



UNICAMP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

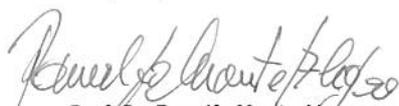
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS - FEA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA POR
Enterococcus faecium EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Rodenei Ogrodowski, aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de abril de 2001.

Campinas, 26 de abril de 2001

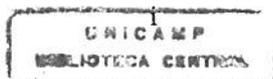

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Presidente da Banda

Autor: RODENEI OGRODOWSKI

Orientador: Prof. Dr. RANULFO MONTE ALEGRE

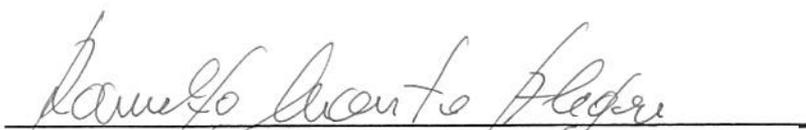
Tese a ser apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas, março 2001



CSM.C.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador


Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana
Membro

Profa. Dra. Iracema de Oliveira Moraes
Membro


Prof. Dr. Romildo Martins Sampaio
Membro

Que Deus nos dê a serenidade de aceitar o que não se pode mudar, coragem de mudar o que pudermos e sabedoria em conhecer a diferença.

Às pessoas que não esqueceram e que também sentiram a mesma ansiedade que agora experimento; e que, na difícil arte de ensinar me induziram à dúvida ao invés da certeza, à crítica ao invés da passividade, e me levaram além da teoria, meu carinho e minha gratidão.

Aos meus pais Henrique e Clara

*Aos meus irmãos Wanderlei, Rosane, Jucimar, Zenir,
e principalmente Rosângela*

Aos meus sogros Raymundo e Leci

*Obrigado por terem acreditado no meu ideal,
na minha utopia, no meu mundo de sonhos.*

*Por terem escutado as minhas constantes angústias,
alegrias e decepções, sempre como se fosse a última vez.*

*Por terem acreditado que chegaria ao final e por
acreditarem que ainda chagarei a ser mais do que sonhei.*

*À Chris, minha esposa companheira de todos os
momentos, pelo amor, carinho, paciência,
confiança e por me dar forças para vencer...*

Agradecimentos

À Deus, pela iluminação e presença constante em minha vida.

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre, pela orientação, amizade, confiança e incentivo durante este trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), que me proporcionou conhecimento e crescimento profissional.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Às amigas Raquel e Helen, pelo companheirismo, amizade e roda de chimarrão ao longo dos anos.

Aos colegas de laboratório, Maurício, David, Jânia, Álvaro, Mauro, Everly, Jean e (Simone, Romildo, Alfredo), obrigado pelo ambiente saudável, festas e churrascos descontraídos e, principalmente a amizade.

Aos amigos, Guiga, Rosiléa, Gláucia, Michelle, Julian, Dani, Junko, Anuar, Salah e Adri, pelos encontros saudáveis, papos descontraídos e a grande amizade.

*Se nós soubéssemos o que o amanhã traria, não
precisaríamos de nossos sonhos, esperanças e
planos. Mas o amanhã é uma pergunta sem
resposta, um novo desafio para enfrentar, uma
nova aventura para ousar.*

*Se Deus nos amou antes que o tempo fosse tempo,
é para que aproveitemos o tempo com urgência de
amar.*

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
NOMENCLATURA	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVO	4
2.1- GERAL	4
2.2- ESPECÍFICOS	4
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1- FERMENTAÇÃO	5
3.1.1- Tipos de fermentação	5
3.1.1.1- Fermentação submersa (SmF)	5
3.1.1.2- Fermentação em meio semi-sólido (SSF).....	6
3.2- LANTIBIÓTICO E BACTERIOCINA	6
3.2.1- Produção de bacteriocina	13
3.2.2- Aplicação e Uso	20
3.2.3- Atividade da enterocina	21
3.3 – CAPACIDADE DE MULTIPLICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	23
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1- MEIOS DE MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS	25
4.1.1- Microrganismo	25
4.1.2- <i>Enterococcus faecium</i> – cultura estoque.....	25
4.1.3- Pré-inóculo.....	26
4.1.4- Microrganismos teste.....	26
4.2- MEIO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE ENTEROCINA.....	26
4.2.1- Inóculo.....	26
4.2.2- Produção de enterocina em fermentação tipo batelada em frascos de Erlenmeyer	27
4.2.2.1- Definição preliminar das condições operacionais.....	27
4.2.2.2- Influência das concentrações de triptona e extrato de levedura.....	28
4.2.2.3- Influência do pH _{inicial} no meio contendo glicose ou sacarose	29
4.2.2.4- Influência da composição do meio basal.....	29

