

ADITIVOS ALIMENTARES PRODUZIDOS POR VIA FERMENTATIVA

PARTE 2: AMINOÁCIDOS E VITAMINAS

Resumo

Aminoácidos e vitaminas apresentam um largo espectro de uso comercial como aditivos ou suplementos alimentares e agentes terapêuticos. A grande importância dos aminoácidos está na alimentação humana e no enriquecimento de ração animal, pois um grande número de aminoácidos não é sintetizado no organismo de animais superiores. Por outro lado, as vitaminas são indispensáveis ao metabolismo de animais superiores. São encontradas em diversos alimentos, porém em quantidades pequenas. Considerando a produção industrial por via fermentativa e o uso como aditivo alimentar, alguns aminoácidos (ácido glutâmico, lisina, triptofano, treonina e isoleucina) e vitaminas (riboflavina, cianocobalamina, ácido ascórbico e biotina) foram selecionados para uma análise detalhada.

Palavras-chave: aminoácidos, vitaminas, produção industrial, fermentação

Summary

Amino acids and vitamins have a wide spectrum of commercial use as food and feed additives, and as therapeutic agents. The greatest importance of amino acids concerns human nutrition and animal feed enrichment, since many amino acids need to be provided to higher animals. On the other hand, vitamins are essential to the metabolism of higher animals. They are found in several foods, although in minor amounts. Considering the industrial production by fermentative way and the use as food additive, some amino acids (glutamic acid, lysine, triptophan, threonine and isoleucine) and vitamins (riboflavin, cyanocobalamin, ascorbic acid and biotin) were selected for a detailed analysis.

Keywords: amino acids, vitamins, industrial production, fermentation

Introdução

Já há alguns anos, os microrganismos têm sido empregados na produção de produtos fermentados como, por exemplo, pão, vinho, cerveja, vinagre, queijos. Atualmente, com o desenvolvimento de novas tecnologias, principalmente o desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados a partir da tecnologia do DNA recombinante e da engenharia genética, pode-se alterar importantes rotas do metabolismo microbiano, tornando possível a produção econômica de diferentes insumos através do uso de microrganismos em processos fermentativos ou de bioconversão. É crescente o número de compostos produzidos por via fermentativa, podendo-se citar como exemplos a produção industrial de enzimas, antibióticos, solventes orgânicos, vitaminas e aminoácidos, entre outros.

O presente trabalho aborda aspectos relacionados à obtenção de alguns aminoácidos e vitaminas, utilizados como aditivos alimentares, atualmente produzidos em escala industrial por via fermentativa.

Aminoácidos

Os aminoácidos são as unidades fundamentais das proteínas. Eles são estruturalmente formados por um grupo carboxil e um grupo amino ligados a um mesmo átomo de carbono (carbono α). Eles diferem uns dos outros em suas cadeias laterais (grupos R), as quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, influenciando a solubilidade do aminoácido em água. O carbono α liga-se, além dos grupos amino, carboxil e grupos R, a um átomo de hidrogênio, sendo assim considerado um centro quiral. Todas as moléculas com centros quirais são também opticamente ativas e podem formar estereoisômeros. Compostos biológicos com um centro quiral ocorrem naturalmente em apenas uma forma estereoisomérica, D ou L. Os resíduos de aminoácidos em moléculas de proteínas são exclusivamente L isômeros (Nelson e Cox, 2000).

Os L-aminoácidos apresentam um largo espectro de uso

Débora D. V. Silva, Walter Carvalho, Larissa Canilha e Ismael M. Mancilha*

Faculdade de Engenharia
Química de Lorena
Departamento de
Biotecnologia

* Autor para correspondência:
Rod. Itajubá-Lorena, Km 74,5
CEP 12600-970. Lorena. SP
CP 116
Fone: (12) 3159-5027
Fax: (12) 3153-3133
E-mail:
carvalho@debiq.fauenquil.br

comercial como aditivos alimentares, suplementos alimentares, agentes terapêuticos e precursores para a síntese de peptídeos e agro-químicos (Sahm *et al.*, 1995). A grande importância dos aminoácidos está na alimentação humana e no enriquecimento de ração animal, pois um grande número de aminoácidos não é sintetizado no organismo de animais superiores. O organismo humano é incapaz de sintetizar metade dos 20 aminoácidos essenciais, e esses aminoácidos devem, portanto, ser introduzidos na dieta através da alimentação. Desta forma, cerca de 70% da produção industrial de aminoácidos é utilizada na formulação de alimentos, sendo os 30% restantes utilizados como aditivos de rações (Sato, 2001).

Alguns aminoácidos como glutamato, lisina, fenilalanina, aspartato, treonina e isoleucina são atualmente obtidos por via fermentativa (Demain, 2000a). As fermentações empregam diferentes fontes de carbono, como glicose, frutose, melão, hidrolisados de amido, n-alcenos, etanol, glicerol, acetato, propionato, etc (Sato, 2001). As fermentações que utilizam metanol como matéria-prima têm sido estudadas devido ao baixo custo deste substrato, porém não têm sido utilizadas comercialmente, devido aos baixos rendimentos (Motoyama *et al.*, 2001, Sato, 2001).

A Figura 1 apresenta um esquema simplificado da biossíntese de aminoácidos. Dentre os microrganismos empregados na produção de aminoácidos, têm sido mencionados como bons produtores a *Escherichia coli* (Gerigk *et al.*, 2002 a, b) e espécies dos gêneros *Brevibacterium* (Yao, *et al.*, 2001) e *Corynebacterium* (Sahm, *et al.*, 1995, Wada *et al.*, 2002, Hermann, 2003). A bioquímica, fisiologia e biologia molecular da biossíntese de aminoácidos em *Corynebacterium glutamicum* têm sido intensivamente estudadas. O conhecimento das vias biossintéticas e dos fatores que as regulam mostram que as vias metabólicas que levam à formação dos aminoácidos são muito mais simples neste microrganismo quando comparadas a outros

como *E. coli*, fazendo com que esta bactéria possa ser manipulada para a produção de vários aminoácidos. (Sahm *et al.*, 1995).

A tecnologia do DNA recombinante bem como as tradicionais técnicas de seleção e mutagênese têm sido as principais estratégias utilizadas na construção de cepas bacterianas capazes de produzir aminoácidos com alto rendimento, como por exemplo: 100g/L de L-treonina, 40g/L de L-isoleucina, 34g/L de L-leucina, 31g/L de L-valina, 28g/L de L-fenilalanina, 58g/L de L-triptofano, 26g/L de L-tirosina, 100g/L de L-prolina, 65g/L de L-arginina e 40g/L de L-histidina (Demain, 2000 a, b).

Atualmente, mais de 2 milhões de toneladas de aminoácidos são produzidas por ano, movimentando um mercado de aproximadamente US\$ 3 bilhões. A maior parte desta produção é feita utilizando espécies de *Corynebacterium* (Hols *et al.*, 1999, Hermann, 2003). O mercado mundial para aminoácidos é estimado como sendo da ordem de US\$ 915 milhões para L-glutamato, de US\$ 600 milhões para L-lisina, US\$ 198 milhões para L-fenilalanina e US\$ 43 milhões para L-aspartato (Demain, 2000 a, b).

A produção de aminoácidos vem sendo desenvolvida desde o final da década de 1950. Atualmente, são utilizados biorreatores de 50 a 500m³ e as fermentações são conduzidas nos modos batelada, batelada alimentada, batelada alimentada repetida, ou contínuo (Hermann, 2003).

A produção de aminoácidos em modo descontínuo de fermentação é a mais empregada (Sato, 2001, Morbach e Krämer, 2002), porém tem como desvantagem uma produtividade relativamente baixa devido ao aumento da fase lag (Hermann, 2003). O modo de batelada alimentada também é válido na produção de aminoácidos, tendo como principais vantagens: o controle da concentração dos nutrientes, reduzindo a sua influência no rendimento e produtividade do processo (Gourdon e Lindley, 1999); a redução do estresse osmótico das células (Ikeda, 2003); e o melhor controle da transferência de oxigênio no biorreator (Hermann, 2003). Para o modo de batelada alimentada repetida, são apontados como principal vantagem a maior produtividade devido à diminuição da fase lag das bactérias, e como principal desvantagem o alto risco de contaminações (Hermann, 2003). A utilização de processo contínuo também tem sido descrita na produção de aminoácidos, porém apresenta como principais desvantagens o risco de contaminações e a instabilidade genética das cepas empregadas (Azuma *et al.*, 1988, Hirao *et al.*, 1989).

