agrícolas mais baratos no estado do Paraná; com grande disponibilidade no mercado; ser sabidamente uma rica fonte de açúcares simples; ser usada em linhas de pesquisa do LPB (Laboratório de Processos Biotecnológicos) da UFPR.

Os experimentos foram divididos em dois blocos:

* No primeiro bloco se investigaram 3 variedades de batata-doce, para a seleção daquela que permitisse maior produção de L-Lisina, e também foi verificada a necessidade de suplementação com sais. Ressalta-se que, nos testes com meio sintético, foi comprovado que os sais desempenham papel essencial não somente para o crescimento das cepas de *C. glutamicum*, mas principalmente para a produção de L-Lisina. Ocorre que raízes como a batata-doce sabidamente são ricas em sais e cinzas, e muitas vezes torna-se desnecessária, ou mesmo prejudicial, a adição de sais para cultivos microbianos;

* No segundo bloco se investigou a possibilidade de eliminar a fonte orgânica comercial de nitrogênio (caldo nutriente). Nos experimentos anteriores ficou demonstrada a importância de se suplementar o meio de produção com caldo nutriente, pois o sulfato de amônio como única fonte de nitrogênio não proporcionou os melhores resultados (ver equação 1 e resultado do teste de otimização da seção anterior). A fonte orgânica de nitrogênio usada como possível substituinte ao caldo nutriente foi a milhocina, um subproduto do processamento do milho. A milhocina é um insumo relativamente barato e gerado em abundância no estado do Paraná.

Materiais e Métodos

* Primeiro bloco

Todos os meios foram preparados com 20g/l de CaCO_3 ; 61g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 5,5g/l de caldo nutriente (meio basal* - ver tabela 17). Os ensaios foram realizados em condições-padrão, conforme relatado nas primeiras seções deste trabalho. Foram testadas 3 variedades de batata-doce, que chamaremos de “amarela”, “roxa” e “branca”, encontradas no Mercado Municipal de Curitiba. A bactéria utilizada para as fermentações foi a ATCC 21799.

O hidrolisado de batata-doce foi preparado de acordo com o seguinte protocolo: a batata-doce foi cortada, seca, moída e peneirada. 150g da fração de 0,8 a 2,0mm foram tomados, e diluídos em água. Foram acrescentados 10ml de ácido clorídrico concentrado e água foi adicionada até que se atingisse a massa de 1kg. O frasco contendo o material foi submetido à autoclavagem a 1atm durante 15 minutos. O material foi resfriado e o pH da suspensão foi ajustado a 7,0 com auxílio de solução NaOH a 5M. A suspensão finalmente foi peneirada e o material ficou pronto para ser

usado na formulação dos meios de cultivo (este hidrolisado tinha cerca de 75g/l de açúcares redutores, e podia sofrer variações de até 15% dependendo da variedade da batata-doce e das raízes usadas).

A tabela 17 mostra a composição dos meios testados:

Tabela 17: composição dos meios de cultivo utilizados para avaliar a melhor linhagem de batata-doce para produção de L-lisina e a necessidade de suplementação com sais (para fermentação por ATCC 21799)

Meio	Meio basal*	Batata-doce	Sais**
IA	Sim	Amarela (150g/l)	Sim
IB	Sim	Amarela (150g/l)	Não
IIA	Sim	Roxa (150g/l)	Sim
IIB	Sim	Roxa (150g/l)	Não
IIIA	Sim	Branca (150g/l)	Sim
IIIB	Sim	Branca (150g/l)	Não

* 20g/l de CaCO₃; 61g/l de (NH₄)₂SO₄; 5,5g/l de caldo nutiente

** Conforme tabela 1 (exceto NaCl)

Resultados e Discussão

* Primeiro bloco

Os resultados do bloco 1 são exibidos na tabela 18:

Tabela 18: Produção de L-lisina em meios com batata-doce com e sem sais ao término do terceiro dia de fermentação (fermentação por ATCC 21799)

Meio	L-Lisina (g/l)
IA	5,4
IB	6,7
IIA	4,3
IIB	5,7
IIIA	3,3
IIIB	5,3

Para todas as variedades de batata-doce, a suplementação com sais prejudicou a produção de L-Lisina. A variedade que proporcionou os melhores resultados foi a “amarela” (6,7g/l de L-Lisina sem suplementação de sais) e foi selecionada para a próxima bateria de experimentos.

Materiais e Métodos

* Segundo bloco

Assim como no primeiro bloco, as provas fermentativas foram conduzidas nas condições padrão, e sempre com 20g/l de CaCO₃. Os sais foram eliminados (devido

aos resultados do primeiro bloco), a variedade de batata-doce usada foi a “amarela” e a cepa microbiana foi a ATCC 21799. A milhocina utilizada para os experimentos foi gentilmente cedida pela empresa *Corn Products* situada na Região Metropolitana de Curitiba.

A composição das formulações utilizadas está detalhada na tabela 19:

Tabela 19: Composição de meios de cultivo com batata-doce e milhocina para produção de L-Lisina pela cepa ATCC 21799

Meio	Glicose (g/l)	Batata-doce amarela (g/l)	Caldo nutriente (g/l)	Milhocina (g/l)
I	80	-	5,5	-
II	-	150	5,5	-
III	-	150	-	-
IV	-	150	-	1
V	-	150	-	2
VI	-	150	-	3
VII	-	150	-	4
VIII	-	150	-	5
IX	-	150	-	7
X	-	150	-	10
XI	-	150	-	20

* Todas as formulações da tabela 19 possuem 61g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 20g/l de CaCO_3 e sais conforme a tabela 1, exceto NaCl.

Resultados e Discussão

* Segundo bloco

A tabela 20 traz os resultados dos experimentos com batata-doce amarela e milhocina:

Tabela 20: Produção de L-lisina em meios com batata-doce e milhocina (fermentação por ATCC 21799)

Meio	L-Lisina (g/l)
I	5,6
II	7,2
III	6,6
IV	6,8
V	7,2
VI	7,8
VII	7,0
VIII	5,6
IX	3,2
X	1,4
XI	1,2

Comparando as produções de L-Lisina entre os meios I e II, pode-se concluir que a batata-doce substituiu com sucesso a glicose como fonte de carbono, e com produção superior de L-Lisina (7,2g/l contra 5,6g/l). Comparando as produções dos meios II e III, a conclusão é que, mesmo quando a batata-doce é usada como fonte de carbono, uma combinação de fontes orgânica (caldo nutriente) e inorgânica ((NH₄)₂SO₄) de nitrogênio proporcionam resultado melhor (7,2g/l) do que o uso exclusivo de fonte inorgânica (6,6g/l). Analisando os resultados dos meios III a XI, pode-se concluir que a concentração ideal de milhocina é de 3g/l, para a qual a produção de L-lisina atinge 7,8g/l. A medida que se aumenta a concentração de milhocina para níveis superiores a 3g/l, a produção de L-Lisina cai gradativamente (especula-se que tais concentrações de milhocina inibam o crescimento celular, por apresentar excesso de sais ou compostos tóxicos quando certos níveis críticos são atingidos). Em suma, a milhocina pode ser um bom substituinte ao caldo nutriente se usada em faixas próximas a 3g/l.

8. Produção de L-Lisina em Escala de Bancada e Cinética de Fermentação

Materiais e Métodos

Para a prova de escalonamento e para a cinética de fermentação foi escolhida a melhor cepa (ATCC 21799) e a melhor formulação (batata-doce amarela 150g/l; (NH₄)₂SO₄ 61g/l; milhocina 3g/l; CaCO₃ 20g/l e sais (conforme tabela 1, exceto NaCl).

Foram conduzidas duas provas fermentativas, uma em erlenmeyer de 250ml, com volume de 80ml e a outra em um biorreator de escala de bancada (Marubishi - MDL) de 8l (4l de volume útil). Para a prova com o erlenmeyer (em shaker), foram mantidas as condições padrão de agitação (120rpm), temperatura (30°C), pH inicial (7,2) e taxa de inoculação (5%). Para o reator a temperatura (mantida por chapa de aquecimento com controlador PID), pH inicial e taxa de inoculação foram idênticas as da prova em erlenmeyer. A aeração foi mantida a 0,75vvm, com ar atmosférico (filtrado por filtro de membrana 22um, Milipore) e agitação (com agitador automático – 2 impelidores do tipo pás planas) a 120rpm.

Amostras de ambos os ensaios foram coletadas de 4 em 4 horas durante as primeiras 72 horas e após este período em intervalos mais espaçados. Foram analisados os perfis de açúcares (DNS), de biomassa (determinada por contagem em

placa e convertida em peso seco (g/l), L-Lisina (método de Chinard) e pH (pHmetro de bancada – Marte) para cada amostra coletada (biomassa apenas durante as 72 primeiras horas).

Resultados e Discussão

As figuras 7, 8, 9 e 10 ilustram, respectivamente, os perfis de consumo de açúcares, crescimento de biomassa, produção de L-Lisina e evolução do pH durante as provas fermentativas em shaker e no biorreator.