4.2.2.5- Influência da concentração de sacarose.....	30
4.2.3- Produção de enterocina em fermentação tipo batelada em fermentador de bancada	31
4.2.3.1- Influência da aeração	31
4.2.3.2- Influência da aeração e alimentação em fermentação tipo batelada alimentada.....	31
4.2.4- Cultivo do microrganismo teste	32
4.3- MÉTODOS ANALÍTICOS	32
4.3.1- Determinação de massa celular seca (MCS).....	32
4.3.2- Determinação da atividade de enterocina (UE).....	33
4.3.3- Determinação da concentração de glicose e sacarose (S).....	33
4.3.4- Determinação de pH.....	34
4.4- ESTABILIDADE DA ENTEROCINA QUANTO À CONSERVAÇÃO	34
4.4.1- Efeito do congelamento	34
4.4.2- Efeito da temperatura de pré-incubação	34
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1- PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM FERMENTAÇÃO TIPO BATELADA EM FRASCOS DE ERLLENMEYER	36
5.1.1- Definição preliminar das condições operacionais	36
5.1.2- Influência das concentrações de triptona e extrato de levedura	40
5.1.3- Influência do pH _{inicial} no meio contendo glicose ou sacarose.....	43
5.1.4- Influência da composição do meio basal	46
5.1.5- Influência da concentração de sacarose	47
5.2- PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM FERMENTAÇÃO TIPO BATELADA EM FERMENTADOR DE BANCADA	50
5.2.1- Influência da aeração.....	50
5.2.1.1- Fermentação sem aeração.....	50
5.2.1.2- Fermentação com aeração	53
5.2.2- Influência da aeração e alimentação em fermentação tipo batelada alimentada	55
5.3- ESTABILIDADE DE ENTEROCINA QUANTO À CONSERVAÇÃO	58
5.3.1- Efeito do congelamento	58
5.3.2- Efeito da temperatura de pré-incubação	58
6- CONCLUSÕES	62
7- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	63
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Exemplos de bacteriocinas produzidas por microrganismos	11
Tabela 3.2: Atividade da enterocina sobre alguns microrganismos	22
Tabela 3.3: Limites de pH que permitem início de desenvolvimento de vários microrganismos, em meios de culturas laboratoriais ajustados com ácido ou álcali fortes ¹	24
Tabela 4.1: Composição do meio basal de fermentação.....	25
Tabela 4.2: Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo	27
Tabela 4.3: Matriz do planejamento fatorial completo 2 ³	28
Tabela 4.4: Composição do meio basal variando a concentração de triptona e extrato de levedura.....	29
Tabela 4.5: Meio basal em diferentes composições utilizando sacarose.....	30
Tabela 5.1: Matriz com os valores reais e as respostas de atividade de enterocina do planejamento fatorial completo 2 ³ para os microrganismos teste.....	36
Tabela 5.1a: Valores dos efeitos estimados para a resposta de atividade de enterocina, usando o <i>Rhodococcus equi</i> como microrganismo teste	37
Tabela 5.1b: Efeitos estimados para a resposta de atividade de enterocina, usando o <i>Enterococcus faecalis</i> como microrganismo teste	38
Tabela 5.1c: Efeitos estimados para a resposta de atividade de enterocina, usando o <i>Lactobacillus fermentum</i> como microrganismo teste.....	38
Tabela 5.1d: Efeitos estimados para a resposta de atividade de enterocina, usando o <i>Lactobacillus buchneri</i> como microrganismo teste	38
Tabela 5.1e: Representação geral dos efeitos estimados para a resposta de atividade de enterocina sobre os microrganismos teste	39
Tabela 5.2: Valores de pH _{final} , massa celular seca (MCS) e atividade (UE) de produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 com variação da concentração de triptona e extrato de levedura no meio basal.....	41
Tabela 5.3: Valores de pH _{final} , massa celular seca (MCS) e atividade (UE) de produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 em meio basal com glicose ou sacarose como fontes de carbono	43
Tabela 5.4: Valores de pH _{final} , massa celular seca (MCS) e atividade (UE) na produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 no meio basal em diferentes concentrações	46