Além do modo de condução da fermentação, o controle de alguns fatores físicos (temperatura), químicos (pH, oxigenação) e microbiológicos (espécie, linhagem, concentração do microrganismo, contaminações) é fundamental para garantir a eficiência do processo.

O preparo do inóculo é o primeiro passo crucial do bioprocessamento, uma vez que influencia significativamente o rendimento e a produtividade do processo, devendo-se considerar sua estabilidade e quantidade (Hermann, 2003). A concentração de oxigênio dissolvido e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) também influenciam o processo (Yao *et al.*, 2001, Shu e Liao, 2002). A temperatura também é um parâmetro importante, e é variável dependendo do microrganismo. Elevadas temperaturas são

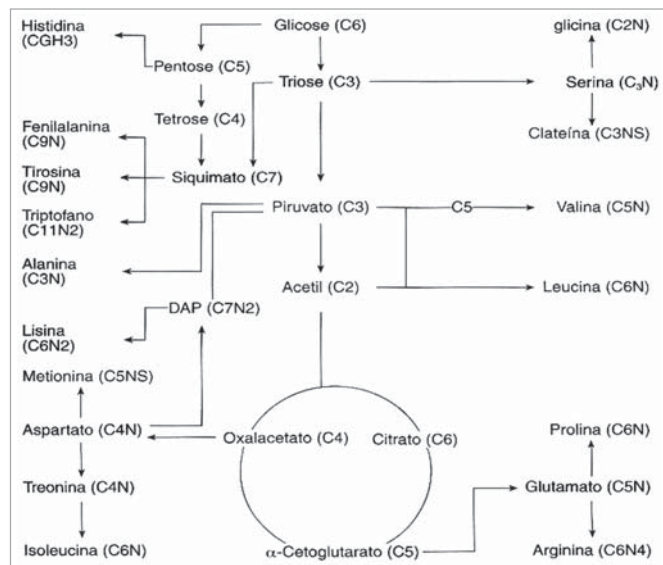


Figura 1. Biossíntese de aminoácidos utilizando glicose como fonte principal de carbono (Sato, 2001)

usadas para induzir a produção de ácido L-glutâmico em certas cepas (Gourdon e Lindley, 1999, Delaunay *et al.*, 2002).

Ao final do processo, a separação da biomassa é geralmente o primeiro passo para a purificação do aminoácido. A remoção da massa celular é realizada por técnicas de centrifugação, decantação ou filtração. Após a separação da biomassa, inicia-se a fase de purificação do produto. Comumente utilizam-se técnicas de cromatografia, concentração e cristalização. O método ou a seqüência de métodos usados depende principalmente das propriedades físico-químicas do aminoácido e da aplicação do produto (Osterberg e Wadsten, 1999, Lee *et al.*, 2002, Gerigk *et al.*, 2002 a,b, Ikeda, 2003, Hermann, 2003).

Ácido L-Glutâmico

No final de década de 1950, no Japão, foi selecionada uma bactéria que excretava grandes quantidades de ácido L-glutâmico no meio de cultura. Esta bactéria, *Corynebacterium glutamicum* é um pequeno bastonete gram-positivo, não esporulante, imóvel, capaz de crescer em meio simples. Sob condições ótimas, este organismo converte cerca de 100 g/L de glicose em 50 g/L de ácido L-glutâmico em poucos dias (2-4 dias) (Sahm *et al.*, 1995). Outras cepas industrialmente importantes, capazes de excretar cerca de 30 g/L de ácido L-glutâmico pertencem aos gêneros *Brevibacterium*, *Microbacterium* ou *Arthrobacterium* (Crueger, 1984).

O precursor-chave do ácido glutâmico é o α -cetoglutarato (FIGURA 1), que se forma no ciclo de Krebs via citrato e isocitrato, e logo se converte em ácido L-glutâmico por aminação redutiva com íons NH_4^+ livres. Essa última etapa é catalisada pela NADP-dependente glutamato desidrogenase. A produção e a secreção de quantidades em excesso de ácido glutâmico dependem da permeabilidade da célula (Sato, 2001). O aumento da permeabilidade pode ser obtido de diferentes maneiras, principalmente através da deficiência de biotina no meio de fermentação. A presença de biotina em concentrações superiores a 5 μg resulta em elevado conteúdo de fosfolipídios na parede celular, incapacitando a célula de excretar o ácido glutâmico. Por outro lado, a deficiência de biotina no meio reduz a síntese de fosfolipídios e o ácido glutâmico intracelular pode ser excretado; sendo a concentração ótima de biotina dependente da fonte de carbono usada (Crueger, 1984).

A partir da manipulação genética dos organismos, várias tentativas têm sido feitas para se alcançar diferentes estratégias para otimizar a fermentação de glutamato, incluindo a superexpressão ou deleção de genes (Nielsen, 1998), o reciclo de células (Izhizaki *et al.*, 1993) e a imobilização de células em alginato de sódio e espuma de poliuretano (Nampoothiri e Pandey, 1998).

O ácido L-glutâmico, também conhecido como glutamato monossódico (GMS) (Hermann, 2003) é, do ponto de vista comercial, o aminoácido mais importante, sendo obtido exclusivamente por fermentação e amplamente consumido como aditivo alimentar ou realçador de sabor em alimentos (Nampoothiri e Pandey, 1998). Cerca de 1,5 milhões de toneladas de ácido L-glutâmico são produzidas por ano usando espécies de *Corynebacterium*. O mercado de ácido L-glutâmico cresce cerca

de 6% ao ano e os principais produtores são: Ajinomoto, Miwon, Kyowa-Hakko e Cheil-Jedang (Hermann, 2003).

L-Lisina

Lisina é um aminoácido essencial à nutrição animal e humana. É encontrada apenas em proteínas vegetais em baixas concentrações; a adição de lisina pode aumentar a qualidade de alimentos de origem vegetal. A lisina tem sido produzida apenas por bioprocessos usando bactérias corineformes (Crueger, 1984, Hermann, 2003).

Eficientes produtores de L-lisina se encontram entre os mutantes de *Corynebacterium* e *Brevibacterium*, produtores de ácido L-glutâmico, que sejam auxotróficos de homoserina ou auxotróficos de metionina-treonina. Os tipos-selvagem destes organismos não secretam lisina, mas cepas produtoras deste aminoácido têm sido obtidas através de programas de seleção clássica. Cepas boas produtoras de lisina também são encontradas entre os microrganismos resistentes ao antimetabólito de lisina S-(β -aminoetil)-L-cisteína (Sato, 2001). Os antimetabólitos, devido à sua similaridade estrutural aos metabólitos, podem causar inibição por feedback, ou seja, quando o produto final inibe a atividade da primeira enzima da via (Crueger, 1984).

A L-lisina é sintetizada pela via do ácido diaminopimélico (DAP) ou pela via do ácido aminoadípico (FIGURA 1), entretanto o microrganismo somente utiliza uma das alternativas. Por exemplo, bactérias usam a via DAP, alguns fungos filamentosos como os ascomicetos usam a via do ácido aminoadípico (White, 1983, Sato, 2001).

O DAP pode ser sintetizado a partir do aspartato por três vias diferentes, identificadas em bactérias (Scapin e Blanchard, 1998). Das seis enzimas que convertem aspartato em lisina, a aspartato quinase e a dihidrodipicolinato sintase são as responsáveis pelo controle do fluxo metabólico nesta via biossintética. Pela superexpressão combinada destas duas enzimas é possível aumentar a secreção de lisina em cerca de 10-20% (Cremer, Eggeling e Sahm, 1991; Sahm *et al.*, 1995). A secreção de lisina é mediada por carreadores específicos, sendo que em *C. glutamicum* esta é excretada por um sistema de transporte do tipo simporte com dois íons OH^- (Böer e Krämer, 1991, Schruppf, Eggeling e Sahm, 1992). Os genes diretamente envolvidos na síntese de L-lisina são os alvos principais em estudos para otimização do processo de fermentação, e a maioria destes genes já foi identificada em *C. glutamicum* (Wehrmann, Eggeling e Sahm, 1994, Hartmann *et al.*, 2003).