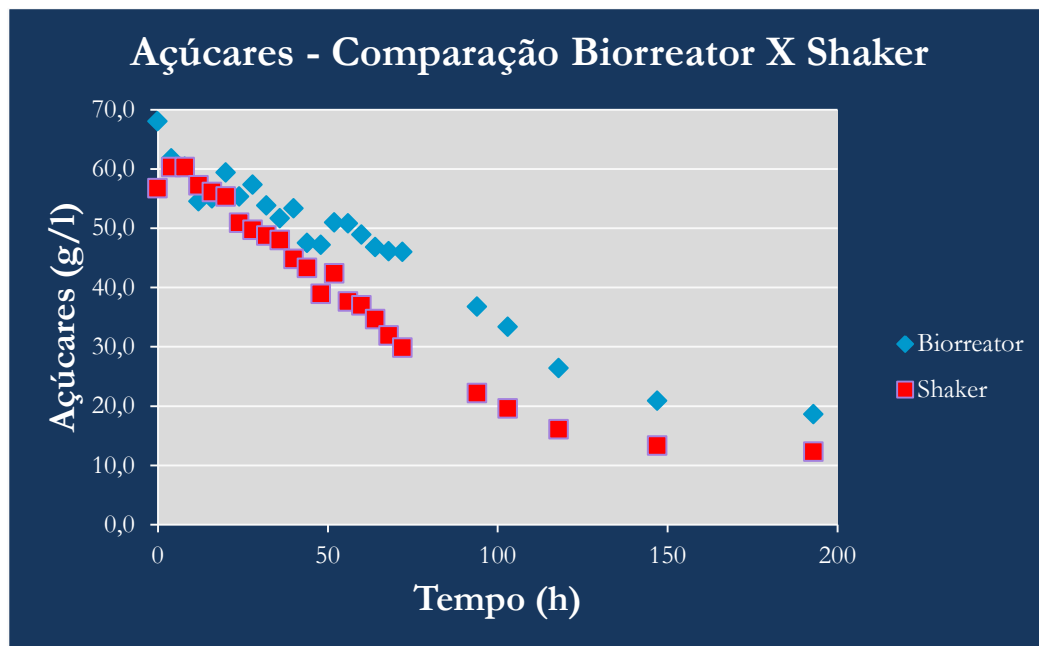


Figura 7 – cinética de consumo de açúcares – comparação shaker X biorreator

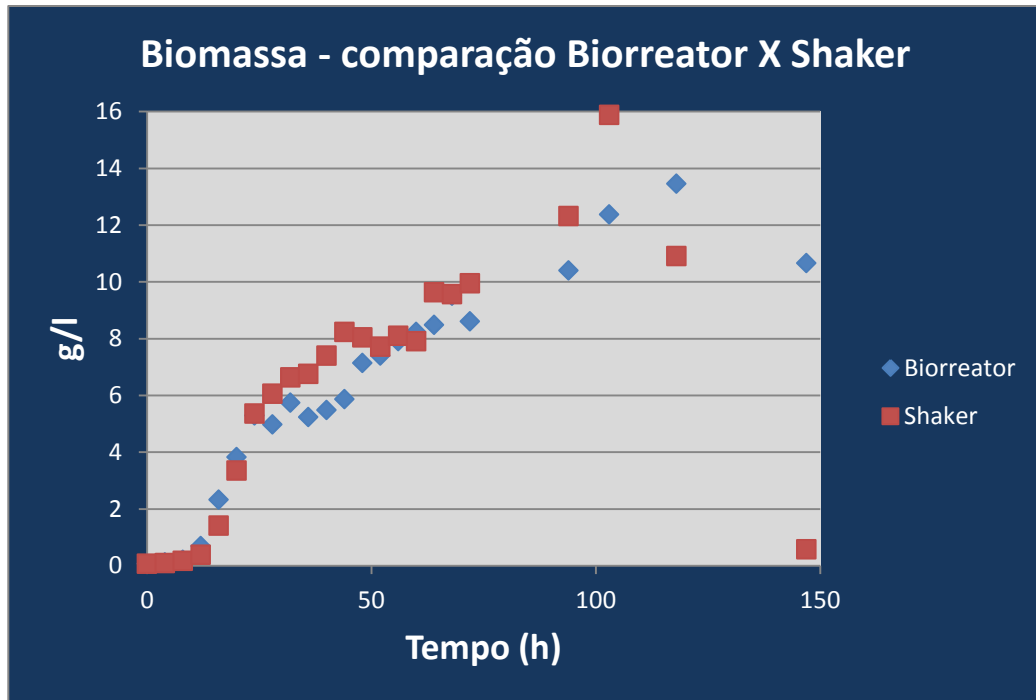


Figura 8 – cinética de crescimento de biomassa – comparação shaker X biorreator

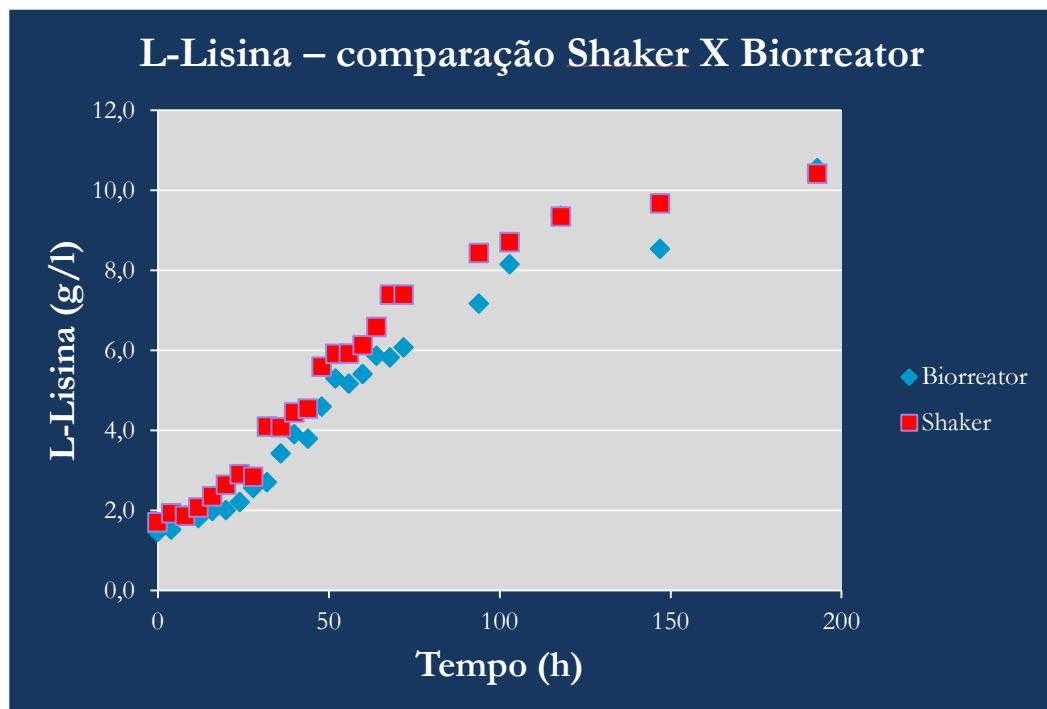


Figura 9 – cinética de produção de L-Lisina – comparação shaker X biorreator

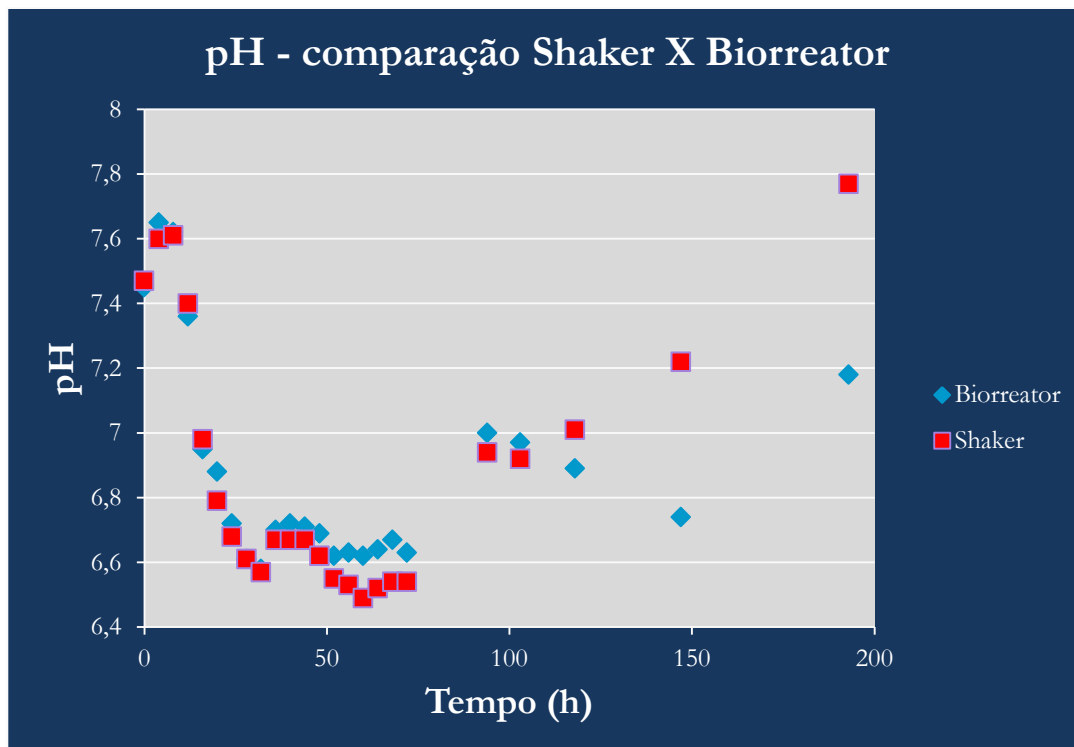


Figura 10 – cinética de consumo de açúcares – comparação shaker X biorreator

Analisando as figuras de 7 a 10 pode-se dizer que o processo de escalonamento foi bem sucedido e que o comportamento cinético é similar para as escalas comparadas.

A evolução do pH é bastante similar, com um aumento de pH até aproximadamente 7,6 durante as primeiras 8 horas de fermentação, e uma queda acentuada até aproximadamente 6,6 durante as primeiras 24 horas, se mantendo praticamente constante até o terceiro dia e subindo lentamente do quarto dia em diante, até ficar levemente básico (no caso do shaker) ou retornar à neutralidade (no caso do biorreator) no sexto dia (figura 7).

O perfil de crescimento celular é também bastante similar para ambos os ensaios. Há um crescimento exponencial até aproximadamente 28 horas de cultivo, seguido por uma faixa de crescimento próximo ao linear até cerca de 84 horas, sendo que o pico de biomassa se dá entre 100h e 120h, tempo após o qual se observa declínio tanto para o cultivo em shaker quanto em biorreator (de forma mais acentuada no shaker). O perfil de consumo de açúcares também é similar para ambos os ensaios e é coerente com o perfil de crescimento celular, como se pode observar na figura 7.

A produção de L-Lisina é discreta nas 12 primeiras horas de cultivo, tem taxa máxima entre 12h e 72h, período após o qual volta a crescer linearmente para então estabilizar. A produção foi acompanhada até 193h, período onde se constataram

valores máximos tanto para o shaker quanto para o biorreator (10,4g/l e 10,5g/l, respectivamente). No entanto, como se trata de um período de morte celular (ver figura 8) é bastante provável que seja de fato a máxima produção possível. Ainda que não fosse, não teria grande interesse prático, pois se trataria de uma fermentação muito longa (mais de 7 dias) o que a tornaria desvantajosa economicamente.

A partir dos resultados apresentados nas figuras de 7 a 10, foram calculados alguns parâmetros cinéticos, que são exibidos na tabela 21:

Tabela 21: Parâmetros cinéticos para o processo e produção de L-lisina pela cepa ATCC 21799 cultivada em meio com batata-doce e milhocina – comparação shaker X biorreator

Prâmetro	Shaker	Biorreator
Pmax (g/l)	10,4 (193h)	10,5(193h)
rmax (g/l.h)	0,081(52h)	0,074(52h)
μ max (1/h)	0,18(16h)	0,17(16h)
Xmax (g/l)	15,9(103h)	13,5(118h)
*Yx/s(gX/gS)	0,34	0,38
*Yp/s(gP/gS)	0,20	0,19

* Em 72 horas de cultivo

A figura 11 exhibe o biorreator Marubishi – MDL, com fermentado após o 7^o dia de fermentação.

A concentração de proteína total (incluindo também oligopeptídeos e aminoácidos) no meio antes da fermentação foi de 0,10% em massa seca, e após a fermentação, 4,73% (fermentado não tratado – contendo biomassa). O método empregado para as dosagens foi o Método de Kjeldahl.



Figura 11 – Biorreator Marubishi – MDL com caldo fermentado

9. Tentativas de Produção de L-Lisina em Meio Sólido

Em paralelo aos experimentos até aqui apresentados (formulações líquidas para a otimização da produção de L-Lisina), foram também conduzidas fermentações no estado sólido.

Inicialmente foram selecionados alguns produtos ou subprodutos agroindustriais importantes para o estado do Paraná, a saber: casca de café; farelo de soja; polpa cítrica e bagaço de mandioca.

Foram preparados extratos de cada um dos materiais, acrescidos de Agar a 17/gl e plaqueados em placas de Petri.

Foram preparados inóculos de diversas cepas de *C. glutamicum* e então repicadas nos meios sólidos (como se pode observar nas figuras 12.a a 12.d:



Figuras 12.a a 12.d : crescimento de diversas cepas de *C. glutamicum* em extratos de produtos/coprodutos agroindustriais em meios com ágar: polpa cítrica (superior esquerdo), mandioca (superior direito), casca de café (inferior esquerdo) e farelo de soja (inferior direito)

Os resultados foram satisfatórios (conforme ilustrado nas figuras 12), especialmente para o meio com farelo de soja. Após essa etapa, diversas fermentações sólidas foram conduzidas em frascos erlenmeyers e também em peneiras (para promover melhor aeração) em estufas a 30°C, com borrifação periódica de água estéril em câmaras de fluxo laminar (para manter a saturação do meio próxima aos 100%). Os cultivos líquidos eram preparados e após 2 dias de fermentação os meios eram centrifugados, o sobrenadante descartado e a biomassa ressuspensa em igual volume de água estéril, após 2 ciclos de lavagem e finalmente inoculada nos meios sólidos. Amostras eram coletadas periodicamente, até o sétimo dia de fermentação. As amostras eram submetidas a um processo de extração com água deionizada, na proporção de 1g para 50ml, e o extrato era submetido a análise colorimétrica, conforme o protocolo de Chinard. O mesmo processo era executado para os materiais a serem fermentados imediatamente antes da inoculação, e os resultados comparados. Diversos resultados foram gerados, e com produções não significativas de L-Lisina (não maiores que 1,6g/l). As contaminações dos meios eram e muitas vezes a biomassa não se desenvolvia nos frascos. Alguns meses após o início dos trabalhos, foi feita a inoculação proposital de contaminantes do ambiente em um frasco contendo farelo de soja. O material foi cultivado sob as mesmas condições e analisado o seu teor de L-Lisina alguns dias após a inoculação. O resultado mostrou uma quantidade de L-Lisina superior a 1,6g/l, o que evidenciou que a atividade microbiológica sobre o farelo de soja estava simplesmente hidrolisando as proteínas já presentes no farelo, e portanto indicando falsa produção de L-Lisina pelas cepas de *C. Glutamicum*. Desta forma, não julgamos pertinente apresentar quantitativamente os resultados dessas baterias de fermentações.

Em vista dos problemas decorrentes das fermentações sólidas, preferiu-se tomar um rumo diferente, continuar apostando na otimização das fermentações líquidas (conforme exibido nos tópicos anteriores) e para a formulação de um produto, adotar a estratégia apresentada na sequência, no próximo tópico.

10. Geração de Mutantes com Maior Potencial de Produção de L-Lisina

Conforme a discussão do último tópico, surgiu a necessidade de aumentar ainda mais a produção de L-Lisina nos meios líquidos e o aproveitamento das fontes de carbono e nitrogênio dos meios formulados, para então retomar os testes de impregnação e acabamento do produto. A estratégia adotada foi a tentativa de obter

mutantes das cepas de *C. glutamicum* com capacidades aumentadas de produção de L-Lisina.

10.1. Determinação da distância e tempo de mutação

A cepa ATCC 21799 foi escolhida para os ensaios de determinação de tempo e distância de exposição ao UV, por ter apresentado melhores resultados de produção de L-Lisina até aqui.