Tabela 5.5: Valores de pH_{final} , massa celular seca (MCS), concentração final de sacarose (S) e atividade (UE) na produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 com sacarose em diferentes concentrações no meio basal.....	48
Tabela 5.6: Valores de pH, massa celular seca (MCS), concentração de sacarose (S) e atividade (UE) na produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 em fermentação tipo batelada sem aeração em fermentador de bancada	51
Tabela 5.7: Valores de pH, massa celular seca (MCS), concentração de sacarose (S) e atividade (UE) na produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 em fermentação tipo batelada com aeração em fermentador de bancada	53
Tabela 5.8: Valores de pH, massa celular seca (MCS), concentração de sacarose (S) e atividade (UE) na produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 em fermentação tipo batelada alimentada.....	55
Tabela 5.9: Valores de atividade de enterocina (UE) produzida por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 sob congelamento (-20°C)	58
Tabela 5.10: Valores de atividade de enterocina (UE) produzida por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 relacionados às diferentes temperaturas de pré-incubação	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Estrutura dos aminoácidos modificados encontrados nos vários peptídios lantibióticos.....	7
Figura 3.2: Subgrupos propostos de lantibióticos baseados em semelhanças de estruturas primárias.....	8
Figura 3.3: Biomassa (O; X , g.L ⁻¹), concentração de substrato (Δ ; S , g.L ⁻¹) e atividade de bacteriocina (\square ; E1146, MBU.L ⁻¹) durante a fermentação em batelada com glicose por <i>Enterococcus faecium</i> DPC1146.	17
Figura 3.4: Atividade de bacteriocina (MBU.L ⁻¹) durante a fermentação em batelada com glicose por <i>Enterococcus faecium</i> DPC1146 a pH 5,0 (O); 5,5 (Δ); 6,0 (\square) e 6,5 (\bullet).....	17
Figura 3.5: Cinética de crescimento de <i>Enterococcus faecium</i> DPC1146 (O; X , peso de célula seca - g.L ⁻¹), produção de ácido láctico (Δ ; P , g.L ⁻¹), consumo de glicose (\square ; S , g.L ⁻¹) e produção de enterocina 1146 (\bullet , E , MBU.L ⁻¹) em meio contendo 20 g.L ⁻¹ de glicose durante a fermentação em batelada a 37°C e pH 5,5.	19
Figura 3.6: Cinética de enterocina 1146 (E , MBU.L ⁻¹) produção por <i>Enterococcus faecium</i> DPC1146 durante a fermentação em batelada a 37°C e pH 5,5 em meio contendo 5 (O), 10 (Δ), 20 (\square), 25 (\bullet) e 30 (\blacktriangle) g.L ⁻¹ de glicose.	19
Figura 5.1: Representação geral dos efeitos estimados para a resposta de atividade dos microrganismos teste. Microrganismo (\blacksquare), Temperatura (\blacksquare) e pH (\blacksquare).....	39
Figura 5.2: Valores de pH _{final} (\blacksquare), massa celular seca (\blacksquare) e atividade (\blacksquare) na produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 com variação da concentração de triptona e extrato de levedura no meio basal.	42
Figura 5.3a: Valores de pH _{final} (\blacksquare), massa celular seca (\blacksquare) e atividade (\blacksquare) na produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 em meio basal contendo glicose em diferentes pH _{inicial}	44
Figura 5.3b: Valores de pH _{final} (\blacksquare), massa celular seca (\blacksquare) e atividade (\blacksquare) de produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 em meio basal contendo sacarose em diferentes pH _{inicial}	44
Figura 5.3c: Valores da atividade de enterocina produzida por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 em meio basal contendo glicose (\blacksquare) ou sacarose (\blacksquare) como fonte de carbono em função do pH _{inicial} ...	45
Figura 5.4: Valores de pH _{final} (\blacksquare), massa celular seca (\blacksquare) e atividade (\blacksquare) na produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 no meio basal em diferentes concentrações	47
Figura 5.5: Valores de pH _{final} (\blacksquare), massa celular seca (\blacksquare), concentração final de sacarose (\blacksquare) e atividade (\blacksquare) na produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 no meio basal com diferentes concentrações de sacarose	49

Figura 5.6: Valores de pH (◆), massa celular seca (▲), concentração de sacarose (■) e atividade (●) na produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 em fermentação tipo batelada sem aeração em fermentador de bancada	52
Figura 5.7: Valores de pH (◆), massa celular seca (▲), concentração de sacarose (■) e atividade (●) na produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 em fermentação tipo batelada com aeração em fermentador de bancada	54
Figura 5.8: Valores de pH (◆), massa celular seca (▲), concentração de sacarose (■) e atividade (●) na produção de enterocina por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 em fermentação tipo batelada alimentada.....	56
Figura 5.9: Valores de atividade de enterocina (UE) produzida por <i>Enterococcus faecium</i> CCT5079 relacionados às diferentes temperaturas de pré-incubação: 40°C (○), 50°C (□), 60°C (◇), 70°C (Δ), 80°C (●) e 90°C (■).....	60

NOMENCLATURA

A_0 : Absorbância inicial

A : Absorbância final

AU: Unidades de atividade

BU: Unidades de bacteriocina

CFU: Unidades formadoras de colônia

g : Aceleração gravitacional

K : Constante de velocidade de inibição

MBU: 10^6 unidades de bacteriocina

MRS: Man Rogosa Sharp

OD: Densidade ótica

t : Tempo

VVM: Volume de ar por volume de meio por minuto

UE: Unidades de enterocina

RESUMO

Lantibióticos são peptídios com função de antibióticos produzidos por bactérias Gram-positivas com atividade antibacteriana. São frequentemente divididos em dois subgrupos: os lineares prolongados e os peptídios globulares. Estritamente ditos como bacteriocinas, são caracterizados como proteínas ou complexos protéicos, produzidos por bactérias de ácido láctico que inibem microrganismos patogênicos e esporulados. Razão pela qual são utilizados em produtos terapêuticos e farmacêuticos, como preservativos de alimentos industrializados e naturais e desenvolvimento de aroma, como no queijo durante o amadurecimento.

Neste trabalho foi estudada a produção de enterocina por *Enterococcus faecium* em fermentação em batelada submersa, em meio contendo triptona, extrato de levedura, glicose e/ou sacarose e sais minerais, avaliando sua atividade. Inicialmente, foram feitas fermentações em frascos de Erlenmeyer para definir a melhor linhagem e condições de cultivo. Em uma segunda etapa, os experimentos foram conduzidos em fermentador de bancada com intuito de avaliar os efeitos de agitação, aeração e alimentação.

Para a determinação da atividade de enterocina foram usadas culturas dos microrganismos indicadores *Rhodococcus equi*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus buchneri*, cujo crescimento em meio específico foi inibido por adição de meio fermentado contendo enterocina.

Os resultados experimentais definiram como o melhor microrganismo produtor de enterocina o *Enterococcus faecium* CCT5079 e a melhor concentração de sacarose de 20g.L⁻¹ a temperatura de incubação de 37°C e pH_{inicial} 10. Nesta etapa do trabalho, a maior atividade de enterocina foi de 2,65UE. Em fermentador de bancada, o valor máximo de atividade foi de 2,56UE obtido após 11h de fermentação anaeróbia sem alimentação a 200rpm.