Na produção industrial de lisina, os açúcares presentes no melaço de cana têm sido primariamente usados como fonte de carbono; acetato, etanol ou alcanos também podem ser usados. Sais de amônia são usados como fonte de nitrogênio. Fatores de crescimento como L-homoserina ou L-treonina e L-metionina devem ser adicionados ao meio, mas em concentrações subótimas para evitar efeitos regulatórios indesejáveis. O conteúdo de biotina no meio deve ser abaixo de 30 $\mu\text{g/L}$ para uma ótima produção de lisina (Crueger, 1984).

Comparada ao ácido L-glutâmico, a lisina é usada quase

completamente como um aditivo alimentar. Em 2001, o mercado mundial para lisina era de 550 mil toneladas com uma taxa de crescimento de 7% ao ano. Os principais produtores são: Ajinomoto, ADM, Kyowa Hakko, Cheil Jedang, BASF e Degussa (Hermann, 2003).

L-Triptofano

L-triptofano é um aminoácido essencial, requerido pelo metabolismo de mamíferos, os quais dependem de plantas e microrganismos para sua suplementação. Tradicionalmente tem sido produzido através de síntese química, processos fermentativos ou conversão enzimática de intermediários sintetizados quimicamente (Mateus *et al.*, 2004).

A via biossintética de triptofano tem sido encontrada em muitos microrganismos, mas existem diferenças consideráveis na sua regulação (Figura 1). Em *C. glutamicum*, a biossintese de triptofano é regulada pela atividade da DAHP sintetase e antranilato sintase. A DAHP (3-deoxi-D-ácido arabinohexulônico-7 fosfato) sintetase, que catalisa a condensação de eritrose-4 fosfato e fosfoenolpiruvato (PEP), apresenta inibição por feedback pela fenilalanina e tirosina. A antranilato sintase, a primeira enzima da biossintese do triptofano, apresenta inibição por feedback e repressão devido ao triptofano (Crueger, 1984).

A produção industrial de triptofano através de processos fermentativos tem sido realizada empregando-se diferentes cepas de *E. coli* e *Corynebacterium glutamicum* metabolicamente engenheiradas (Gerick *et al.*, 2002 a, b; Ikeda e Katsumata, 1999). A via biossintética de triptofano em microrganismos geneticamente modificados tem recebido significativas modificações genéticas para aumentar a eficiência do fluxo de carbono para a produção de triptofano (Kawasaki, Yokota e Tomita, 1996; Sato, 2001). O principal fator limitante do fluxo de carbono para o triptofano pode ser o potencial das cepas para suprir os precursores diretos da biossintese de compostos aromáticos, fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato, sendo que eritrose-4-fosfato tem sido considerado o primeiro metabólito limitante da biossintese do triptofano, principalmente em *C. glutamicum* geneticamente modificado (Ikeda *et al.*, 1994; Ikeda e Katsumata, 1999).

O triptofano tem sido aplicado especialmente na formulação de produtos alimentícios e em rações animais. Em 2001 foram produzidas aproximadamente 1200 toneladas de L-triptofano, sendo que os líderes do mercado na produção deste aminoácido são: Ajinomoto, Kyowa Hakko e ADM (Hermann, 2003).

L-Treonina

L-treonina também faz parte do grupo dos aminoácidos essenciais. Sua via biossintética é complexa e interconectada a outras vias de biossintese de outros aminoácidos. Em alguns casos, as vias em bactérias, fungos e plantas diferem significativamente. Em bactérias, a partir do aspartato ocorre a formação de homoserina, o precursor da treonina (Figura 1), que também é precursor de isoleucina (Nelson e Cox, 2000).

A produção comercial de treonina depende da fermentação bacteriana a partir de fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo. Para alcançar alta produção de treonina a baixo custo, têm sido desenvolvidos estudos para obtenção de microrganismos capazes de produzir L-treonina com alto rendimento a partir de substratos como a glicose (Okamoto e Ikeda, 2000). Entre os microrganismos mais utilizados para a produção deste aminoácido encontram-se cepas de *E. coli* e cepas de *C. glutamicum* geneticamente modificadas pela amplificação dos genes responsáveis pela biossintese de treonina (Sahm *et al.*, 1995; Okamoto, Kino e Ikeda, 1997; Okamoto e Ikeda, 2000; Hermann, 2003). Em *C. glutamicum*, o fluxo de carbono de aspartato para treonina está sujeito ao controle exercido pelos fatores regulatórios da aspartato quinase, pelos níveis de homoserina desidrogenase e homoserina quinase. Estas enzimas são inibidas pela L-treonina (inibição por feedback) e pela isoleucina (Peoples *et al.*, 1988). As outras enzimas envolvidas na biossintese de treonina, aspartato-semialdeído-desidrogenase e treonina sintase parecem não estar sujeitas a qualquer inibição ou repressão (Eikmanns *et al.*, 1991). Mutantes de *C. glutamicum* possuindo homoserina desidrogenase insensível à inibição por feedback pela L-treonina têm sido obtidos por mutagênese clássica (Archer, Solow-Cordero e Sinskey, 1991; Eikmanns *et al.*, 1991).

L-treonina é usado quase exclusivamente como aditivo alimentar, especialmente na dieta de porcos e aves domésticas. Em 2002, o mercado mundial de L-treonina foi de cerca de 30.000 toneladas, com um crescimento anual aproximado de 15%. Os principais produtores são: Ajinomoto, ADM e Degussa (Hermann, 2003).

L-Isoleucina

L-isoleucina é um membro da família de aminoácidos derivados de aspartato (Figura 1), mais especificamente originada a partir de treonina (Eggeling, Morbach e Sahm, 1997). As enzimas que sintetizam esta família de aminoácidos têm sido bem caracterizadas em *Corinebacterium* spp. (Guilloet *et al.*, 1999).

A biossintese de isoleucina ocorre a partir de cinco reações catalisadas pelas enzimas treonina desidratase, acetohidroxi sintase, isômero redutase, dihidroxi desidratase e transaminase B (Colón *et al.*, 1995; Sahm *et al.*, 1995). O mais importante ponto de regulação durante a produção de isoleucina é a inibição pelo produto final sobre a primeira das enzimas, a treonina desidratase, levando à inibição por feedback (Sahm *et al.*, 1995; Eggeling, Morbach e Sahm, 1997). Mutantes apresentando treonina desidratase com reduzida sensibilidade por isoleucina têm sido utilizados na produção de isoleucina (Morbach, Sahm e Eggeling, 1995; Hashiguchi *et al.*, 1997). Também têm sido desenvolvidos estudos com *C. glutamicum* superexpressando os genes que sintetizam a treonina desidrogenase, enzima que controla o fluxo de treonina para isoleucina, proporcionando aumento do rendimento deste bioprocessos (Kelle *et al.*, 1996; Guilloet *et al.*, 1999).

L-isoleucina tem sido empregada na formulação de produtos

dietéticos e sua produção é de cerca de 13.000 toneladas por ano, o que movimentou um mercado de aproximadamente US\$ 43 milhões (Demain, 2000 a).

Vitaminas

A denominação genérica vitamina é dada a substâncias orgânicas complexas de diferente classificação química encontradas em alimentos, geralmente em quantidades pequenas, e indispensáveis no metabolismo animal ou vegetal. Industrialmente, as vitaminas eram obtidas apenas por processos de extração e síntese. Mais recentemente, têm sido desenvolvidos processos para a obtenção de vitaminas por fermentação. Embora quase todas as vitaminas sejam formadas no metabolismo de microrganismos, a produção por fermentação tem sido relatada para riboflavina (vitamina B₂), cobalaminas (onde está situada a cianocobalamina ou vitamina B₁₂), biotina e ácido ascórbico (vitamina C) (Aquarone, 2001).

Riboflavina (vitamina B₂)

A riboflavina ou vitamina B₂, também denominada lactoflavina ou vitamina G, é um sólido microcristalino de cor amarelo-alaranjada, amargo e inodoro. Embora higroscópica, é pouco solúvel em etanol e água, e praticamente insolúvel em solventes orgânicos. É resistente aos ácidos, mas decompõe-se rapidamente em meio alcalino e também na presença de luz, embora seja bastante resistente ao calor (Aquarone, 2001).