O objetivo deste experimento é determinar uma distância e um tempo de exposição das culturas bacterianas à agente mutagênico (luz ultravioleta) suficiente para gerar mutantes (ao menos 90% de morte de células viáveis) mas não excessivo, de forma que uma quantidade razoável de mutantes permaneça viável e permita futuros repiques. Em tais protocolos, as colônias bacterianas recém inoculadas em meio sólido, em diluição adequada, são expostas diretamente à radiação ultravioleta, em ambientes totalmente protegidos de luz branca. Imediatamente após a exposição, são removidas do ambiente, e incubadas em temperatura propícia ao crescimento.

Materiais e Métodos

A cepa ATCC 21799 foi cultivada em meio padrão (glicose 80g/l, caldo nutriente 10g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50g/l, CaCO_3 20g/l e sais) e sob condições padrão (taxa de inoculação de 5%; 30°C, 120rpm, pH inicial 7,0, durante 3 dias).

Em paralelo foram preparadas cinco Placas de Petri com meio caldo nutriente.

A partir do caldo fermentado foram feitas diluições seriadas, até se atingir a diluição -6 (ou seja, diluídas 1.000.000 de vezes com relação ao caldo fermentado), para a execução da técnica do drop plate (com 6 gotas por placa).

Em cada placa foram pingadas duas gotas para cada uma das diluições de -3 até -5.

Imediatamente após a secagem das gotas, as placas foram expostas à luz ultravioleta (lâmpada de 40W) – exceto a placa 1, o controle - dentro de uma câmara de fluxo laminar horizontal, no período noturno (ausência de luz solar) e com todas as luzes do ambiente apagadas (ausência de luz branca), segundo os tempos e distâncias apresentados na Tabela 22:

Tabela 22 – Tempos e distâncias de exposição à luz ultravioleta das placas com gotas das diluições de cultura líquida de *C. glutamicum*

	Tempo (s)	Distância (cm)
Placa 1 (controle)	-	-
Placa 2	30	10
Placa 3	30	20
Placa 4	120	10
Placa 5	120	20

Imediatamente após a exposição, as placas foram levadas a uma estufa de cultivo (30 °C) por 48 horas, procedendo-se com a contagem das colônias.

Resultados e Discussão

Após a incubação das placas foram obtidos os resultados apresentados na tabela 23:

Tabela 23 – Número médio de colônias crescidas nas placas expostas à luz ultravioleta

	Diluição		
	-3	-4	-5
Placa 1 (controle)	inc	inc	95,5
Placa 2	inc	35	3,5
Placa 3	inc	inc	18,5
Placa 4	1	0,5	0
Placa 5	13	2	0

*inc: incontáveis

Analisando os dados da tabela 23, podemos calcular a porcentagem de inativação celular (aproximada) para cada situação:

- Placa 2 (10cm, por 30s): 96,33%
- Placa 3 (20cm, por 30s): 80,62%
- Placa 4 (10cm, por 120s): 99,97%
- Placa 5 (20cm, por 120s): 99,83%

Dependendo do objetivo, qualquer uma das condições testadas, e inclusive outras, em faixas intermediárias de tempo e distância, poderiam ser usadas para obtenção de mutantes. Considerando o objetivo estabelecido (probabilidade de geração de mutantes e número suficiente de colônias) adotou-se a condição da placa 2 (10cm, por 30s) como padrão para as etapas seguintes.

10.2. Obtenção de linhagens mutantes

O objetivo desta etapa foi a geração e manutenção de cepas mutantes, capazes de produzir quantidades superiores de L-Lisina com relação às linhagens parentais.

Materiais e Métodos

Apesar de a cepa ATCC 21799 ter apresentado resultados superiores às demais cepas, considerou-se a possibilidade de mutantes eventualmente apresentarem comportamentos diferenciados. Portanto, preparou-se um meio padrão de crescimento, e foram cultivadas as cepas ATCC 21513, ATCC 21543, ATCC 21799 e NRRL B3330 em erlenmeyers de 125ml, com 30ml de volume útil, sob condições padrão.

Após o crescimento, foram geradas mutantes de cada linhagem, em placas de Petri, de acordo com a metodologia descrita no tópico anterior, usando distância de 10cm e 30s de exposição, com 6 gotas da diluição 10^{-4} por placa, para obtenção de número suficiente de colônias.

Foi preparada uma quantidade suficiente de meio padrão + tialisina (100 mg/l) e foram distribuídos 10ml de meio para cada um dos 60 erlenmeyers de 25ml de volume total. Cada frasco foi inoculado com uma única colônia proveniente das placas submetidas à luz ultravioleta (selecionadas aleatoriamente a partir das colônias crescidas), e também de algumas colônias crescidas em placas não submetidas à luz ultravioleta (controles).

Após a inoculação, os erlenmeyers foram mantidos sob temperatura de 30 °C, rotação de 120rpm por 3 dias.

Amostras foram coletadas e centrifugadas, e a quantidade de L-Lisina de cada amostra foi dosada pelo método de Chinard.

A cepa mais promissora, pelos resultados obtidos até então, era a ATCC 21799. Para ela e seus mutantes, portanto, foram reservados número maior de frascos: 3 para o crescimento de controles e 21 para colônias mutantes. Para as demais cepas, 2 controles e 10 mutantes cada. Em um segundo momento, a melhor mutante foi repicada, conservada e foi gerada uma segunda linhagem de mutantes. Para a nova linhagem, novamente se avaliou a capacidade de produção de L-Lisina em meio padrão.

Resultados e Discussão

A maior parte dos frascos inoculados com as cepas ATCC 21799 e ATCC 21543 apresentou algum grau de turbidez (indicando crescimento celular) após 3 dias de cultivo, ao passo que nenhum dos frascos contendo tanto os controles quanto os mutantes das cepas ATCC 21513 e NRRL B3330 apresentou turbidez. Esse resultado pode ser explicado pela presença do agente de seleção tialisina.

Amostras dos frascos que apresentaram crescimento foram coletadas e analisadas quanto ao teor de L-Lisina, e os resultados são apresentados na tabela 24 (aqueles que não apresentaram crescimento não foram analisados e portanto não constam na tabela 24).

Tabela 24 – Produção de L-lisina em meio líquido padrão pelos mutantes gerados a partir das linhagens parentais de *C. glutamicum*

Linhagem	Produção de L-Lisina (g/l)	Linhagem	Produção de L-Lisina (g/l)
ATCC 21799		ATCC 21543	
C1	8,9	C1	0,26
C2	7,8	C2	0,35
C3	8,3		
M2	7,5	M3	0,21
M3	7,5	M4	0,04
M4	6,9	M5	0,30
M5	9,4	M6	0,14
M6	6,7	M7	0,18
M7	7,2	M8	0,23
M8	7,3	M10	0,15
M9	8,1		
M10	8,1		
M11	5,9		
M12	6,1		
M13	8,1		
M14	7,4		
M15	5,5		
M16	6,3		
M17	8,0		
M18	5,5		
M19	7,9		

*C: controle; M: mutante

A mutante M5 obtida a partir da linhagem ATCC 21799, por ter apresentado produção de L-Lisina (9,4 g/l) mais que 10% superior à média dos controles (8,3 g/l) foi conservada em solução de glicerol a 10% e usada em testes posteriores.

Após o descongelamento e repique da mutante ATCC 21799 M5, uma nova geração de mutantes foi avaliada quanto à produção de L-Lisina, sob as mesmas condições e meios de cultivo descritos anteriormente.

Os resultados são apresentados na tabela 25:

Tabela 25 – Produção de L-lisina em meio líquido padrão pelos mutantes de segunda geração gerados a partir da linhagem ATCC 21799 M5

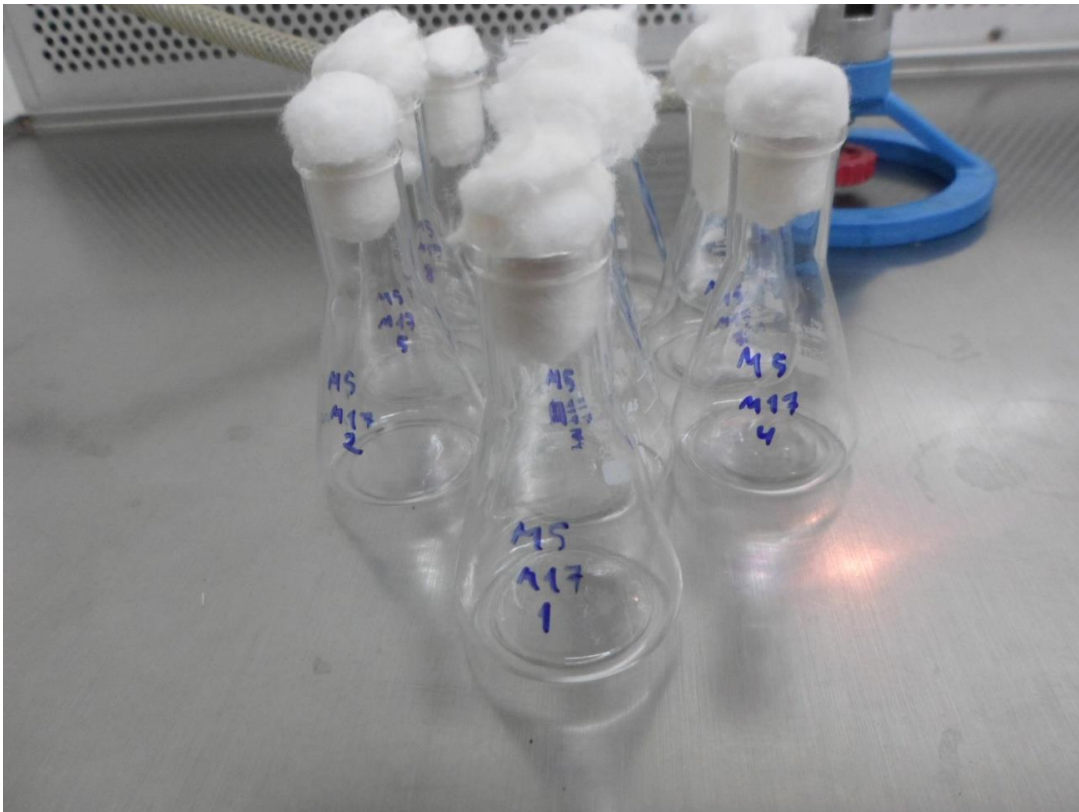
Linhagem	Produção de L-Lisina (g/l)	Linhagem	Produção de L-Lisina (g/l)
ATCC 21799		ATCC 21799 M5	
C1	9,3	M8	9,6
C2	9,8	M9	8,4
C3	7,4	M10	10,4
ATCC 21799 M5		M11	8,5
C1	8,8	M12	9,6
C2	9,0	M13	8,2
C3	8,7	M14	10,6
M1	10,5	M15	9,9
M2	10,6	M16	9,4
M3	9,9	M17	10,3
M4	9,3	M18	9,9
M5	6,9	M19	8,8
M6	8,3	M20	9,7
M7	8,7		

*C: controle; M: mutante

As 5 mutantes melhores produtoras de L-Lisina (ATCC M5M1; ATCC M5M2; ATCC M5M10; ATCC M5M14 e ATCC M5M17) foram repicadas e conservadas em glicerol a 10% e usadas em testes posteriores.

Ainda, uma terceira geração de mutantes foi gerada, no entanto nenhuma das novas mutantes superou a produção das linhagens obtidas até então.

As figuras 13.a e 13.b mostram os frascos utilizados para o cultivo das mutantes:



Figuras 13.a e 13.b. Erlenmeyers de 25ml (13.a em detalhe) (13.b já com meio de cultivo padrão, inoculados individualmente com colônias mutantes de terceira geração de *C. glutamicum*) usados para as provas fermentativas de quantificação de L-Lisina.