ABSTRACT

Lantibiotics are peptides with antibiotic functions and are produced by gram-positive bacteria with antibacterial activity. They are frequently divided in two subgroups: the linear elongated and the globular peptides. Strictly denominated as bacteriocins, are characterized as proteins or protein complexes that are produced by lactic acid bacteria that inhibits pathogenic and spoilage microorganisms. For this reason, they are used in therapeutic and pharmaceutical products and as preservatives in industrialized and natural foods, being also used in the aroma development (i.e., during cheese maturation).

The aim of this work was the study of the enterocin production by *Enterococcus faecium* and its activity evaluation in a batch submerged fermentation using a medium containing: tryptone, yeast extract, glucose/sucrose and mineral salts. Initially, fermentations were carried out in Erlenmeyer's flask for determining the best strain and culture conditions. In a second stage, the experiments were conducted in laboratory scale fermentor for the determination of the effects of agitation, aeration and feeding.

Were used, for the enterocin activity determination, the indicative cultures of *Rhodococcus equi*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus buchneri*, which the growth in a specific medium was inhibited by the addition of a fermented medium containing enterocin.

The experimental results defined that the best microorganism used in the enterocin production was the *Enterococcus faecium* CCT5079 and the best sucrose concentration was 20g.L⁻¹ in incubation temperature of 37°C and initial pH 10. In this stage of the work, the higher enterocin activity was 2.65EU. In the laboratory scale fermentor, the maximum activity value was 2.56UE, obtained after 11h of anaerobic fermentation without feeding at 200rpm.

1- INTRODUÇÃO

Fermentação é, bioquimicamente, uma manifestação fisiológica da célula viva, podendo ser definida como desassimilação (catabolismo de matéria orgânica – carboidratos, gorduras, proteínas) através de reações acopladas, catalisadas por enzimas intra e extracelulares, acarretando formação de substâncias intermediárias dos produtos finais da oxidação biológica total, ou então, derivados dessas substâncias (Reguly, 1996).

No sentido tecnológico, fermentação significa todo processo em que microrganismos de interesse, regulados pela mão do homem, atuam sobre substratos orgânicos, os quais através de suas enzimas produzem determinadas substâncias ou substratos modificados, úteis para o homem. Essas substâncias ou produtos de fermentações vão desde bebidas alcoólicas (cerveja e vinho) e alimentos modificados como laticínios variados (coalhada, iogurte e queijo), a outros produtos industriais, como combustíveis e solventes (etanol e acetona), ácidos orgânicos (ácido acético, ácido lático e ácido cítrico), ésteres, aminoácidos, polissacarídios, enzimas, vitaminas, hormônios e antibióticos. Processos fermentativos são, portanto, processos de transformação de material biológico ou de meio sintético que o substitua por agentes também biológicos, originando os produtos mencionados (Reguly, 1996).

Verifica-se, por conseguinte, que fermentações não são apenas restritas à obtenção de produtos químicos, através de “biossíntese”, em contrapartida à “quimiossíntese”. No Oriente, os processos fermentativos de matérias-primas protéicas e carboidratadas (soja, arroz e pescado) são usados há milênios, constituindo ótima base alimentar. Por outro lado, a indústria farmacêutica produz hoje, em escala mundial e sempre crescente, antibióticos, vitaminas,

aminoácidos, substâncias carotenóides (provitaminas) e esteróis modificados (hormônios). Os últimos vinte anos presenciaram a produção cada vez maior de enzimas para os mais diversos fins, através de processos fermentativos, seja em substratos líquidos, seja em semi-sólidos, sendo as enzimas intra ou extracelulares isoladas ou extraídas, através dos mesmos processos que são usados para isolamento e extração de proteínas. (Reguly, 1996)

Lantibióticos são grupos de peptídios com função de antibiótico, que são produzidos por bactérias Gram-positivas agindo sobre outras. O termo lantibióticos foi introduzido como uma abreviação da lantionina contendo peptídios antibióticos e refere-se às características mais proeminentes deste grupo, que são a forte atividade antimicrobiana e os anéis intramoleculares. A presença destes resíduos influencia a estrutura e atividade dos peptídios em suas rotas biossintéticas, que têm recentemente atraído tanto interesse em campos de diferentes pesquisas básicas em lantibióticos (Sahl *et al*, 1995; Reis *et al*, 1994).

A família dos lantibióticos inclui peptídios antibacterianos produzidos por variedade de espécies Gram-positivas. Estes são frequentemente divididos em dois subgrupos: os lineares prolongados (lantibióticos do tipo A) e os peptídios globulares (lantibióticos do tipo B), os quais inibem reações enzimáticas e são sintetizados por espécies de *Streptomyces* (Brötz *et al*, 1998; Gutowski-Eckel *et al*, 1994; Klein *et al*, 1992).

Várias cepas de bactérias de ácido láctico produzem proteínas ou complexos protéicos (bacteriocinas), que inibem faixa limitada de microrganismos patogênicos e esporulados, e por essa razão são potencialmente úteis como preservativos de alimentos naturais. Para esse fim, eles podem ser produzidos “*in situ*” por bactéria iniciadora ou em fermentado e adicionado ao alimento. A produção de bacteriocina em cultivos contínuo ou em batelada tem sido estudada por vários autores (Parente *et al*, 1997; Sahl *et al*, 1995; Parente e Ricciardi, 1994; Gutowski-Eckel *et al*, 1994; Schillinger *et al.*, 1993; Klein *et al*, 1992; Barnby-Smith, 1992).