A riboflavina é um precursor das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), que são requeridas em reações tais como as de oxidação enzimática de carboidratos. A deficiência desta vitamina no homem está correlacionada com a perda de cabelo, inflamações da pele, problemas de visão e deficiência de crescimento. A quantidade diária de consumo de riboflavina recomendada para adultos é de 1,6mg (Sybesma *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, a produção de riboflavina era realizada por processos químicos, mas nos últimos anos os processos biotecnológicos têm se tornado mais populares usando organismos como *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*, *Ermothecium ashbyii* e *Candida famata* (Pujari e Chandra, 2000; Stahmann, Revuelta e Seulberger, 2000). Microrganismos como *A. gossypii* produzem 40.000 vezes mais riboflavina do que é necessário para o seu próprio crescimento. A chave bioquímica para esta superprodução da riboflavina parece envolver a insensibilidade aos efeitos repressivos do ferro. Novos processos usando espécies de *Candida* ou cepas recombinantes de *B. subtilis* têm sido desenvolvidos, os quais produziram de 20-30g/L de riboflavina (Demain, 2000a).

O fungo filamentososo *Ashbya gossypii* é biotecnologicamente um importante produtor da vitamina B₂. Algumas cepas utilizadas para a produção comercial de riboflavina produzem acima de 15g/L. Existem numerosos esforços para melhorar a produção de riboflavina por *A. gossypii* pela otimização da composição do meio e das condições de fermentação (Ozbas e Kutsal, 1986), bem como pela seleção de mutantes antimetabólitos-resistentes

(Schmidt, Stahmann e Sahn, 1996).

A via biossintética apresentada na Figura 2 é postulada com base em experimentos realizados primeiramente com leveduras e também com *A. gossypii*.

Candida famata é uma espécie de levedura asporogênica capaz de superproduzir riboflavina em meio deficiente em ferro (Voronovsky *et al.*, 2002) com alto potencial flavinogênico (Stahmann, Revuelta e Seulberger, 2000). Além dos tradicionais métodos de seleção para a obtenção de cepas de *C. famata* com potencial para produção industrial de riboflavina, métodos de clonagem molecular e transformação têm sido desenvolvidos para a construção de produtores melhores e mais estáveis (Voronovsky *et al.*, 2002).

A produção de riboflavina utilizando *B. subtilis* recombinante requer uma eficiente geração de energia e abundante suprimento de precursores (Sauer *et al.*, 1997; Hümlerling *et al.*, 1999; Perkins *et al.*, 1999; Dauner, Storni, Sauer, 2001). *B. subtilis* possui uma cadeia respiratória ramificada (Neijssel e Teixeira De Mattos, 1994; Richardson, 2000), além disso, espécies do gênero *Bacillus* industrialmente importantes parecem operar suas cadeias respiratórias abaixo do máximo teórico (Sauer *et al.*, 1996; Sauer e Bailey, 1999; Christiansen e Nielsen, 2002). Assim, com a utilização de estratégias de engenharia metabólica que permitam redirecionar o fluxo de elétrons na cadeia respiratória de *B. subtilis* para uma ramificação mais eficiente, e a modificação do metabolismo energético celular é possível otimizar o bioprocessamento industrial (Zamboni *et al.*, 2003).

Eficiente produção de vitamina B₂ com *B. subtilis* a partir de glicose tem sido obtida utilizando-se o sistema de batelada alimentada, possibilitando que a produção seja competitiva ao processo químico em termos de custos de produção (Horiuchi e Hiraga, 1999). Após as fermentações, são utilizados métodos de

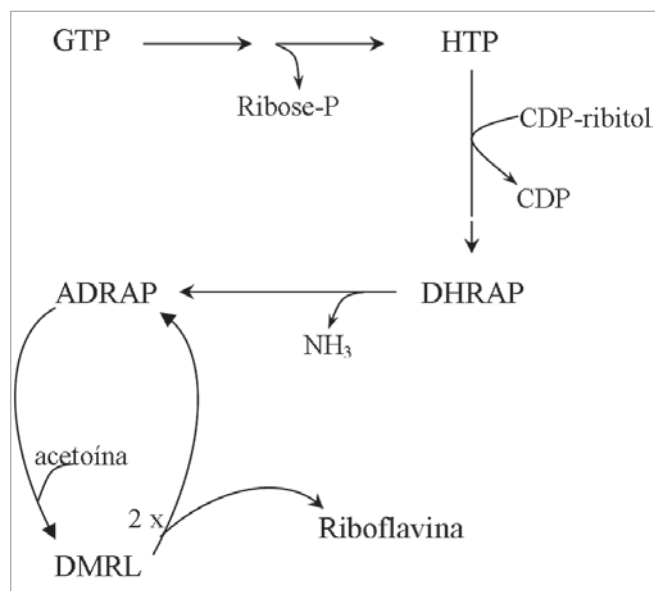


Figura 2. Provável via biossintética de riboflavina (Crueger, 1984). Abreviações: HTP, 6-hidroxi-2,4,5-triaminopirimidina; DHRAP, 2,5-diamino-6-hidroxi-4-ribitilaminopirimidina; ADRAP, 5-amino-2,6-dihidroxi-4-ribitilaminopirimidina; DRML, 6,7-dimetil-8-ribitilumazina

filtração, centrifugação e cristalização para a separação e purificação da riboflavina (Aqarone, 2001). A riboflavina está presente em solução e ligada ao micélio no caldo fermentado. A vitamina ligada ao micélio é liberada das células através de um tratamento térmico (1 hora, 120°C) e o micélio é separado e descartado, podendo, então, a riboflavina ser purificada (Crueger, 1984).

Por ano são produzidas mais de 2.000 toneladas de riboflavina, que tem sido bastante usada no enriquecimento nutricional de alimentos e rações animais (Pujari e Chandra, 2000; Demain, 2000a; Sybesma *et al.*, 2004).

Cianocobalamina (vitamina B₁₂)

A cianocobalamina ou vitamina B₁₂ é um sólido cristalino de cor vermelho escuro, inodoro e insípido. É higroscópica, muito solúvel em água e etanol, e insolúvel em solventes orgânicos. Decompõe-se rapidamente em meio alcalino e em soluções com valores de pH inferiores a 4,5 (Aqarone, 2001).

A vitamina B₁₂ tem sido produzida intracelularmente ou extracelularmente por fermentação em escala industrial usando processos em batelada ou batelada alimentada. A produção da vitamina B₁₂ através de síntese química é praticamente impossível, devido ao grande número de reações requeridas (70 reações) (Crueger, 1984; Ye *et al.*, 1996).

Vários microrganismos, incluindo *Propionibacterium*, *Methanosarcina* e *Butriobacterium* têm sido investigados como produtores de vitamina B₁₂. A biossíntese de vitamina B₁₂, a qual acontece em paralelo a biossíntese de porfirinas e clorofila, está esquematizada na Figura 3.

Dentre os microrganismos convencionalmente utilizados na produção de vitamina B₁₂ estão *Propionibacterium*, *Methanosarcina*, *Butriobacterium*, *Acetobacterium*, *Pseudomonas* (Miyano, Ye, Shimizu, 2000). Tais cepas produzem cerca de 100.000 vezes mais vitamina B₁₂ do que é necessário para o seu próprio crescimento, com a produção alcançando o nível de 150mg/L (Demain, 2000 a).

As propionobactérias produzem vitamina B₁₂ intracelularmente e excretam os ácidos propiônico e acético (Ye *et al.*, 1996), que inibem o crescimento celular (Hsu e Yang, 1991). Como em muitas fermentações bacterianas de ácidos orgânicos, os produtos finais, especialmente o propionato, inibem o crescimento celular, tornando-se necessário remover os produtos finais e assim promover o crescimento celular, o qual resulta em melhoria da produtividade da vitamina B₁₂ (Hsu e Yang, 1991; Myano, Ye e Shimizu, 2000). Segundo Myano, Ye e Shimizu (2000), vários processos fermentativos têm sido desenvolvidos para remover os ácidos propiônico e acético do meio de fermentação, entre eles destaca-se a fermentação em dois estágios. Neste processo, o primeiro estágio é uma fermentação anaeróbia e o segundo estágio é uma fermentação aeróbia, para a decomposição do ácido propiônico (Quesada-Chanto, Afschar e Wagner, 1994).