Observações: à primeira vista a obtenção de mutantes com capacidade de produção aumentada, e, especialmente, a obtenção de boas linhagens de segunda geração motiva a pergunta: por que não continuar gerando novas linhagens de mutantes? É preciso ter em mente um aspecto importante das mutações aleatórias: elas não afetam exclusivamente regiões do DNA relacionadas direta ou indiretamente à produção da molécula alvo (no caso a L-Lisina), mesmo que a linhagem parental tenha uma habilidade razoável de produção. Acúmulo de mutações pode gerar linhagens com características indesejáveis, como por exemplo, dificuldade de adaptação e crescimento em certos meios de cultivo; necessidades nutricionais adicionais; alterações metabólicas e fisiológicas indesejáveis. Uma característica observada nas linhagens mutantes obtidas nesse estudo, em especial as de segunda geração, é sua morfologia, tanto no que diz respeito ao crescimento em placas de Petri quanto em meio líquido. Em geral, as mutantes possuem forte tendência a desenvolver formas de aspecto irregular e rugoso em placas de Petri, e uma espécie de “película” na superfície do meio quando em cultura líquida (possivelmente formas de resistência). As fotos abaixo (figuras 14 a 18) ilustram essa situação:





Figuras 14.a e 14.b: Mutantes de segunda geração cultivadas em meios líquidos formulados (batata-doce e melaço-de-cana) apresentando formação de “películas” em sua superfície



Figura 15. Mutantes de segunda (superior esquerdo) e primeira geração (superior direito) e linhagem parental (inferior) cultivadas em meio batata-doce e melaço de cana-de-açúcar com desenvolvimento normal (sem apresentar “películas” na superfície líquida)

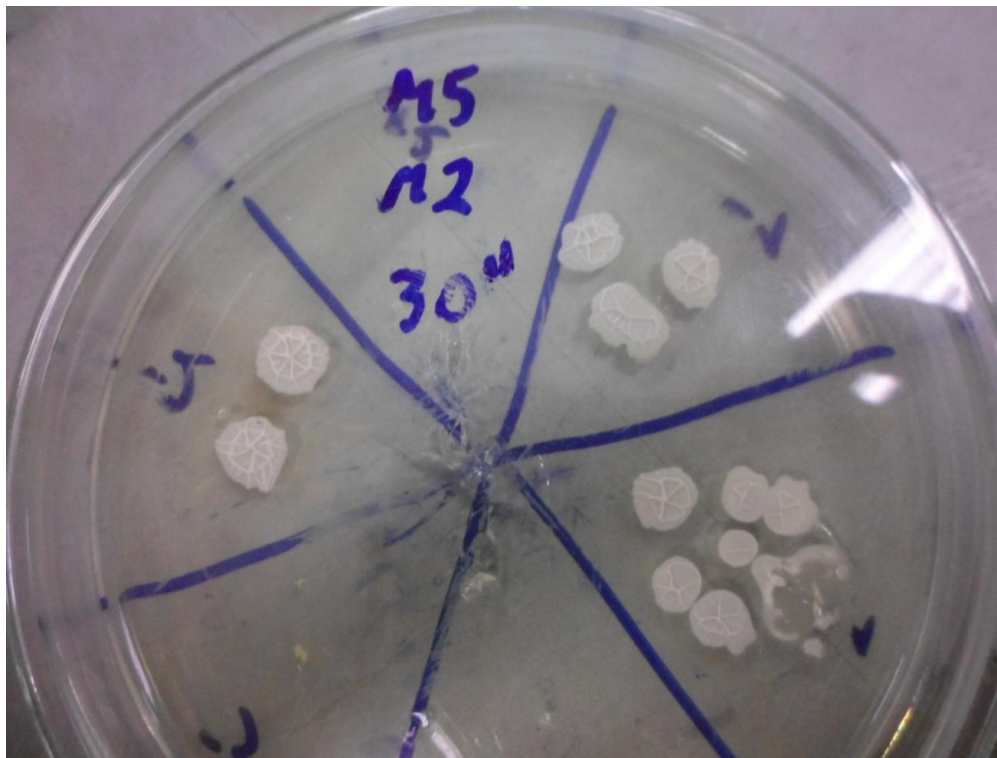


Figura 16. Colônias de mutantes de segunda geração de *C. glutamicum* ATCC 21799 cultivadas em placa de Petri apresentando morfologia diferenciada (colônias grandes, rugosas e com bordos irregulares)

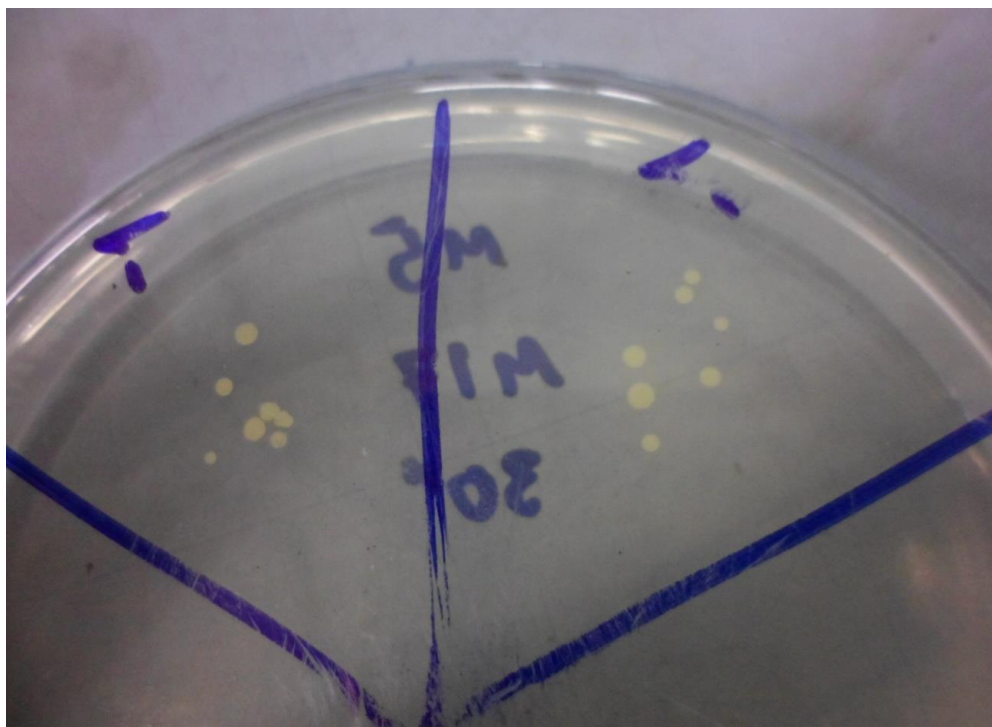
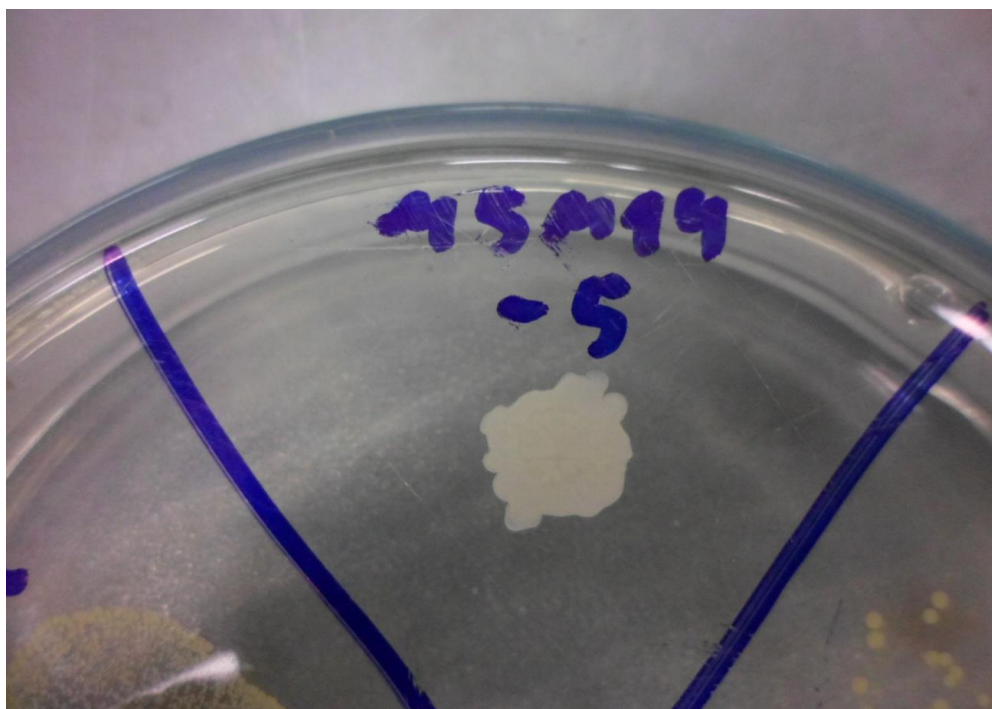
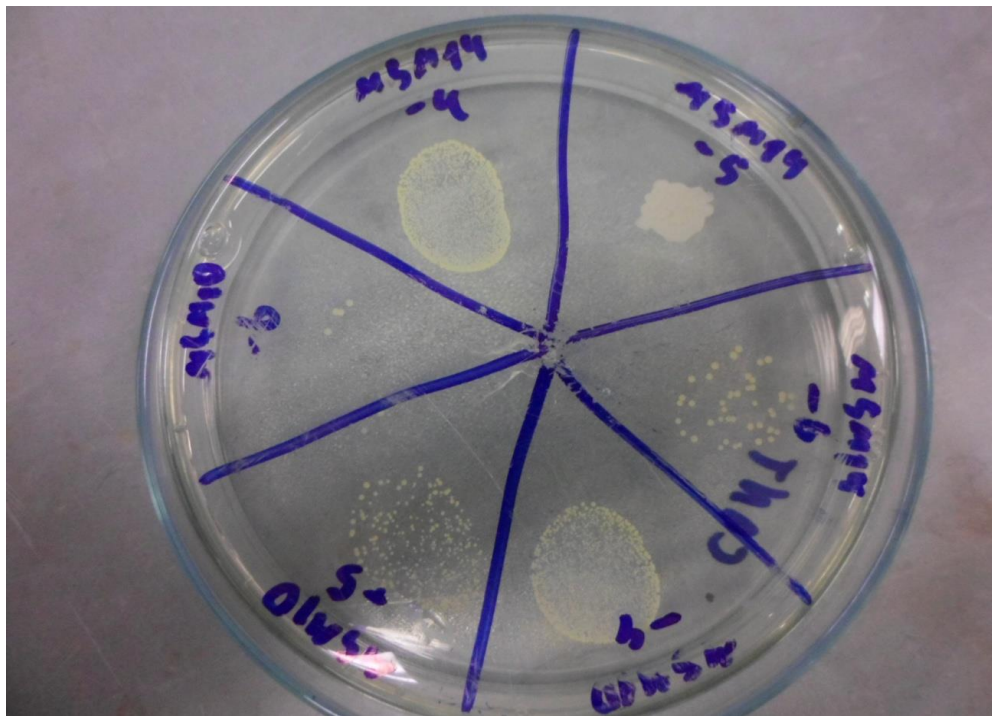


Figura 17. Colônias de mutantes de segunda geração de *C. glutamicum* ATCC 21799 cultivadas em placas de Petri apresentando morfologia normal (colônias amareladas, pequenas, lisas e com bordos regulares)



Figuras 18.a e 18.b. Colônias de diversas mutantes de segunda geração de *C. glutamicum* ATCC 21799 cultivadas em placas de Petri apresentando morfologia normal (a maior parte) ou diferenciada (canto superior direito na figura 18.a e em detalhe na figura 18.b).

Tais colônias “diferenciadas” quando repicadas novamente em meio líquido produzem L-Lisina, mas em quantidade aproximadamente 40% inferiores a colônias “normais” da mesma linhagem repicadas em meio líquido (detalhes não exibidos –

foram realizados testes com as 4 linhagens de segunda geração que apresentaram ambas as formas de colônias).

11. Uso de Mutantes e Produção de L-Lisina em Meios Formulados

Após a obtenção de mutantes com capacidade de produção superior às linhagens parentais, o objetivo foi testar sua habilidade de produção em meios formulados com substratos alternativos.

Foram testados meios contendo batata-doce e melação de cana-de-açúcar (fontes de carbono de baixo custo) como substituintes da glicose.

Materiais e métodos

As 5 linhagens de mutantes selecionadas (conforme descrito no tópico anterior) e a linhagem parental foram utilizadas nas provas fermentativas com batata-doce e melação de cana-de-açúcar

A composição dos meios testados está descrita na tabela 26

Tabela 26 – Composição dos meios a base de batata-doce (B) e melação de cana-de-açúcar (M) para produção de L-Lisina por cepas mutantes de *Corynebacterium glutamicum*

Componentes	Meio B	Meio M
Hidrolisado de batata doce	150g	-
Melaço de cana-de-açúcar	-	100g
Caldo nutriente	10g	10g
(NH ₄) ₂ SO ₄	50g	50g
CaCO ₃	20g	20g
K ₂ HPO ₄	1g	1g
KH ₂ PO ₄	3g	3g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4g	0,4g
FeSO ₄ .7H ₂ O	10mg	10mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	10mg	10mg
Água	qsp 1kg	qsp 1kg

O hidrolisado de batata-doce é preparado de acordo com o protocolo descrito na página 34, item 6.1, e é utilizado para compor o meio de cultivo B (conforme a tabela 26). A concentração aproximada de açúcares redutores do hidrolisado é de 75g/l.

O melão-de-cana possui 80 °BRIX e aproximadamente 80% dos sólidos solúveis totais são açúcares redutores.

As quantidades de melão e batata-doce utilizados foram calculadas para que se obtivesse um caldo com quantidades aproximadamente iguais de açúcares redutores, e máxima possível (cerca de 64g/l). Vale ressaltar que o limitante dessa escolha, e que restringiu o valor de açúcares totais abaixo dos 80g/l usados até então nos meios sintéticos usados durante a seleção dos mutantes, foi o meio de batata-doce. Ocorre que meios contendo mais do que 150g/L de batata-doce se tornam excessivamente viscosos, dificultando os processos de hidrólise, peneiramento e manipulação em geral.