Dentre as bacteriocinas, cita-se a enterocina 1146 que é produzida por *Enterococcus faecium* DPC1146, a qual mostra alta especificidade contra vários microrganismos, entre eles a *Listeria monocytogenes*, podendo ser útil para o controle destes organismos em alimentos fermentados (Parente e Ricciardi, 1994).

2- OBJETIVO

2.1- GERAL

Estudar a produção de bacteriocina (enterocina) por *Enterococcus faecium* em fermentação submersa em batelada, otimizando condições operacionais.

2.2- ESPECÍFICOS

- definição do melhor microrganismo produtor de enterocina e as melhores condições como: temperatura de incubação, composição do meio de fermentação, concentração de substrato (glicose e/ou sacarose) e pH inicial;

- avaliação dos efeitos de agitação, aeração e temperatura com alimentação em batelada alimentada e convencional na produção de enterocina.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- FERMENTAÇÃO

Reguly cita que, segundo Underkoffler e Hickey (1954) os processos fermentativos podem substituir processos, puramente químicos, de síntese orgânica. Os que são utilizados em escala industrial dependem, em geral, de: capacidade do microrganismo responsável em proporcionar bom rendimento do produto, em bases econômicas, a partir de um substrato de baixo custo e disponível; facilidade de recuperação ou obtenção do produto desejado, sob forma pura ou, conforme o caso, pronta para o uso; impossibilidade ou dificuldade de obter o produto através de outros processos.

A fermentação é utilizada há muito tempo na tecnologia de alimentos e é entendida no sentido lato, não apenas como foi inicialmente proposto por Pasteur na obtenção de álcool, como sinônimo de borbulhamento, mas como um processo no qual mudanças bioquímicas ocorrem num substrato orgânico, através da ação de catalizadores (enzimas) obtidas de microrganismos *in vivo* ou *in vitro* (Atkinson, 1984).

3.1.1- Tipos de fermentação

3.1.1.1- Fermentação submersa (SmF)

SmF é aquela fermentação onde o substrato fica dissolvido ou suspenso em pequenas partículas no líquido, normalmente água. Apresenta como principais vantagens, o fácil acompanhamento e controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação

e esterilidade. Como principais desvantagens tem-se o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação do produto/substrato (Fogarty e Ward, 1974).

Segundo Fogarty e Ward (1974), na SmF a determinação de um meio de cultivo balanceado é crítica para a produção de elevadas quantidades de proteínas. Desta forma, o meio líquido é preparado com grande número de componentes como misturas de carboidratos, materiais nitrogenados e minerais, que pode ser adequado para a produção de diversas proteínas.

3.1.1.2- Fermentação em meio semi-sólido (SSF)

A SSF pode ser definida como aquela fermentação onde o substrato é um material úmido, não suspenso em água e sem escoamento aquoso, empregando um ou mais microrganismos (Gutierrez-Rojas e Favela Torres, 1992).

Segundo Oriol (1988), na SSF o microrganismo é inoculado em um substrato aparentemente sólido (úmido), ou seja, na ausência de água livre e a atividade microbiana se dá em toda a massa úmida. Os níveis ideais de umidade dos substratos, geralmente, vão desde 12% até 80%. Os níveis acima de 80% podem ser melhores para o processo, mas isso dependerá da capacidade de retenção de água do material utilizado como substrato.

3.2- LANTIBIÓTICO E BACTERIOCINA

Os anéis intra-moleculares, relacionados aos lantibióticos (lantionina contendo peptídios antibióticos), são formados pelos aminoácidos tioeter lantionina (Lan) e 3-metil-lantionina (MeLan). Além disso, para estes resíduos incomuns, os aminoácidos desidratados 2,3-dideidroalanina (Dha) e 2,3-dideidrobutirina (Dhb) ocorrem comumente em

lantibióticos, considerando que mais tarde resíduos modificados, tal como lisinoalanina, *S*-aminovinil-D-cisteína, *S*-aminovinil-D-metilcisteína e ácido *eritro*-3-hidroxiaspártico são somente encontrados em peptídios (Figura-3.1). Estes aminoácidos incomuns são sintetizados por transferência de posto ribossomicamente, produzindo peptídios precursores (Sahl *et al*, 1995).