Um outro processo de produção de vitamina B₁₂ tem sido desenvolvido utilizando-se organismos metanogênicos. Neste processo, a produção de vitamina B₁₂ pode ser 10 vezes maior do que usando microrganismos propiônicos e o produto principal,

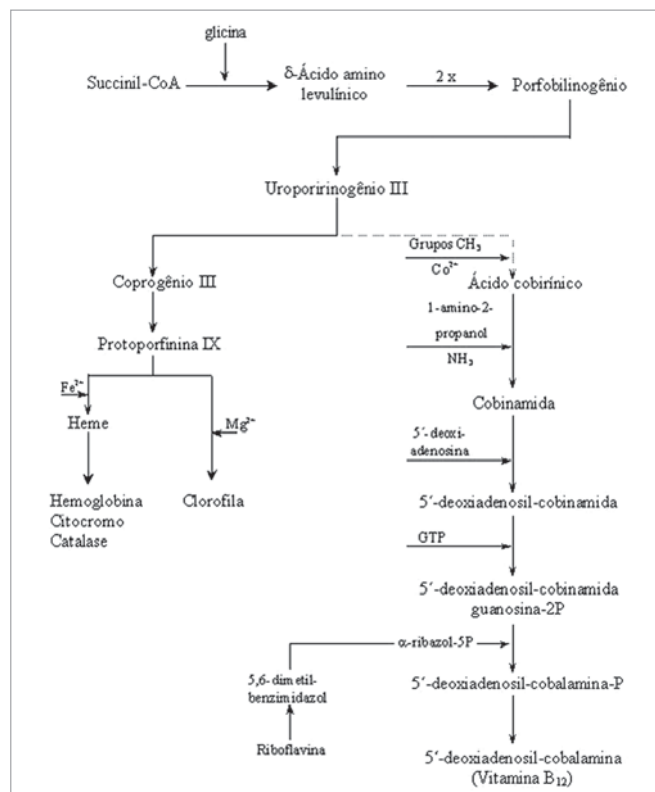


Figura 3. Biossíntese de cobalaminas (Crueger, 1984)

o metano, não inibe o crescimento dos microrganismos metanogênicos. Além disso, metanol, CO₂ e ácido acético, usados como substrato, são considerados fontes de carbono baratas, relativamente estáveis e renováveis (Yang *et al.*, 2004).

Também tem sido relatada a produção da vitamina B₁₂ por *Pseudomonas denitrificans* (Crueger, 1984). Neste processo, observa-se a produção de vitamina durante toda a fermentação, desde que se adicione sal de cobalto e DBI (5,6-dimetilbenzimidazol), essenciais para a sua biossíntese, e deve-se trabalhar em aerobiose intensa (Aqarone, 2001). Sabe-se que, neste processo, a produção de vitamina B₁₂ é totalmente dependente de betaína, e apesar do mecanismo de ação ainda ser desconhecido, presume-se que ela cause ativação da biossíntese ou um aumento na permeabilidade da membrana (Kusel *et al.*, 1984).

Após a fermentação, são utilizados processos de centrifugação, adsorção em colunas de resina ou sílica gel, extração com fenol ou cresol, precipitação ou cristalização e purificação (Binder *et al.*, 1982; Aqarone, 2001). Cerca de três toneladas de cianocobalamina são produzidos por ano, movimentando um mercado em torno de US\$ 71 milhões (McCoy, 1999).

Ácido ascórbico (vitamina C)

O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, apresenta-se como sólido branco cristalino, inodoro e de sabor ácido. Solúvel em água, álcoois e acetona é, entretanto, insolúvel nos demais solventes orgânicos. É sensível à luz e resiste ao calor (Aqarone, 2001).

Segundo Wilke (1999), são produzidas cerca de 60.000 toneladas de ácido ascórbico por ano, movimentando um mercado de US\$ 60 milhões. Aproximadamente 50% do ácido ascórbico produzido é usado na formulação de suplementos vitamínicos. Suas propriedades antioxidantes também são exploradas no processamento de alimentos (25% da produção total) e bebidas (15%) para prevenir a perda de pigmentação, proteger o aroma e o sabor, ou para enriquecimento nutricional. A vitamina C também é comumente usada na formulação de ração animal (10% da produção total) (Maeland e Waagbo, 1998; Madej e Grzeda, 2000).

Atualmente, a maior parte da vitamina C comercializada é produzida através do processo Reichstein, a partir de glicose. Este processo consiste de seis passos químicos e uma etapa fermentativa para a oxidação de D-sorbitol em L-sorbose (Figura 4A) (Aquarone, 2001; Hancock, Viola, 2002). Porém, fatores econômicos têm gerado substancial interesse na exploração da biotransformação microbiana para a obtenção desta vitamina

(Demain, 2000 a; Hancock e Viola, 2002).

Devido à ampla utilização de leveduras na bio-indústria, o desenvolvimento de cepas capazes de fermentar açúcares simples diretamente em ácido ascórbico (Figura 4B) tem recebido grande atenção (Hancock e Viola, 2002). Muitas leveduras acumulam ácido ascórbico quando crescem em presença de L-gulonolactona, L-galactonolactona ou L-galactose (Hancock, Galpin e Viola, 2000; Spickett *et al.*, 2000).

Existem processos que utilizam microrganismos geneticamente modificados como *Erwinia herbicola*, expressando um gene de *Corynebacterium sp.*, e que convertem glicose em ácido 2-ceto-gulônico, o qual pode ser facilmente convertido por ácido ou base, em ácido ascórbico (Pramik, 1986). Em outro processo, é possível converter 40g de glicose em 20g de 2-ceto-L gulonato (Grindley *et al.*, 1988). Este processo envolve a clonagem do gene que codifica a 2,5-diceto-D-gluconato redutase de *Corynebacterium sp.* em *Erwinia citreus*. Também tem sido

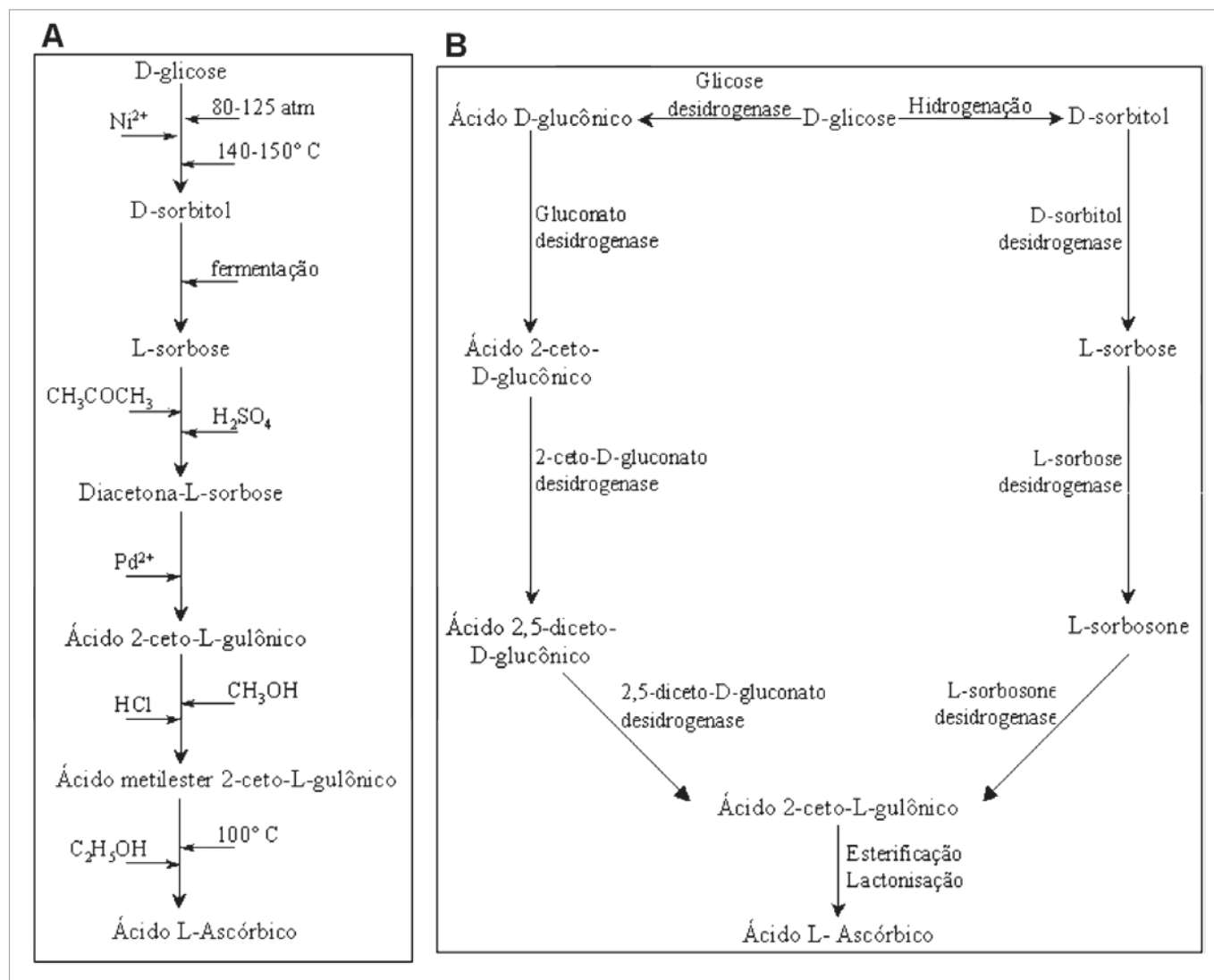


Figura 4. (A) Produção de ácido ascórbico pelo processo Reichstein; (B) Vias microbianas de síntese de ácido ascórbico (Hancock e Viola, 2002)