Resultados e Discussão

Os resultados são exibidos na tabela 27.

Tabela 27 – Produção de L-Lisina pelas cepas mutantes de segunda geração em meios formulados com melão de cana-de-açúcar (M) e batata-doce (B)

Cepa	Produção de L-Lisina (g/l)	
	Meio B	Meio M
ATCC 21799 (parental)	5,6	5,5
M5M1	2,0	3,1
M5M2	1,7	5,1
M5M10	8,1	8,9
M5M14	8,4	6,0
M5M17	8,4	8,5

Os resultados da tabela 27 são inferiores aos da tabela 25. O pior resultado pode ser explicado principalmente por duas razões: a quantidade total de açúcares para os meios B e M é de aproximadamente 20% inferior ao “meio padrão” (devido a uma limitação na quantidade de batata-doce, conforme já explicado anteriormente); os meios a base de melão e batata-doce são complexos, com a presença de sais, vitaminas e outras biomoléculas, que interferem no metabolismo microbiano. É notável que algumas linhagens apresentam produção superior de L-Lisina no meio a base de melão (como a M5M1 e principalmente a M5M2) enquanto outras produzem quantidades similares (parental, M5M10 e M5M17) e eventualmente apresentam uma produção maior no meio com batata (como a M5M14).

Com base nos resultados da tabela 27, concluiu-se que é preciso otimizar o meio de cultivo para a obtenção de caldos ricos em L-Lisina (com quantidades iguais ou mesmo superiores às aquelas apresentadas na tabela 26). O meio a base de melão foi escolhido para tal otimização (por ter apresentado resultados similares ou mesmo superiores ao da batata e por ser mais flexível quanto à faixa de concentração utilizada) e a cepa M5M10, por ter apresentado melhores resultados nesse substrato.

11.1. Otimização das concentrações de melão de cana e sulfato de amônio

O objetivo desta etapa é maximizar a produção de L-Lisina pela melhor mutante obtida até então (ATCC 21799 M5M10) em meio a base de melão de cana-de-açúcar e sulfato de amônio.

Materiais e métodos

Inicialmente pretende-se definir as concentrações ótimas de fonte de carbono (melão de cana-de-açúcar) e inorgânica de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Os demais componentes do meio foram mantidos constantes e idênticos ao que foi apresentado na tabela 26. Com base em experimentos anteriores, já se tem uma ideia da faixa ótima de ambos os parâmetros. Portanto, nesse ponto, optou-se por usar diretamente um plano composto central rotacional, segundo a tabela 28 (ensaios em duplicata, ponto central em quadruplicata).

Resultados e Discussão

Tabela 28: DCCR para a produção de L-Lisina com mutantes da cepa ATCC 21799 – ajuste da fonte de carbono (melaço de cana-de-açúcar) e da fonte inorgânica de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄)

Ponto	Concentração de melaço (g/kg)	Concentração de (NH ₄) ₂ SO ₄	Produção de L-Lisina (média) (g/l)
(-1,-1)	70	50	4,5
(-1,1)	70	80	6,3
(1,-1)	130	50	6,0
(1,1)	130	80	8,8
(0,0)	100	65	7,2
(-√2,0)	57,6	65	4,6
(0,-√2)	100	43,8	4,8
(√2,0)	142,4	65	7,7
(0,√2)	100	86,2	8,9

A análise estatística dos resultados da tabela 28 revela que o ponto ótimo se encontra além das fronteiras da região delimitada, no sentido positivo de ambas as variáveis dependentes testadas (concentração de melaço de cana e concentração de sulfato de amônio).

Um novo DCCR foi executado, com o ponto central deslocado para a região de melhor produção. A tabela 29 exibe o novo plano e a tabela 30 os respectivos resultados

Tabela 29: novo DCCR para a produção de L-Lisina com mutantes da cepa ATCC 21799 – ajuste da fonte de carbono (melaço de cana-de-açúcar) e da fonte inorgânica de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄)

Ponto	Concentração de melaço (g/kg)	Concentração de (NH ₄) ₂ SO ₄
(-1,-1)	100	65
(-1,1)	100	95
(1,-1)	160	65
(1,1)	160	95
(0,0)	130	80
(-√2,0)	87,6	80
(0,-√2)	130	58,8
(√2,0)	172,4	80
(0,√2)	130	101,2

Resultados e Discussão

Tabela 30: novo DCCR para a produção de L-Lisina com mutantes da cepa ATCC 21799 – ajuste da fonte de carboó (melaço de cana-de-açúcar) e da fonte inorgânica de nitogênio ((NH₄)₂SO₄) - resultados

Ponto	Produção de L-Lisina (média) (g/l)
(-1,-1)	6,6
(-1,1)	6,7
(1,-1)	7,2
(1,1)	7,3
(0,0)	9,3
(-√2,0)	5,2
(0,-√2)	5,6
(√2,0)	7,1
(0,√2)	7,7

A análise estatística dos resultados da tabela 30 confirma que o ponto ótimo para a produção de L-Lisina pela mutante M5M10 em meio à base de melaço de cana e sulfato de amônio está ao redor de 130g/l de melaço de cana e de 80g/l de sulfato de amônio.

A tabela 31 resume a evolução da produção de L-Lisina em meios líquidos formulados até este ponto, e traz em sua última linha o melhor resultado, exibido também na tabela 30. As concentrações de 130g/l de melaço de cana e de 80g/l de sulfato de amônio foram fixadas para a etapa seguinte do trabalho, que consiste no desenvolvimento de um produto para a indústria de ração animal.

Tabela 31: evolução da produção de L-Lisina durante a otimização dos meios de cultivo

Glicose (g/l)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	Caldo nutriente (g/l)	Sais	CaCO ₃ (g/l)	Batata-doce (g/l)	Melaço de cana (g/l)	Milhocina (g/l)	Produção de L-Lisina (g/l)	Tabela
40	10							1,7	6
40	10	13	Sim					1,7	8
40		13	Sim	30				4,6	12
80	75	2,6	Sim	20				5,7	14
80	75	5,0	Sim	20				6,0	16
	61	5,5	Sim	20	150			6,7	18
	61	5,5	Sim	20	150		3	7,8	20
	80		Sim	20		130		9,3	30

12. Desenvolvimento de um Produto para a Indústria de Ração Animal

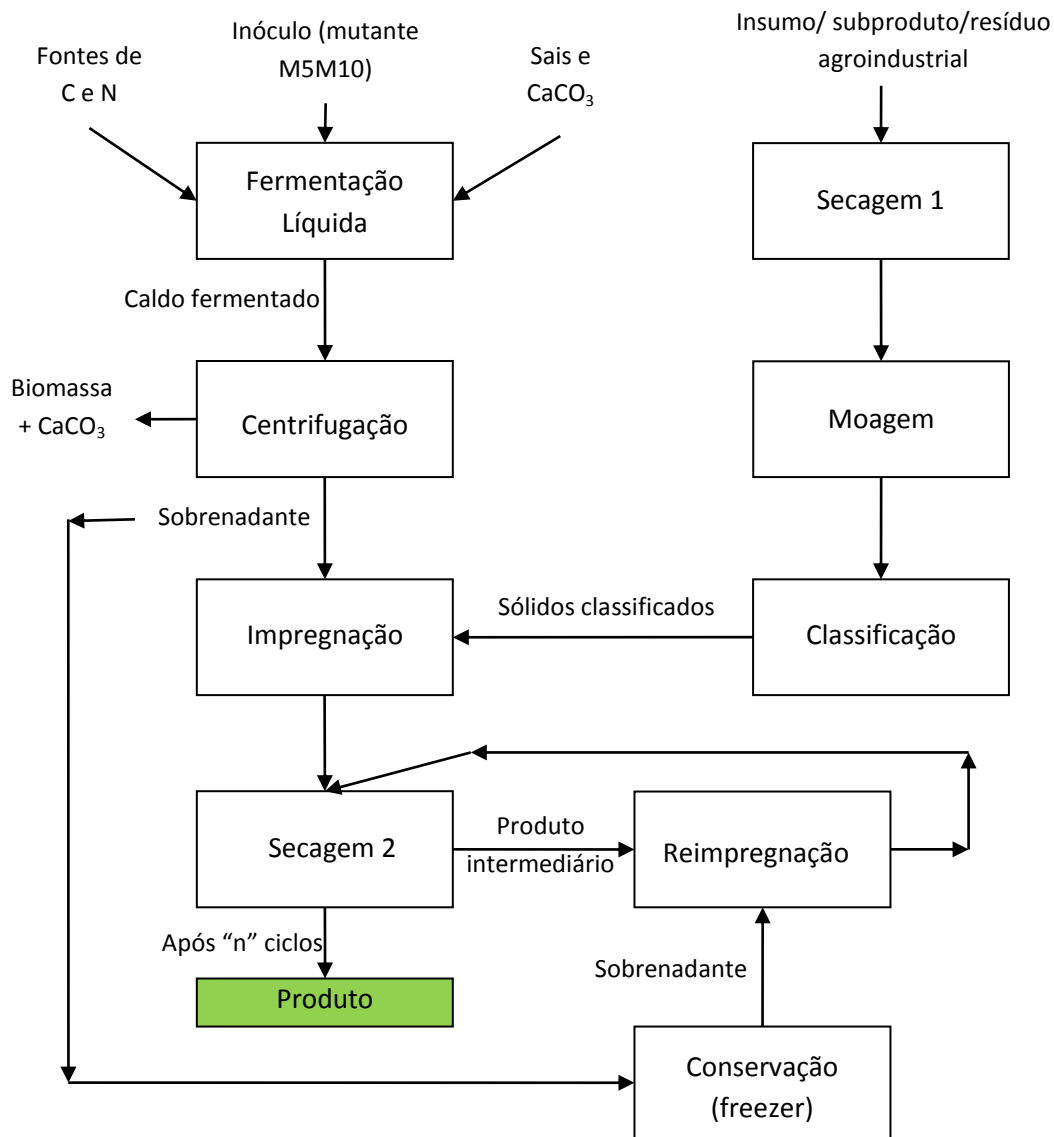
A ideia básica é obter um caldo rico em L-Lisina, pela fermentação de meios formulados, conforme exibido nas seções anteriores, tomar o seu sobrenadante (líquido rico em L-Lisina) e impregná-lo em um suporte sólido.

Alguns insumos, subprodutos ou resíduos da agroindústria, com importância a nível regional ou nacional, foram escolhidos como candidatos a tais suportes. São eles: farelo de trigo, casca de soja, bagaço de cana, polpa cítrica e resíduo de malte cervejeiro (*brewer spent grain*). Antes do uso, o material deve ser seco e submetido a moagem e classificação, para padronização do tamanho médio de suas partículas.

Após a impregnação o material é novamente seco em estufa convencional ou em estufa de circulação de ar. Concluída a etapa de secagem o material é impregnado novamente, e o ciclo se reinicia, até que a capacidade de absorção do material seja saturada.

O fluxograma 1 ilustra as etapas descritas anteriormente:

Fluxograma 1: Etapas para o desenvolvimento de farinha rica em L-Lisina



Materiais e métodos

Fermentação Líquida

O objetivo desta etapa é obter um caldo fermentado rico em L-Lisina. Foi utilizada a cepa M5M10 e o meio formulado otimizado e condições de cultivo previamente determinadas (descritos na seção anterior). Foram obtidos 400ml de caldo fermentado.

Centrifugação

O caldo fermentado foi submetido a uma centrifugação a 5.000 rpm, durante 15 minutos, o que foi suficiente para decantar a biomassa e o carbonato de cálcio, além de outros sólidos insolúveis no meio. O sobrenadante foi coletado e conservado em freezer para posterior uso.

Secagem 1

Os insumos agrícolas (farelo de trigo, casca de soja, polpa cítrica, resíduo cervejeiro de malte e bagaço de cana) foram inicialmente secos em estufa de circulação de ar forçado, a 45 °C, até eliminação completa de água livre e estocados em local fresco e seco, e ao abrigo da luz.

Moagem e Classificação

Pelo menos 200g de cada material foram moídos em um moinho de facas e logo a seguir classificados com o auxílio de peneiras vibratórias. Para cada material, a fração contendo partículas com diâmetro médio entre 0,8 e 2,0mm foi conservada em frascos fechados, em local seco e ao abrigo da luz, para posterior uso (pelo menos 50g de cada material). A justificativa para o tamanho médio das partículas se pauta em experiências anteriores: partículas muito pequenas, quando submetidas à umidificação, formam um bolo compacto, e após submetidas à secagem tendem a formar “blocos” compactos, que dificultam a manipulação e subseqüentes reimpregnações. Por outro lado, uma porção contendo partículas muito grandes terá uma menor área de superfície total, reduzindo o seu potencial de absorção.