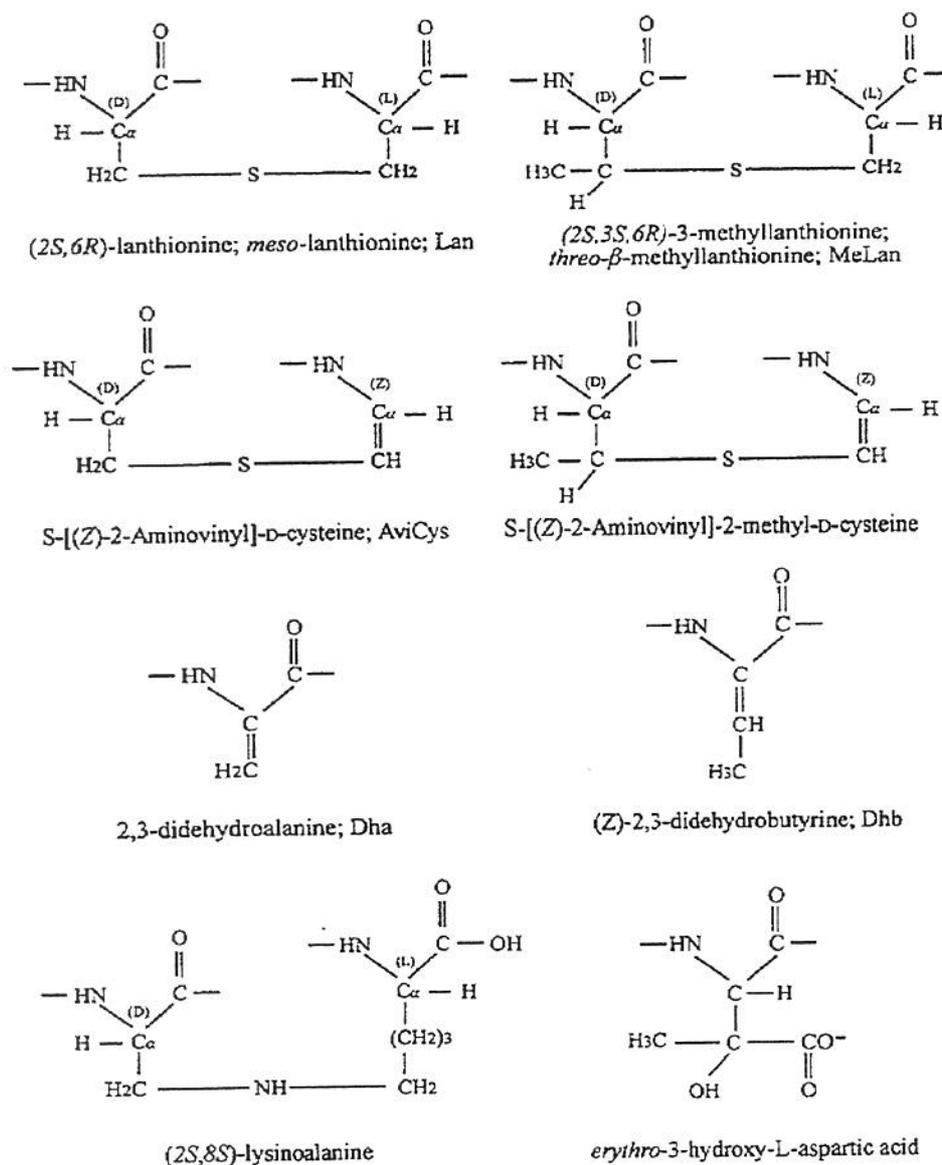


Figura 3.1: Estrutura dos aminoácidos modificados encontrados nos vários peptídios lantibióticos. Fonte: Sahl *et al.*, 1995.

Os lantibióticos são divididos em dois subgrupos: os lineares prolongados, tais como nisina, subtilina, epidermina, galidermina e Pep5, e os peptídios globulares, como cinamicina, duramicina, mersacidina e ancovinina, mostrados na Figura 3.2 (Brötz *et al*, 1998; Sahl *et al*, 1995; Gutowski-Eckel *et al*, 1994; Klein *et al*, 1992).