estudada a clonagem plasmidial dos genes que codificam a L-sorbose desidrogenase e L-sorbose desidrogenase de *Gluconobacter oxydans*, gerando uma cepa capaz de converter 150g/L de L ou D-sorbitol em 130g/L de 2-ceto-L-gulonato (Saito *et al.*, 1997).

Biotina

A biotina (vitamina H) apresenta-se em pó ou microagulhas incoloras. Solúvel em álcool e em água alcalina ou quente, é insolúvel em solventes orgânicos comuns (Aquarone, 2001).

Esta vitamina é sintetizada por microrganismos e plantas,

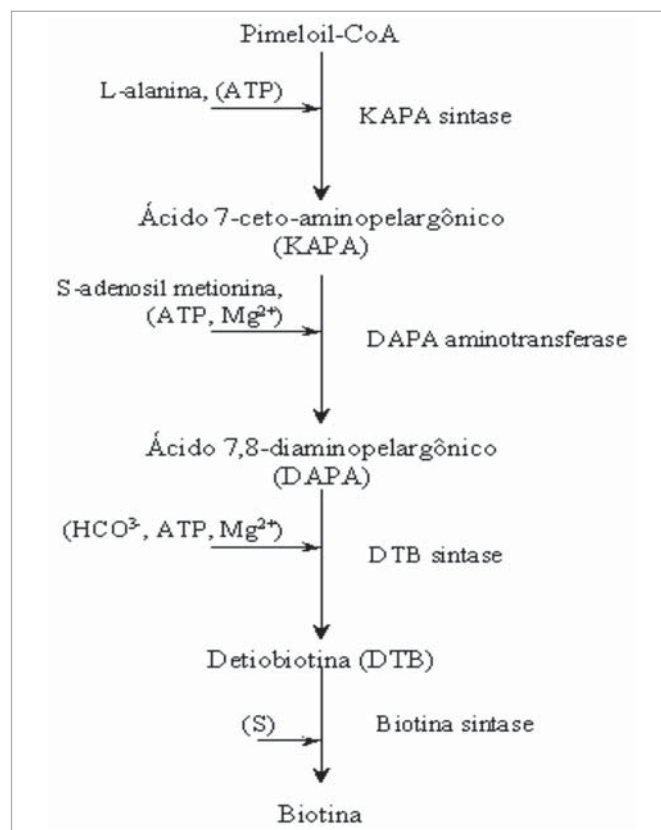


Figura 5. Biossíntese de biotina (Saito *et al.*, 2000)

atuando como cofator essencial para reações catalisadas por carboxilases. Esta vitamina é comercializada como alimento ou aditivo alimentar, aditivo cosmético ou produto farmacêutico (Saito *et al.*, 2000).

Tradicionalmente, a biotina é sintetizada quimicamente em escala industrial, em processo de múltiplos passos (Ohshiro *et al.*, 1998). A via biossintética da biotina em bactérias tem sido investigada, especialmente em *Bacillus sphaericus* (Gloeckler *et al.*, 1990; Ohshiro *et al.*, 1994), *Escherichia coli* (Ohshiro *et al.*, 1995; Sanyal, Gilson e Flint, 1996), *Bacillus subtilis* (Bower *et al.*, 1996), *Shingomonas sp* (Saito *et al.*, 2000). A produção de biotina por processo fermentativo tem recebido muita atenção devido ao seu potencial de baixos custos de produção (Demain, 2000 a).

Na via biossintética da biotina (Figura 5), as enzimas que catalisam a conversão de ácido pimélico ou pimelil-CoA em detiobiotina (DTB) têm sido investigadas, mas a enzima responsável pelo último passo, a conversão de DTB em biotina ainda não foi completamente caracterizada (Ohshiro *et al.*, 1998), mas alguns estudos apontam esta reação como o passo mais importante no processo de produção microbiana de biotina (Zhang *et al.*, 1994; Serebriiskii, Vassin e Tsygankov, 1996; Ohshiro *et al.*, 1998).

Cepas de *Serratia marcescens* obtidas por mutagenese, selecionadas para resistência a antimetabólitos de biotina produziram 600mg/L de biotina na presença de altas concentrações de enxofre e ferro (Masuda *et al.*, 1995). Tal resultado é considerado alto suficiente para competir economicamente com o processo químico tradicional (Demain, 2000a). Cepas de *Agrobacterium/Rhizobium HK4* carregando genes de *E. coli* produziram cerca de 110mg/L de biotina (Shaw *et al.*, 1999).

Entre os métodos usados para a purificação da biotina do caldo fermentado estão a separação dos microrganismos por filtração e absorção da biotina com carvão vegetal ativo. Após eluição, a purificação é feita por cromatografia com resina de troca iônica seguida de cristalização (Aquarone, 2001).

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro recebido da FAPESP, da CAPES e do CNPq para o desenvolvimento de projetos de pesquisa.

Referências

1. Aquarone E. *Produção de aminoácidos*. In: Lima UA, Aquarone E, Borzani W, Schmidell W. **Biocologia Industrial**, v. 3 *Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Ed. Edgard Blücher Ltda., São Paulo, pp.593, 2001.
2. Archer JAC, Solow-Cordero DE, Sinskey AJ. *A C-terminal deletion in Corynebacterium glutamicum homoserine dehydrogenase abolishes allosteric inhibition by L-threonine*. *Gene*, v. 107, p. 53-59, 1991.
3. Azuma T, Nakanishi T. *Factors affecting L-arginine production in the continuous culture of an L-arginine producer of Corynebacterium acetoacidophilum*. *Journal of Fermentation Technology*, v. 66, p. 285-290, 1998.
4. Binder M, Kolhouse JF, Van Horne KC, Allen RH. *High-pressure liquid chromatography of cobalamins and cobalamin analogs*. **Analytical Biochemistry**, v. 125, n. 2, p. 253-258, 1982.
5. Bower S, Perkins JB, Yocum RR, Howitt CL, Rahaim P, Pero J. *Cloning, sequencing and characterization of the Bacillus subtilis biotin biosynthetic operon*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 4122-4130, 1996.
6. Bröer S, Krämer R. *Lysine excretion by Corynebacterium glutamicum: 2. Energetics and mechanism of the transport system*. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, p. 137-143, 1996.
7. Christiansen T, Nielsen J. *Growth energetics of an alkaline*