Determinação da capacidade de saturação dos Insumos

Para se determinar a relação ótima entre massa do sobrenadante/massa do insumo na mistura (etapa de impregnação) se procedeu com a determinação da capacidade máxima de absorção de cada um dos insumos. Os testes de saturação foram feitos não somente com água, mas também com uma solução que contém os componentes do meio fermentado, em concentrações idênticas às da formulação (exceto pelo CaCO_3 , que é removido durante a etapa de centrifugação). Para o teste de saturação, uma alíquota do material seco teve sua massa determinada em uma balança analítica de precisão. A seguir, foram acrescentadas alíquotas de água (ou da solução) até completa saturação do material sólido – momento em que se observa a formação de água livre no fundo do recipiente. A massa de água (ou solução)

necessária e suficiente para a formação de água livre foi anotada, e então a capacidade de saturação de cada material pôde ser determinada pela razão entre a massa do líquido e a massa de sólido na mistura.

Impregnação e Secagem 2

Alíquotas de cada um dos insumos (já secos, moídos e classificados) foram colocados em recipientes separados. Cada material foi misturado com uma certa quantidade do sobrenadante do caldo fermentado, de acordo com o resultado do teste de saturação para cada material. A mistura foi homogeneizada e colocada em uma estufa com circulação de ar, a 45 °C durante 24 horas.

Ciclos de Impregnação

Após completa secagem do material, o procedimento de impregnação foi repetido, e mais uma vez se procedeu com a secagem. Ao todo, 6 ciclos de impregnação e secagem foram executados.

Determinação da Concentração de L-Lisina no Material Impregnado

Para a dosagem de L-Lisina no material impregnado, ao menos 0,15g da amostra em questão foram diluídos em água deionizada, na proporção de 1g de material para cada 200ml de água. A mistura foi submetida à agitação, em agitador magnético, durante 30 minutos. Após agitação, o sobrenadante foi coletado e submetido à análise padrão (sem diluição posterior).

Resultados e Discussão

A tabela 32 exhibe os resultados dos testes de saturação dos insumos, tanto por água quanto pela solução à base de melão de cana e sulfato de amônio:

Tabela 32: resultados do teste de saturação dos insumos a serem utilizados para formulação de produto rico em L-Lisina

	Massa	Água		Solução*	
		Volume	Saturação	Volume	Saturação
Bagaço de cana	1g	8,5mL	8,5mL/g	6,5mL	6,5mL/g
Malte	2g	6,0mL	3,0mL/g	4,0mL	2,0mL/g
Polpa cítrica	3g	11,5mL	3,83mL/g	8,0mL	2,67mL/g
Trigo	3g	6,0mL	2,0mL/g	4,5mL	1,5mL/g
Casca de soja	1g	4,0mL	4,0mL/g	2,5mL	2,5mL/g

* A solução consiste de 130g/l de melação de cana, 80g/l de sulfato de amônio e sais, conforme a tabela 26.

É notável que, para todos os insumos, a saturação é atingida mais rapidamente quando se usa a solução, quando comparada à água. Uma possível explicação é que a solução (simulando o sobrenadante do caldo fermentado), possui uma concentração elevada de sais, além de partículas sólidas solúveis e não solúveis que são constituintes do melação de cana. Tais partículas sólidas são responsáveis pelo “sequestro” de moléculas de água e portanto reduzem a razão de saturação da solução frente a razão de saturação da água pura.

O bagaço de cana apresentou a melhor razão de saturação (8,5ml/g para água e 6,5ml/g para a solução), seguido pela polpa cítrica (3,83ml/g para água e 2,67ml/g para a solução) e casca de soja (4,0ml/g para água e 2,5ml/g para a solução). O malte (3,0ml/g para água e 2,0ml/g para a solução) e o trigo (2,0ml/g para água e 1,5ml/g para a solução) apresentaram os piores resultados. O resultado era esperado, visto que o bagaço de cana possui alto teor de fibras.

As saturações encontradas para a solução foram consideradas para a etapa de impregnação, na qual o sobrenadante do caldo fermentado foi impregnado nos insumos.

A tabela 33 mostra as massas de cada insumo e o volume de sobrenadante usado para a impregnação:

Tabela 33: massas de insumo e volume de solução usados para os testes de impregnação

	Massa	Volume de sobrenadante
Bagaço de cana	1g	6,5mL
Malte	2g	4,0mL
Polpa cítrica	3g	8,0mL
Trigo	3g	4,5mL
Casca de soja	1g	2,5mL

Após a primeira etapa de secagem, parte da massa do material resultante foi coletado para a análise da concentração de L-Lisina e o restante foi reimpregnado (segundo ciclo de impregnação).

A tabela 34 mostra em detalhes a separação das massas de cada material, e também exhibe o volume do sobrenadante para a reimpregnação:

Tabela 34: massas de insumo e volume de solução usados para os testes de impregnação – 1º ciclo

	Massas iniciais		Massas finais			Volume de sobrenadante a ser adicionado
	Resíduo	Fermentado	Dosagem	Reimpregnação	Total	
Bagaço de cana	1g	6,5mL	0,31g	1,2g	1,51g	5,166mL
Malte	2g	4,0mL	0,44g	1,83g	2,27g	3,225mL
Polpa cítrica	3g	8,0mL	0,70g	2,78g	3,48g	6,391mL
Trigo	3g	4,5mL	0,61g	2,58g	3,19g	3,639mL
Casca de soja	1g	2,5mL	0,21g	0,97g	1,18g	2,055mL

O volume do sobrenadante foi calculado com base na massa remanescente do material original, e depende tanto da massa inicial do insumo e de sua razão de saturação, quanto da massa total do material após a secagem e da fração de material destinada à continuidade do ciclo. A equação 2 exemplifica o cálculo para o caso do bagaço de cana:

$$V = m_R \frac{m_0}{m_T} F = 1,2 \frac{1,0}{1,51} 6,5 = 5,166ml \text{ (Equação 2)}$$

Onde:

V : volume do sobrenadante a ser adicionado

m_R : massa do material a ser utilizada para a reimpregnação subsequente

m_0 : massa do material no início do ciclo

m_T : massa do material após o processo de secagem

F : volume do fermentado adicionado no início do ciclo

As tabelas 35 a 39 seguir mostram em detalhes as massas dos ciclos subsequentes de impregnação:

Tabela 35: massas de insumo e volume de solução usados para os testes de impregnação – 2º ciclo

	Massas iniciais		Massas finais			Volume de sobrenadante a ser adicionado
	Resíduo	Fermentado	Dosagem	Reimpregnação	Total	
Bagaço de cana	1,2g	5,166mL	0,31g	1,24g	1,55g	4,132mL
Malte	1,83g	3,225mL	0,41g	1,67g	2,08g	2,589mL
Polpa cítrica	2,78g	6,391mL	0,66g	2,64g	3,30g	5,113mL
Trigo	2,58g	3,639mL	0,57g	2,28g	2,85g	2,911mL
Casca de soja	0,97g	2,055mL	0,22g	0,90g	1,12g	1,651mL

Tabela 36: massas de insumo e volume de solução usados para os testes de impregnação – 3º ciclo

	Massas iniciais		Massas finais			Volume de sobrenadante a ser adicionado
	Resíduo	Fermentado	Dosagem	Reimpregnação	Total	
Bagaço de cana	1,24g	4,132mL	0,32g	1,2g	1,58g	3,295mL
Malte	1,67g	2,589mL	0,38g	1,51g	1,89g	2,068mL
Polpa cítrica	2,64g	5,113mL	0,61g	2,43g	3,04g	4,087mL
Trigo	2,28g	2,911mL	0,50g	1,98g	2,48g	2,325mL
Casca de soja	0,90g	1,651mL	0,21g	0,83g	1,04g	1,318mL

Tabela 37: massas de insumo e volume de solução usados para os testes de impregnação – 4º ciclo

	Massas iniciais		Massas finais			Volume de sobrenadante a ser adicionado
	Resíduo	Fermentado	Dosagem	Reimpregnação	Total	
Bagaço de cana	1,2g	3,295mL	0,34g	1,19g	1,53g	2,563mL
Malte	1,51g	2,068mL	0,34g	1,35g	1,69g	1,652mL
Polpa cítrica	2,43g	4,087mL	0,55g	2,15g	2,70g	3,254mL
Trigo	1,98g	2,325mL	0,43g	1,72g	2,15g	1,860mL
Casca de soja	0,83g	1,318mL	0,20g	0,74g	0,94g	1,038mL

Tabela 38: massas de insumo e volume de solução usados para os testes de impregnação – 5º ciclo

	Massas iniciais		Massas finais			Volume de sobrenadante a ser adicionado
	Resíduo	Fermentado	Dosagem	Reimpregnação	Total	
Bagaço de cana	1,19g	2,563mL	0,29g	1,14g	1,43g	2,043mL
Malte	1,35g	1,652mL	0,30g	1,81g	2,27g	1,428mL
Polpa cítrica	2,15g	3,254mL	0,49g	1,95g	2,44g	2,601mL
Trigo	1,72g	1,860mL	0,46g	1,81g	2,27g	1,428mL
Casca de soja	0,74g	1,038mL	0,17g	0,66g	0,83g	0,825mL

Tabela 39: massas de insumo e volume de solução usados para os testes de impregnação – 6º ciclo

	Massas iniciais		Massa Final
	Resíduo	Fermentado	Total
Bagaço de cana	1,14g	2,043mL	1,24g
Malte	1,81g	1,428mL	1,20g
Polpa cítrica	1,95g	2,601mL	2,12g
Trigo	1,81g	1,428mL	1,95g
Casca de soja	0,66g	0,825mL	0,69g

A análise colorimétrica revelou que o caldo fermentado usado nas impregnações continha 9,3g/l de L-Lisina. Sendo assim, a tabela 40 exhibe a concentração máxima teórica de L-Lisina para cada um dos insumos, do primeiro ao último ciclo:

Tabela 40: Quantidades relativas de L-Lisina nos materiais impregnados, do 1º ao 6º ciclo de impregnação

	Quantidade relativa de L-Lisina no material impregnado (g/g)					
	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	4º Ciclo	5º Ciclo	6º Ciclo
Bagaço de cana	0,040	0,070	0,092	0,110	0,125	0,138
Malte	0,016	0,031	0,043	0,054	0,060	0,070
Polpa cítrica	0,021	0,039	0,054	0,067	0,079	0,089
Trigo	0,013	0,025	0,035	0,045	0,052	0,059
Casca de soja	0,020	0,036	0,051	0,063	0,074	0,084

A tabela 40 permite concluir que, dentre as opções testadas, o bagaço de cana é o que se mostrou mais adequado para a formulação de um produto rico em L-Lisina, permitindo, ao final do sexto ciclo de impregnação, a obtenção de um material com quase 14% de L-Lisina em sua composição. A polpa cítrica e a casca de soja também podem ser opções interessantes, com o potencial de fornecer produtos com quase 10% de L-Lisina em sua composição final. Já o trigo e o malte, devido a sua baixa capacidade de absorção de umidade, levam desvantagem. Caso a produção de L-Lisina na fermentação líquida seja melhorada, eventualmente todos os 5 substratos possam ser utilizados (ou combinações entre eles) para posteriores testes em campo, para a alimentação de suínos e aves.

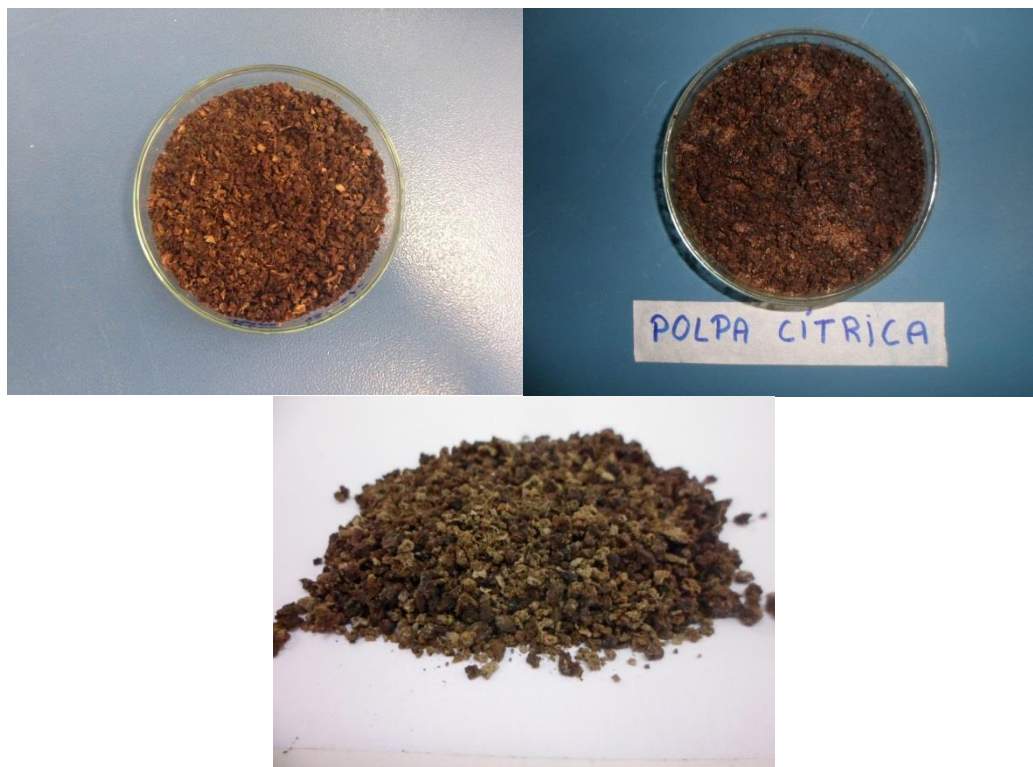
Outro ponto favorável ao uso de bagaço de cana, e também à casca de soja, é o aspecto do material após vários ciclos de impregnação. Como pode ser visto nas figuras de 19 a 23, o bagaço de cana e a casca de soja, após 5 ciclos de impregnação, ainda se apresentam de forma não compactada, enquanto o resíduo de malte já apresenta alguns pequenos agregados de tamanho médio, e bastante duros, e a polpa cítrica e farelo de soja apresentam-se na forma de grandes agregados, o que demandaria novas etapas de moagem a cada ciclo de impregnação intermediário, e consequentemente tempo adicional e encarecendo o processo.