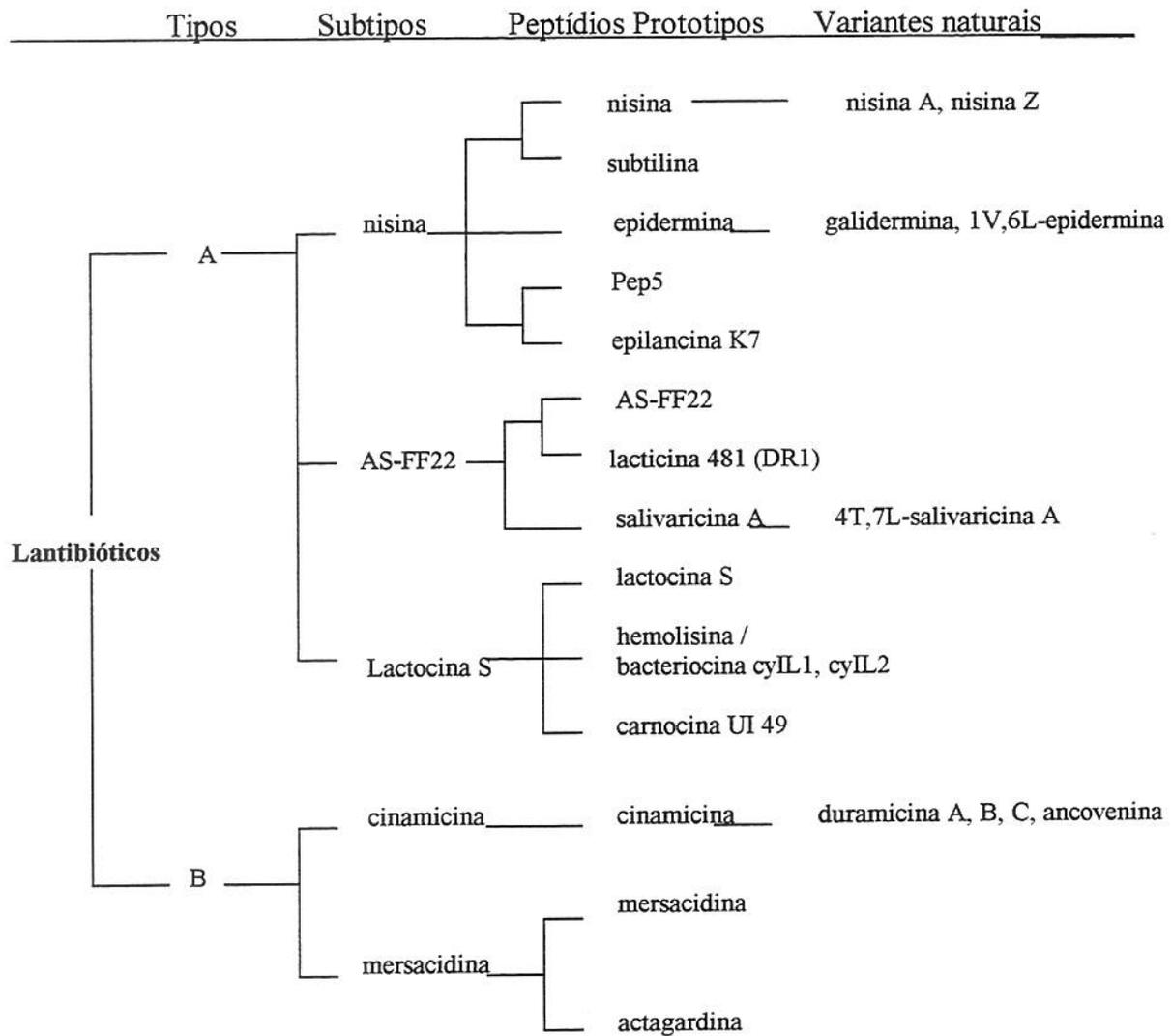


Figura 3.2: Subgrupos propostos de lantibióticos baseados em semelhanças de estruturas primárias. Fonte: Sahl *et al.*, 1995.

Lantibióticos tipo A:

Nisina: produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, provavelmente foi o primeiro lantibiótico com atividade antibiótica contra streptococos a ser detectado e, subseqüentemente, tem sido foco de interesse científico considerável. A estrutura da nisina tem 34 aminoácidos, massa molecular de 3353 Daltons (Da) e é um peptídio pentacíclico contendo um resíduo Lan, quatro MeLan, um Dha e dois Dhb, possuindo maior solubilidade, especialmente a valor de pH neutro. Pode ser mais eficaz em uso como um biopreservativo em alimentos (Sahl *et al.*, 1995; Schillinger *et al.*, 1993).

Subtilina: produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 6633, cuja estrutura é similar à da nisina, contendo as mesmas modificações de aminoácidos nas mesmas posições. Apresenta duas atividades antibacterianas distintas: uma direta, contra células vegetativas e outra para prevenir o crescimento externo de endoesporos (Sahl *et al.*, 1995).

Epidermina e Galidermina: produzidas por *Stafilococcus epidermidis* e *Stafilococcus galinarum*, respectivamente. Estas possuem estrutura análoga e são as menores dos lantibióticos tipo-A, com 22 aminoácidos e massa molecular de 2164 Da e são tetracíclicas, nas quais três dos anéis resultam de um resíduo MeLan e dois Lan (Sahl *et al.*, 1995).

Pep5: também produzido por cepas de *Stafilococcus epidermidis*, sendo o maior dos lantibióticos tipo-A, com massa molecular de 3488 Da e também o mais básico, possuindo oito aminoácidos positivamente carregados. Este é tricíclico, contendo um resíduo MeLan, dois Lan e dois de Dhb. (Sahl *et al.*, 1995)

Epilancina K7: produzida por *Stafilococcus epidermidis*, sendo um pouco menor que o Pep5. Este como o Pep5, contém três anéis tioeter formados por um resíduo Lan e dois MeLan, contendo também dois de Dha e dois de Dhb (Sahl *et al.*, 1995).

Lantibióticos tipo B:

Incluídos entre estes estão a cinamicina, duramicina, duramicina B, duramicina C e ancovenina. A multiplicidade de nomes resulta de isolamentos de mesmos lantibióticos de diferentes fontes. Estes são produzidos por uma variedade de cepas de *Streptomyces* e *Streptoverticillium* e quanto mais exibem atividades antimicrobianas limitadas, especialmente contra *Bacillus* sp., maior é o interesse, pois atuam como inibidores de inúmeras enzimas importantes. Cada um destes lantibióticos contém um resíduo Lan e dois MeLan em posições idênticas (Sahl *et al.*, 1995).

Mersacidina e actagardina são dois lantibióticos do tipo-B que diferem significativamente daqueles previamente descritos em sua estrutura e atividade biológica. Mersacidina é o menor lantibiótico com massa molecular de 1825 Da; é hidrofóbica, não tem carga líquida e é produzida por uma espécie de *Bacillus* (HIL Y-85,54728). A actagardina é produzida por *Actinoplanes* ATCC 31048 e ATCC 31049, que contém quatro anéis formados de um resíduo Lan e três MeLan (Sahl *et al.*, 1995).

Lantibióticos são estritamente ditos como bacteriocinas, que são caracterizadas como proteínas ou complexos protéicos, tal como as antibacterianas altamente específicas representadas pelas colicinas, ou ainda, podem ser considerados como um subgrupo das bacteriocinas (Sahl *et al.*, 1995; Reis *et al.*, 1994).

As bacteriocinas são bem conhecidas há décadas e há publicações que descrevem novas bacteriocinas, vários exemplos são mostrados na Tabela 3.1. A nisina, uma das bacteriocinas descritas, é a única comercialmente explorada, devido a sua atividade relativamente maior no que diz respeito ao espectro antimicrobiano, à estabilidade dos genes que codifica a sua produção e sua estabilidade quando purificada (Barnby-Smith, 1992).