- serine protease-producing strain of *Bacillus cksii* during continuous cultivation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 24, p. 329-339, 2002.
8. Colón GE, Nguyen TT, Jetten MS, Sinskey AJ, Stephanopoulos G. Production of isoleucine by overexpression of *ilvA* in a *Corynebacterium lactofermentum* threonine producer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 4822-488, 1995.
 9. Cremer J, Eggeling L, Sahm H. Control of the lysine biosynthetic sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analysed by overexpression of the individual corresponding genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1746-1752, 1991.
 10. Crueger W. *Biotechnology: a textbook of industrial microbiology*. Science Tech, Inc., Madison, pp.308, 1984.
 11. Dauner M, Storni T, Sauer U. *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 7308-7317, 2001.
 12. Delaunay S, Lapujape P, Engasser JM, Gorjeen JL. Flexibility of the metabolism of *Corynebacterium glutamicum* 2262, a glutamic acid-producing bacterium, in response to temperature upshocks. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 333-337, 2002.
 13. Demain AL. (2000a). Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 499-514.
 14. Demain AL. (2000b). *Microbial biotechnology*. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 26-31.
 15. Eggeling L, Morbach S, Sahm H. The fruits of molecular physiology: engineering the *L*-isoleucine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 167-182, 1997.
 16. Eikmanns B, Metzger M, Reinscheid D, Kircher M, Sahm H. Amplifications of three biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 617-622, 1991.
 17. Gerigk MR, Bujinicki R, Ganpo-Nkwenkwa E, Bongaerts J, Sprenger G, Takors R. (2002a). Process control for enhanced *L*-phenylalanine production using different recombinant *E. coli* strains. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, p. 746-754.
 18. Gerigk MR, Maab D, Kreutzer A, Sprenger G, Bongaerts J, Wubbolts M, Takors R. (2002b). Enhanced pilot-scale fed-batch *L*-phenylalanine production using recombinant *E. coli* by fully integrated reactive extraction. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 25, p. 43-52.
 19. Gloeckler R, Oshawa I, Speck D, Ledoux C, Bernard S, Zinsius M, Villeval D, Kisou T, Karnogawa K, Lemoine Y. Cloning and characterization of the *Bacillus sphaericus* genes controlling the bioconversion of pimelate into dethiobiotin. **Gene**, v. 87, p. 63-70, 1990.
 20. Gourdon P, Lindley ND. Metabolic analysis of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. **Metabolic Engineering**, v. 1, p. 224-231, 1999.
 21. Grindley JF, Payton MA, van de POL H, ARDÍ KG. Conversion of glucose to 2-keto-*L*-gulonate, an intermediate in *L*-ascorbate synthesis, by a recombinant strain of *Erwinia citreus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1770-1775, 1998.
 22. Guillouet S, Rodal AA, An GH, Lessard PA, Sinskey AJ. Expression of the *Escherichia coli* catabolic threonine dehydratase in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on isoleucine production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3100-3107, 1999.
 23. Hancock RD, Viola R. Biotechnological approaches for *L*-ascorbic acid production. **TRENDS in Biotechnology**, v. 20, n. 7, p. 299-305, 2002.
 24. Hancock RD, Galpin JR, Viola R. Biosynthesis of *L*-ascorbic acid (vitamin C) by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 186, n. 2, p. 245-250, 2000.
 25. Hartmann M, Tauch A, Eggeling L, Bathe B, Möckel B, Pühler A, Kalinowski J. Identification and characterization of the last two unknown genes, *dapC* and *dapF*, in the succinylase branch of the *L*-lysine biosynthesis of *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Biotechnology**, v. 104, p. 199-211, 2003.
 26. Hashiguchi K, Kojima H, Sato K, Sano K. Effects of an *Escherichia coli* *ilvA* mutant gene encoding feedback-resistant threonine deaminase on *L*-isoleucine production by *Brevibacterium flavum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 105-108, 1997.
 27. Hermann T. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 104, p. 155-172, 2003.
 28. Hirao T, Nakano T, Azuma T, Sugimoto M, Nakanishi T. *L*-Lysine production in continuous culture of a *L*-lysine hyperproducing mutant of *Corynebacterium glutamicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 269, 1989.
 29. Hols P, Kleerebezem M, Schanck AN, Ferain T, Hugenholtz J, Delcour J, De Voz WN. Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through genetic engineering. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 588-592, 1999.
 30. Horiuchi JI, Hiraga K. Industrial application of fuzzy control to large-scale recombinant vitamin B_2 production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 3, p. 365-371, 1999.
 31. Hsu ST, Yang ST. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipronici*: effect of pH. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 571-578, 1991.
 32. Humberlin M, Griesser V, Keller T, Schurter W, Haiker M, Hohmann HP, Ritz H, Richter G, Bacher A, Van Loon APM. GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase are rate-limiting enzymes in riboflavin synthesis of an industrial *Bacillus subtilis* strain used for riboflavin production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1-7, 1999.
 33. Ikeda M. Amino acid production processes. *Biotechnological manufacture of lysine*. In: Scheper, T. (Ed.), **Advances in Biochemical Engineering**, v. 79. Springer, Berlin, pp. 1-36, 2003.
 34. Ikeda M, Katsumata R. Hyperproduction of tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* with the modified pentose phosphate pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2497-2502, 1999.
 35. Ikeda M, Nakanishi K, Kino K, Katsumata R. Fermentative production of tryptophan by a stable recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* with a modified serine-biosynthetic pathway. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p. 674-678, 1994.
 36. Izhizaki A, Furuta Y. Cell-recycled fermentation of glutamate

- using a novel cross-flow filtration system with constant air supply. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, p. 316-320, 1993.
37. Kawasaki K, Yokota A, Tomita F. *L-Tryptophan production by a piruvic acid-producing Escherichia coli strain carrying the Enterobacter aerogenes tryptophanase gene*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 6, p. 604-606, 1996.
38. Kelle R, Hermann T, Wenster-Botw D, Eggeling L, Kramer R, Wandrey C. *Glucose-controlled L-isoleucine fed-batch production with recombinant strains of Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Biotechnology**, v. 50, p. 123-136, 1996.
39. Kusel JP, Fa YH, Demain AL. *Betaine stimulation of vitamin B₁₂ biosynthesis in Pseudomonas denitrificans may be mediated by an increase in activity of δ -aminolaevulinic acid synthase*. **Journal of General Microbiology**, v. 130, p. 835-841, 1997.
40. Lee I, Lee K, Namgoong K, Lee Y-S. *The use of ion exclusion chromatography to achieve a more efficient lysine recovery from fermentation broth*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 789-803, 2002.
41. Madej E, Grzeda M. *Properties, effects of insufficient supply and ranges of applicatin of vitamin C in animal therapy*. **Medical Weter**, v. 56, p. 627-631, 2000.
42. Maeland A, Waagbo R. *Examination of the qualitative ability of some cold water marine teleosts to synthesise ascorbic acid*. **Comparative Biochemistry and Physiology A, comparative physiology**, v. 121, p. 249-255, 1998.
43. Masuda M, Takahashi K, Sakurai N, Yanagiya K, Komatsubara S, Tosa T. *Further improvement of D-biotin production by a recombinat strain of Serratia marcescens*. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 6, p. 553-562, 1995.
44. Mateus DM, Alves SS, Fonseca MMR. *Kinetics of L-tryptophan production from indole and L-serine catalyzed by whole cells with tryptophanase activity*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 5, p. 289-293, 2004.
45. McCoy M. *Setting course of prosperity*. **Chemical and Engineering News**, v. 77, p. 29-34, 1999.
46. Miyano K, YE K, Shimizu K. *Improvement of vitamina B₁₂ fermentation by reducing the inhibitory metabolites by cell recycle system and a mixed culture*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 207-214, 2000.
47. Morbach S, Krämer R. *Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria*. **European Journal of Chemical Biology**, v. 3, p. 384-397, 2002.
48. Morbach S, Sahn H, Eggeling L. *Use of feedback-resistant threonine dehydratases of Corynebacterium glutamicum to increase carbon flux towards L-isoleucine*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4315-4320, 1994.
49. Motoyama H, Yano H, Terasaki Y, Anazawa H. *Overproduction of L-lysine from metanol by Methylobacillus glycogens derivatives carrying a plasmid with a mutated dapA gene*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3064-3070, 2001.
50. Nampoothiri MK, Pandey A. *Immobilization of Brevibacterium cells for the production of L-glutamic acid*. **Bioresource Technology**, v. 63, p. 101-106, 1998.
51. Neijssel OM, Teixeira de Mattos MJ. *The energetics of bacterial growth: a reassessment*. **Molecular Microbiology**, v. 14, p. 172-182, 1994.
52. Nelson DL, Cox MM. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Ed. Worth Publishers, New York, pp. 1152, 2000.
53. Nielsen J. *Metabolic engineering techniques for analysis of targets for genetic manipulations*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 125-132, 1998.
54. Okamoto K, Ikeda M. *Development of na industrial stable process for L-threonine fermentation by a L-methionine-auxotrophic mutant of Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, p. 87-89, 2000.
55. Okamoto K, Kino K, Ikeda M. *Hyperproduction of L-threonine by Escherichia coli mutant with impaired L-threonine uptake*. **Bioscience and Biotechnology Biochemistry**, v. 61, p. 1877-1882, 1997.
56. Oshiro T, Kishimoto T, Arase M, Izumi Y. *Characterization of the biotin synthase reaction from Bacillus sphaericus using the photoreduced deazaflavin system*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 446-450, 1998.
57. Oshiro T, Yamamoto M, Bui BTS, Florentin D, Marquet A, Izumi Y. *Stimulatory factors for enzymatic biotin synthesis from dethiobiotin in cell-free extracts of Escherichia coli*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p. 943-944, 1995.
58. Oshiro T, Yamamoto M, Izumi Y, Bui BTS, Florentin D, Marquet A. *Enzymatic conversion of dethiobiotin to biotin in cell-free extracts of a Bacillus sphaericus bioB transformant*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p. 1738-1741, 1994.
59. Osterberg T, Wadsten T. *Physical state of L-histidine after freeze-drying and long-term storage*. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 8, p. 301-308, 1999.
60. Ozbas T, Kutsal T. *Comparative study of riboflavin production from two microorganisms: Eremothecium ashbyi and Ashbya grossypii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, p. 593-596, 1986.
61. Peoples OP, Liebl W, Bodis M, Maeng PJ, Folletie MT, Archer JA, Sinskey A J. *Nucleotide sequence and fine structural analysis of the Corynebacterium glutamicum hom-thrB operon*. **Molecular Microbiology**, v. 2, p. 63-72, 1988.
62. Perkins JB, Sloma A, Hermann T, Theriault K, Zachgo E, Erdenberger T, Hannett N, Chatterjee NP, Williams li V, Rufo Jr GA, Hatch R, Pero J. *Genetic engineering of Bacillus subtilis for the commercial production of riboflavin*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 8-18, 1999.
63. Pramik MJ. *Genentech develops recombinant technique for producing vitamin C*. **Genetic Engineering News**, v. 2, n. 6, p. 9-12, 1986.
64. Pujari V, Chandra TS. *Statiscial optimization of médium components for enhanced riboflavin production by a UV-mutant of Eremothecium ashbyii*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 31-37, 2000.
65. Quesada-Chanto A, Asfchar AS, Wagner F. *Microbial production of propionic acid and vitamin B₁₂ using molasses or sugar*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 378-383, 1994.
66. Richardson DJ. *Bacterial respiration: a flexible process for a*