Figuras 19a (esquerda), 19b (direita) e 19c (embaixo): bagaço de cana após 1º ciclo de impregnação; após 6º ciclo de impregnação; após 6º ciclo de impregnação em detalhe.



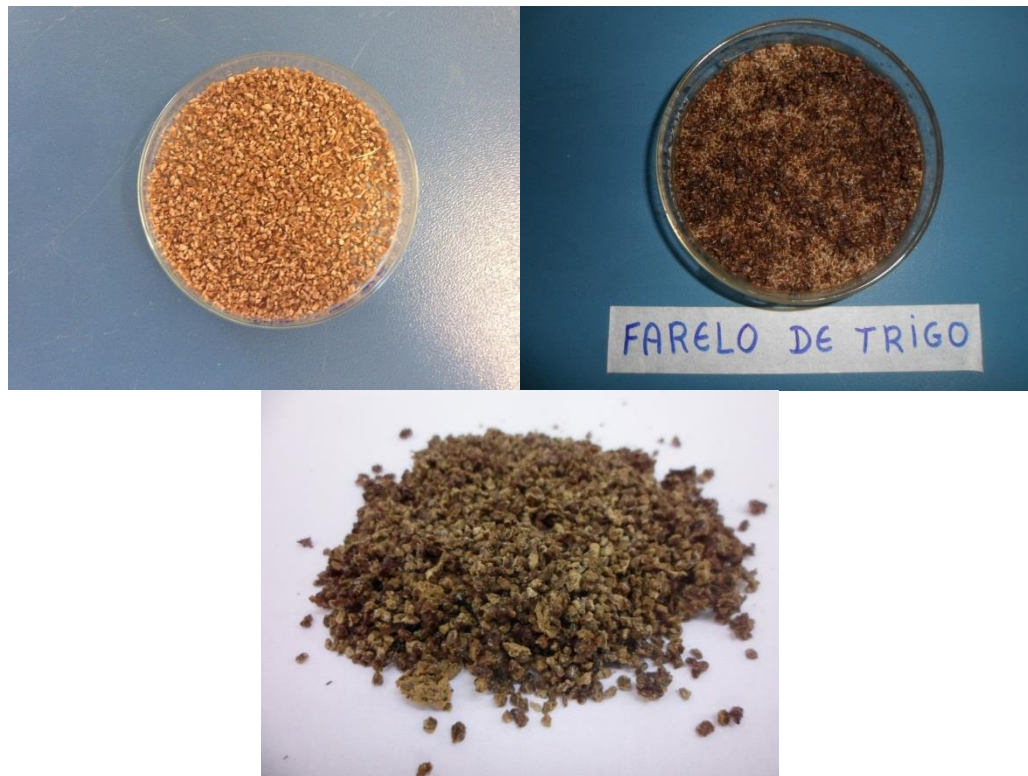
Figuras 20a (esquerda), 20b (direita) e 20c (embaixo): casca de soja após 1º ciclo de impregnação; após 6º ciclo de impregnação; após 6º ciclo de impregnação em detalhe.



Figuras 20a (esquerda), 20b (direita) e 20c (embaixo): polpa cítrica após 1º ciclo de impregnação; após 6º ciclo de impregnação; após 6º ciclo de impregnação em detalhe.



Figuras 20a (esquerda), 20b (direita) e 20c (embaixo): resíduo de malte após 1º ciclo de impregnação; após 6º ciclo de impregnação; após 6º ciclo de impregnação em detalhe.



Figuras 20a (esquerda), 20b (direita) e 20c (embaixo): farelo de trigo após 1º ciclo de impregnação; após 6º ciclo de impregnação; após 6º ciclo de impregnação em detalhe.

As vantagens dos produtos desenvolvidos frente aos produtos já existentes no mercado são:

- Baixo custo dos insumos usados durante a etapa de fermentação líquida;
- Baixo custo da matriz do produto final;
- Número reduzido de operações unitárias e simplicidade, com baixo custo energético.
- O produto é apresentado em uma forma imediatamente utilizável, sem a necessidade de se efetuar misturas.

13. Análise Econômica

A demanda por aminoácidos para a nutrição de animais é variável de acordo com uma diversidade de fatores, os principais são a espécie considerada e a fase de desenvolvimento. As informações detalhadas para a demanda nutricional de proteína bruta e aminoácidos para suínos estão detalhadas na tabela 41 - adaptada de (Rostagno, 2011).

Tabela 41: Demanda por proteínas e aminoácidos para suínos, de acordo com a fase de crescimento

	Fase de Crescimento			
	Pré-Inicial			Inicial
	1	2	3	
Peso vivo (kg)	3,5 a 5,3	5,5 a 9,0	9,3 a 15	15 a 30
Idade (dias)	14 a 21	21 a 32	33 a 42	41 a 70
Proteína bruta (%)	20,0	20,0	21,0	19,24
Lisina digestível (%)	1,520	1,450	1,330	1,093
*GPD (kg/dia)	0,257	0,318	0,633	1,265

* Ganho de peso diário

Portanto, para suínos a recomendação de suplementação de L-lisina fica na faixa de 1,093% a 1,520%. Para frangos a demanda fica na faixa de 1,06% a 1,324%, (Rostagno, 2011).

Considerando os produtos (farinhas) exibidos na tabela 40, e a tabela 41, podem ser calculadas as quantidades necessárias de cada farinha para suplementar a dieta diária de suínos, de acordo com a fase de crescimento. Considerando o cenário que demanda a maior quantidade total de L-Lisina por dia (fase inicial) tem-se a situação ilustrada na tabela 42:

Tabela 42: Demanda de cada produto (farinha) por dia, por suíno de acordo com a fase de crescimento

	Produto (farinha) (g/dia.suíno)				
	Bagaço de cana	Resíduo de malte	Polpa cítrica	Farelo de trigo	Casca de soja
Pré-inicial 1	5,7	11,2	8,8	13,2	9,3
Pré-inicial 2	6,7	13,2	10,4	15,6	11,0
Pré-inicial 3	12,8	25,3	19,9	30,0	21,0
Inicial	19,3	38,0	29,9	45,1	31,7

Considerando o caso de maior demanda (fase inicial) são necessários 19,3g de farinha a partir de bagaço de cana por dia para cada suíno, 38,0g de farinha a base de resíduo de malte, 29,9g de farinha a base de polpa cítrica, 45,1g de farelo de trigo ou 31,7g de casca de soja. Sendo assim a demanda mensal de cada produto, para cada suíno na fase inicial de crescimento seria de: bagaço de cana (578g); resíduo de malte (1140g); polpa cítrica (897g); farelo de trigo (1353g); casca de soja (950g).

Considerando os custos dos insumos: sulfato de amônio (R\$3,50/kg); melaço de cana (R\$0,50/kg); carbonato de cálcio (R\$1,50/kg) e a quantidade de insumos utilizada para os 6 ciclos de impregnação de cada farinha (conforme a tabela 43):

Tabela 43: Quantidade de insumos necessários para produzir 1kg de farinha, de acordo com o suporte escolhido

Suporte	Quantidade de insumo (kg)		
	Sulfato de amônio	Melaço de cana	Carbonato de cálcio
Bagaço de cana	0,768	1,249	0,192
Resíduo de malte	0,530	0,862	0,133
Polpa cítrica	0,653	1,061	0,163
Farelo de trigo	0,522	0,848	0,130
Casca de soja	0,577	0,938	0,144

É possível calcular o custo de cada kg de farinha a partir de cada suporte: bagaço de cana (R\$3,60); resíduo de malte (R\$2,49); polpa cítrica (R\$3,06); farelo de trigo (R\$2,45) e casca de soja (R\$2,70). Foram negligenciados os custos dos suportes, visto que seriam irrisórios frente aos valores dos demais insumos.

E finalmente, o custo de cada farinha para alimentar e suprir a demanda mensal para um suíno na fase inicial de crescimento: bagaço de cana (R\$2,08); resíduo de malte (R\$2,83); polpa cítrica (R\$2,75); farelo de trigo (R\$3,31) e casca de soja (R\$2,57).

O preço médio de cristais de L-Lisina comumente praticados no mercado gira em torno de R\$5,62/kg (Harte, 2013), sendo que a produção média de L-Lisina em fermentações líquidas, em média, é de 80g/l. Ou seja, o custo para alimentar um suíno em fase inicial durante um mês seria de R\$0,45. Para o presente trabalho, a produção de L-Lisina na fermentação líquida usada para as impregnações foi de 9,3g/l e portanto, os preços dos produtos finais ainda não são capazes de competir com os produtos disponíveis no mercado. No entanto, se considerarmos uma fermentação líquida com rendimento de 80g/l de L-Lisina e o mesmo método de impregnação

empregado neste trabalho, os custos seriam reduzidos a R\$0,24; R\$0,33; R\$0,32; R\$0,38 e R\$0,30, para farinhas a base de bagaço de cana, resíduo de malte, polpa cítrica, farelo de trigo e casca de soja, respectivamente, o que tornaria os preços dos produtos finais competitivos (especialmente os produtos a base de bagaço de cana e casca de soja). Ou seja, o potencial do processo apresentado neste trabalho é grande, desde que se consiga melhorar o rendimento de produção na fase de fermentação líquida.

14. Conclusões

- 7 cepas de *C. glutamicum* foram reativadas com sucesso e as 3 melhores produtoras foram selecionadas para testes posteriores;
- A cepa ATCC 21799 apresentou os melhores resultados de produção de L-Lisina quando cultivada em meio com uma fonte inorgânica de nitrogênio (sulfato de amônio);
- Os sais fosfato de potássio dibásico, fosfato de potássio monobásico, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, cloreto de cálcio e sulfato ferroso se mostraram importantes para o crescimento da cepa e para a produção de L-Lisina, enquanto as vitaminas biotina e tiamina tiveram menor importância relativa, e cloreto de sódio teve leve influência negativa;
- O pH do meio durante a fermentação se mostrou um fator decisivo para o crescimento microbiano e conseqüentemente para a produção de L-Lisina; carbonato de cálcio foi o agente mais eficiente para tamponar o meio; é importante ressaltar que o pH pode ser controlado por sistemas automáticos em escala piloto e/ou industrial;
- As cinéticas de crescimento em meios formulados em batata-doce foram similares em erlenmeyers e em biorreator;
- A produção de L-Lisina em meios formulados com melaço de cana foram similares as obtidas em batata-doce; a principal vantagem do melaço de cana, além do fator econômico, é a possibilidade de se obter caldos com maiores concentrações de açúcares;
- Mutantes da cepa ATCC 21799 foram obtidas e algumas selecionadas devido ao maior potencial de produção de L-Lisina;
- Foi concebido um processo inovador, tecnicamente viável e com potencial econômico para a produção de material sólido granulado rico em L-Lisina, a

partir de meio a base de melaço de cana fermentado com uma mutante da cepa 21799, e de insumos/coprodutos/resíduos advindos da agroindústria regional ou nacional.

15. Perspectivas para Trabalhos Futuros

- Uso de técnicas de Biologia Molecular e mutação sítio dirigida para obtenção de linhagens super-produtoras de L-Lisina;
- Escalonamento da produção de L-Lisina por fermentação líquida;
- Escalonamento da produção de material sólido rico em L-Lisina;
- Testes de prateleira do produto granulado;
- Testes do produto granulado em campo: suplementação alimentar de aves, suínos e peixes.