- changing environment. **Microbiology**, v. 146, p. 551-571, 2000.
67. Sahm H, Eggeling L, Eikmanns B, Krämer R. *Metabolic design in amino acid producing bacterium Corynebacterium glutamicum*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 243-252, 1995.
 68. Saito I, Honda H, Kawabe T, Mukumoto F, Shimizu M, Kobayashi T. *Comparison of biotin production by recombinant *Sphingomonas* sp. Under various agitation conditions*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, p. 129-136, 2000.
 69. Saito Y, Ishii Y, Hayashi H, Imao Y, Yoshikawa K, Noguchi Y, Soeda S, Yoshida M, Niwa M, Hosoda J, Shimomura K. *Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbosone dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-L-gluconate, a precursor of L-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxidans* strain*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p. 454-460, 1997.
 70. Sanyal I, Gibson KJ, Flint DH. *Escherichia coli biotin synthase: an investigation into the factors required for its activity and its sulfur donor*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 326, p. 48-56, 1996.
 71. Sato S. *Produção de aminoácidos*. In: Lima UA, Aquarone E, Borzani W, Schmidell W. **Biociencia Industrial**, v. 3 Processos Fermentativos e Enzimáticos. Ed. Edgard Blücher Ltda., São Paulo, pp.593, 2001.
 72. Sauer U, Bailey JE. *Estimulation of P-to-O ratio in *Bacillus subtilis* and its influence on maximum riboflavin yield*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 750-754, 1999.
 73. Sauer U, Hatzimanikatis V, Bailey JE, Hochuli M, Szyperski T, Wuthrich K. *Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis**. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 448-452, 1997.
 74. Sauer U, Hatzimanikatis V, Hohmann HP, Manneberg M, Van Loon AP, Bailey JE. *Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing *Bacillus subtilis**. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3687-3696, 1996.
 75. Scapin G, Blanchard JS. *Enzymology of bacterial lysine biosynthesis*. **Advances in Enzymology and Related Areas for Molecular Biology**, v. 72, p. 279-324, 1998.
 76. Schmidt G, Stahmann KP, Sahm H. *Inhibition of purified isocitrate lyase identified itaconate and oxalate as potential antimetabolites for the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii**. **Microbiology**, v. 142, p. 411-417, 1996.
 77. Schrupf B, Eggeling L, Sahm H. *Isolation and prominent characteristics of a L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum**. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 566-571, 1992.
 78. Serebriiskii IG, Vassin VM, Tsygankov YD. *Two new members of the BioB superfamily: cloning, sequencing and expression of bioB genes of *Methylobacillus flagellatum* and *Corynebacterium glutamicum**. **Gene**, v. 175, p. 15-22, 1996.
 79. Shaw NM, Lehner B, Fuhrmann M, Kulla HG, Brass JM, Birch OM, Tinschert A, Venetz D, Sanchez JC, Tonella L, Hochstrasser DF. *Biotin production under limiting growth conditions by *Agrobacterium/Rhizobium* HK4 transformed with a modified *Escherichia coli* bio operon*. **Journal of Industrial and Microbial Biotechnology**, v. 22, p. 590-599, 1999.
 80. Shu C, Liao C. Optimization of L-phenylalanine production of *Corynebacterium glutamicum* under product feedback inhibition by elevated oxygen transfer rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p. 131-141, 2002.
 81. Spickett CM, Smirnov N, Pitt AR. *The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an antioxidant*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 183-192, 2000.
 82. Stahmann KP, Revuelta JL, Seulberger H. *Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata* or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production*. **Applied and Microbial Biotechnology**, v. 53, p. 509-516, 2000.
 83. Sybesma W, Burgess C, Starrenburg M, Van Sideren D, Hugenholtz J. *Multivitamin production in *Lactococcus lactis* using metabolic engineering*. **Metabolic Engineering**, v. 6, p. 109-115, 2004.
 84. Voronosky AA, Abbas CA, Fayura LR, Kshanovska BV, Dmytruk KV, Sybirna KA, Sibirny AA. *Development of a transformation system for the flavinogenic yeast *Candida famata**. **FEMS Yeast Research**, v. 2, p. 381-388, 2002.
 85. Wada M, Awano N, Haisa K, Takagi H, Nakamori S. *Purification, characterization and identification of cysteine desulfhydrase of *Corynebacterium glutamicum*, and its relationship to cysteine production*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, p. 103-107, 2002.
 86. Whermann A, Eggeling L, Sahm H. *Analysis of different DNA fragments of *Corynebacterium glutamicum* complementing *dapE* of *Escherichia coli**. **Microbiology**, v. 140, p. 3349-3356, 1994.
 87. White PJ. *The essential role of diaminopimelate dehydrogenase in the biosynthesis of lysine by *Bacillus sphaericus**. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 739-749, 1982.
 88. Wilke D. *Chemicals from biotechnology: molecular plant genetics will challenge the chemical and the fermentation industry*. **Applied and Microbial Biotechnology**, v. 52, p. 135-145, 1999.
 89. Yang Y, Zhang Z, Lu J, Maekawa T. *Continuous methane fermentation and the production of vitamin B₁₂ in a fixed-bed reactor packed with loofah*. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 285-290, 2004.
 90. Yao HM, Tian YC, Tade MO, Ang HM. *Variations and modelling of oxygen demand in amino acid production*. **Chemical Engineering and Processing**, v. 40, p. 401-409, 2001.
 91. Ye K, Shijo M, Jin S, Shimizu K. *Efficient production of vitamin B₁₂ from propionic acid bacteria under periodic variation of dissolved oxygen concentration*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 5, p. 484-491, 1996.
 92. Zamboni N, Mouncey N, Hohmann H-P, Sauer U. *Reducing maintenance metabolism by metabolic engineering of respiration improves riboflavin production by *Bacillus subtilis**. **Metabolic Engineering**, v. 5, p. 49-55, 2003.
 93. Zhang S, Sanyal I, Bulboaca GH, Rich A, Flint DH. *The gene for biotin synthase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and complementation of *Escherichia coli* strains lacking biotin synthase*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 309, p. 29-35, 1994.