16. REFERÊNCIAS

- [1] An, G. H.; Song, K. B.; Sinskey, A. J. **Redirection of carbon flux to lysine in a recombinant of *Corynebacterium lactofermentum* ATCC 21799 by limited supply of pantothenate.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88 (2) (1999) 168-172.
- [2] Anastassiadis, S. **L-lysine fermentation.** *Recent Patents on Biotechnology* 1 (2007) 11-24.
- [3] Bampidis, V. A.; Robinson, P. H. **Citrus by-products as ruminant feeds : a review.** *Animal Feed Science and Technology*. 128 (2006) 175–217.
- [4] Becker, J.; Klopprogge, C.; Herold, A.; Zelder, O.; Bolten, C. J.; Wittmann, C. **Metabolic flux engineering of l-lysine production in *Corynebacterium glutamicum* - over expression and modification of G6P dehydrogenase.** *Journal of Biotechnology* (2007).
- [5] Bellmann, A.; Vrljic, M.; Patek, M.; Sahm, H.; Krämer, R.; Eggeling, L. **Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*.** *Microbiology* 147 (2001) 1765–1774.
- [6] Chinard, F. **Photometric Estimation of Proline and Ornithine.** *The Journal of Biological Chemistry*, 1952
- [7] Coello, N.; Brito, L.; Nonus, M. **Biosynthesis of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum* grown on fish silage.** *Bioresource Technology* 73 (2000) 221-225.
- [8] de Graaf, A. A.; Eggeling, L.; Sahm, H. **Metabolic Engineering for L-Lysine Production by *Corynebacterium glutamicum*.** *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 73 (2001).
- [9] Eggeling, L. **Biology of L-lysine overproduction by *Corynebaeterium glutamicum*.** *Amino Acids* 6 (1993) 261-272.

[10] Eggeling, L.; Oberle, S.; Sahm, H. **Improved L-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: Use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation.** *Applied Microbiological Biotechnology* 49 (1998) 24–30.

[11] Harte, R.; Arnott, R.; McPherson, E. **Guidelines for estimating swine (26 to 121kg) finishing costs based on marketing 11,376 pigs.** *Manitoba Agriculture, Food and Rural Development* (2013).

[12] Hermann, T. **Industrial production of amino acids by coryneform bacteria.** *Journal of Biotechnology* 104 (2003) 155–172.

[13] Hollander, J. A. **Potential metabolic limitations in lysine production by *Corynebacterium glutamicum* as revealed by metabolic network analysis.** *Applied Microbiology Biotechnology* 42 (1994) 508 – 515.

[14] Kelle, R.; Hermann, T.; Bathe, B. **L-lysine production.** In: **Eggeling L, Bott M (eds) Handbook of *Corynebacterium glutamicum*.** CRC Press, Boca Raton (2001) 465– 488.

[15] Kiefer, P.; Heinzle, E.; Wittmann, C. **Influence of glucose, fructose and sucrose as carbon sources on kinetics and stoichiometry of lysine production by *Corynebacterium glutamicum*.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (2002) 28, 338 – 343.

[16] Locci, E.; Laconi, S.; Pompei, R.; Scano, P.; Lai, A.; Marincola, F. C. **Wheat bran biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: a solid state Carbon-13 NMR Study.** *Bioresource Technology* 99 (2008) 4279 – 4284.

[17] Malumbres, M.; Martin, J. F. **Molecular control mechanisms of lysine and threonine biosynthesis in amino acid-producing *Corynebacteria*: Redirecting carbon flow.** *FEMS Microbiol Letters* 143 (1996) 103–114.

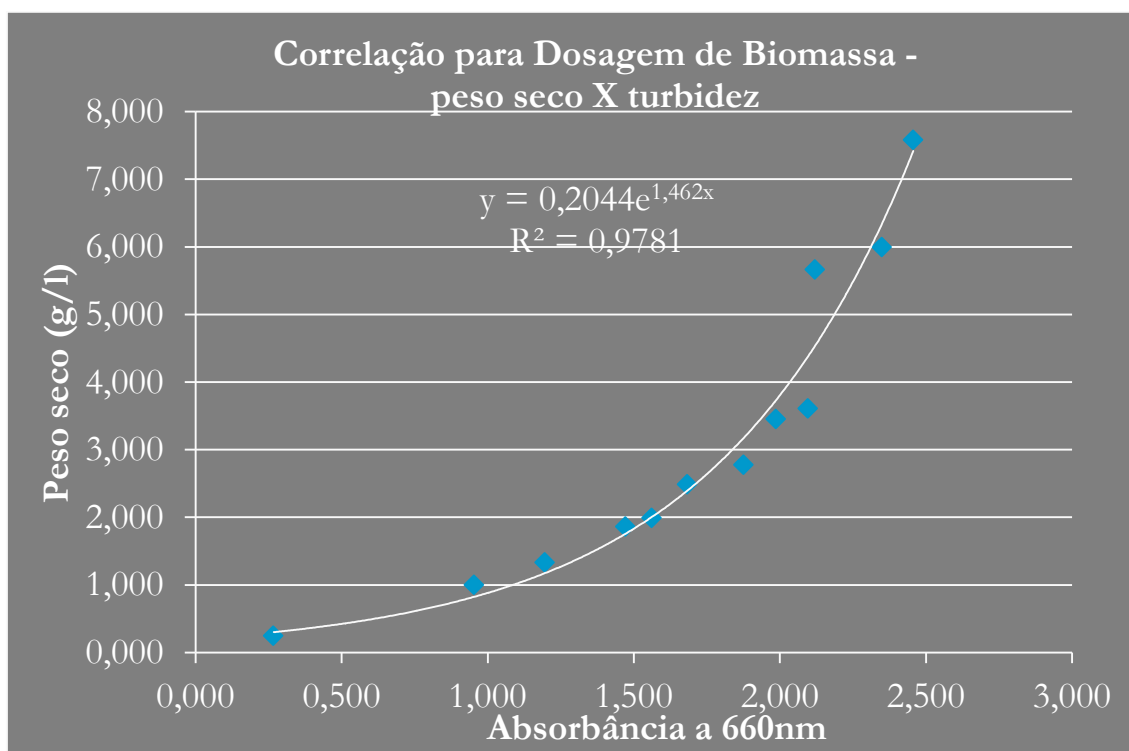
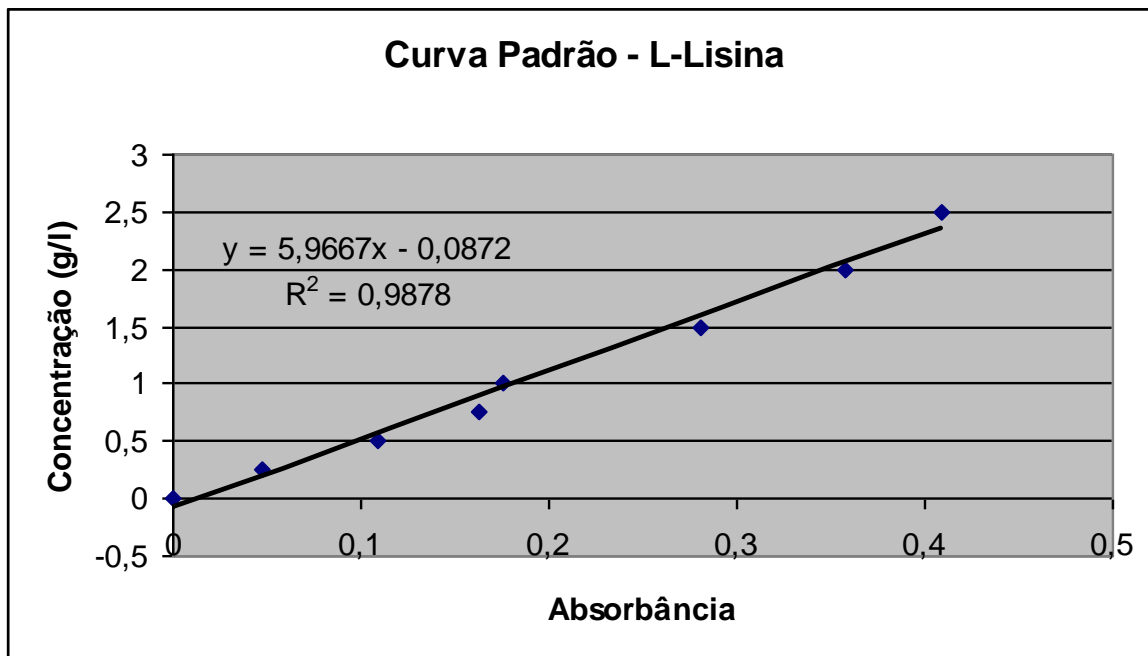
[18] Marx, A.; Hans, S.; Möckel, B.; Bathe, B.; de Graaf, A. A. **Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of *Corynebacterium glutamicum*.** *Journal of Biotechnology* 104 (2003) 185– 197.

- [19] Miller, G. L.; **Use of dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars.** *Journal of Analytical Chemistry* 31 (3) (1959) 426-428.
- [20] Mohana, S. H.; Shah, A.; Divecha, J.; Madamwar, D. **Xylanase production by *Burkholderia sp.* DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash.** *Bioresource Technology* 99 (2008) 7553–7564.
- [21] Murray, H. M.; Lall, s. P.; Rajaselvam, R.; Boutilier, L. A.; Blanchard, B.; Flight, R. M.; Colombo, S.; Mohindra, V.; Douglas, S. E. **A nutrigenomic analysis of intestinal response to partial soybean meal replacement in diets for juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, L.** *Aquaculture* 298 (3-4) (2010) 282-293 .
- [22] Nelson, D. L.; Cox, M. M. **Princípios de Bioquímica.** 5 Edição, São Paulo: Sarvier (2011).
- [23] Ohnishi, J.; Katahira, R.; Mitsuhashi, S.; Kakita, S.; Ikeda, M. **A novel *gnd* mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*.** *FEMS Microbiology Letters* 242 (2005) 265–274.
- [24] Peters-Wendisch, P. G.; Schiel, B.; Wendisch, V. F.; Katsoulidis, E.; Möckel, B.; Sahm, H.; Eikmanns, B. J. **Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*.** *Journal of Molecular Microbiological Biotechnology* 3 (2001) 295– 300.
- [25] Riedel, C.; Rittmann, D.; Dangel, P.; Möckel, B.; Petersen, S.; Sahm, H.; Eikmanns, B. J. **Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* and significance of the enzyme for growth and amino acid production.** *Journal of Molecular Microbiological Biotechnology* 3 (2001) 573–583.
- [26] Rostagno, H. S. **Tablas brasileñas para aves y cerdos.** *Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia* (2011).

- [27] Sano, K.; Ito, K.; Miwa, K.; Nakamori, S. **Amplification of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Brevibacterium lactofermentum* to improve amino acid production.** *Agric Biol Chem* 51(2) (1987) 597–599.
- [28] Sassi, A. H.; Fauvart, L.; Deschamps, A. M.; Lebeault, J. M.; **Fed-batch production of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum*.** *Biochemical Engineering Journal* 1 (1998) 85-90.
- [29] Shah, A. H.; Hameed, A.; Khan, G. M.; **Fermentative Production of L-lysine: bacterial fermentation I.** *J. Med. Sci.*, 2 (3) (2002) 152-157.
- [30] Soccol, C. R.; Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol, V. T. **Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse.** *Bioresource Technology* 74 (2000) 69-80.
- [31] Sugimoto, M.; Tanaka, A.; Suzuki, T.; Matsui, H.; Nakamori, S.; Takagi, H.; **Sequence analysis of functional regions of homoserine dehydrogenase genes from L-lysine and L-threonine-producing mutants of *Brevibacterium lactofermentum*.** *Biosci Biotechnol Biochem* 61 (1997) 1760–1762.
- [32] Tada, K.; Kishimoto, M.; Omasa, T.; Katakura, Y.; Suga, K. I. **Constrained optimization of L-lysine production based on metabolic flux using a mathematical programming method.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91 (4) (2001) 344-351.
- [33] Tsujimoto, N.; Gunji, Y.; Miyata, Y. O.; Shimaoka, M.; Yasueda, H. **L-Lysine biosynthetic pathway of *Methylophilus methylotrophus* and construction of an L-lysine producer.** *Journal of Biotechnology* 124 (2006) 327–337.
- [34] Wlittmann, C.; Becker, J. **The L-Lysine Story: from metabolic pathways to industrial production.** *Microbiol Monogr* (5) 24 (2007) 40-70.
- [35] http://www.abecitrus.com.br/subprodutos_br.html (agosto, 2008)

[36]<http://noticias.bol.uol.com.br/economia/2010/12/10/setor-de-racao-deve-manter-ritmo-de-crescimento-em-2011.jhtm> (julho, 2011).

APÊNDICE



Correlação para a conversão de UFC para g: $1\text{UFC}=6,9 \times 10^{-12}$ (válido para cepa ATCC 21799 em condições fisiológicas normais) (correlação 1)