Tabela 3.1: Exemplos de bacteriocinas produzidas por microrganismos

Microrganismo	Bacteriocina	Espectro inibidor	Autor (Ano)
<i>Bacillus subtilis</i>	Subtilina (lantibiótico)	Bactérias gram-positivas	Klein <i>et al.</i> , 1992
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisina (lantibiótico)	Muitas bactérias gram-positivas	Mattick e Hirsch, 1944
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CNRZ	Lacticina 481	Bactérias ácido lácticas; clostrídios	Piard <i>et al.</i> , 1992
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB61	Pediocina A	Bactérias ácido lácticas; clostrídios; listerias; estafilococos	Daeschel e Klaenhammer, 1985
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocina PA1	Algumas bactérias ácido lácticas; listerias	Gonzalez e Kunka, 1987
<i>Lactobacillus sake</i>	Sakacina A	Algumas bactérias ácido lácticas; listerias	Schillinger e Lucke, 1989
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> UL5	Mesenterocina 5	Algumas bactérias ácido lácticas; listerias	Daba <i>et al.</i> , 1991

Fonte: Barnby-Smith, 1992.

As bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos por dois métodos: como composto puro, ou no caso de produtos fermentados, pelo uso de bactérias ácido lácticas que secretam as bacteriocinas. Produtos tradicionais fermentados que contém bacteriocinas são consumidos há séculos, como por exemplo, cepas de *Pediococcus acidilactici* que produzem a bacteriocina, pediocina AcH, isolada de salsichas fermentadas, considerada segura e garantida pelo GRAS (Generally Regarded as Safe) (Barnby-Smith, 1992).

O isolamento e a purificação das bacteriocinas permite que sejam adicionadas a uma grande variedade de alimentos, mas muitas delas são difíceis de serem purificadas e são

instáveis na forma pura. Em consequência, pouco se conhece sobre muitas bacteriocinas, exceto a nisina. Conhecimentos sobre as características e modo de ação das principais bacteriocinas com potencial para o uso em alimentos são descritas a seguir (Barnby-Smith, 1992).

Colicinas: secretadas pela *Escherichia coli*; foram as primeiras bacteriocinas a serem descobertas e extensamente conhecidas, estando disponíveis pela sua expressão e controle genético;

Lantibióticos: são secretados por uma grande variedade de microrganismos, os quais secretam vários lantibióticos similares: como por exemplo, nisina, subtilina, epidermina e galidermina, que apresentam semelhanças estruturais;

Pediocinas: comercialmente, os pediococos são importantes na fermentação de carnes e vegetais. As bacteriocinas de *Pediococcus* spp. são de interesse porque elas inibem uma faixa maior de patogênicos que muitas outras bacteriocinas; o espectro inibidor inclui a *Listeria monocytogenes* e os organismos gram-negativos *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas fluorescens*.

A pediocina PA1, secretada pela cepa *Pediococcus acidilactici* PAC1, inibe o crescimento de outro pediococos, vários lactobacilos e *Listeria monocytogenes*. Este último tem seu crescimento inibido em faixa de pH de 5,5 - 7,0 e a 4 e 32°C. Pediocina AcH, de *Pediococcus acidilactici*, é usada também para inibir crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*. Pediocina A, secretada por *Pediococcus pentosaceus*, é potencialmente usada como preservativo de alimentos, devido a sua atividade de espectro relativamente largo, a qual inclui *Clostridium* ssp. e *Staphylococcus aureus*.

3.2.1- Produção de bacteriocina

Os fatores que afetam a produção de bacteriocinas em meio líquido com ou sem controle de pH foram estudados por vários autores. Meios complexos são usualmente necessários para a produção máxima de bacteriocinas e o pH ótimo para a produção da mesma raramente coincide com o pH ótimo para o crescimento e produção de ácido láctico (Parente e Ricciardi, 1994).

Parente e Hill (1992-a) relatam que estudos, no qual meios diferentes ou o efeito dos ingredientes do meio comparados, para produção de bacteriocina são raros. Citam que Geis *et al.*, em 1983 compararam a produção de bacteriocina através de 16 cepas de lactococos em diferentes meios, concluindo que meios complexos são essenciais para produção de bacteriocina. Já Biswas *et al.*, em 1991 (citado por Parente e Hill, 1992-a) analisaram o efeito dos ingredientes de um meio complexo na produção de pediocina AcH, dizendo que a glicose foi considerada a melhor fonte de carbono, a presença de Tween 80 e Mn^{2+} conduziram à máxima biomassa e produção de bacteriocina, as quais foram estabilizadas pela presença do Mg^{2+} . Em alguns casos, Tween 80 tem sido considerado interferente com subsequente formação de precipitado de sulfato de amônio das bacteriocinas.

Estes autores analisaram e compararam fatores que afetam a produção de duas bacteriocinas de bactéria ácido láctica. Para isso, utilizaram culturas de *Enterococcus faecium* DPC1146 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* DPC3286 que cresceram em meio M17, contendo 0,5% de glicose a 37°C e 30°C por 16h, respectivamente, e mantidas congeladas em glicerol 25%. Como microrganismos teste para a atividade antibacteriana foram utilizados a *Listeria innocua* DPC1770 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1614, que se desenvolvem em produtos derivados de leite. Foram produzidas a enterocina 1146 e a

lactocina D a 37°C e 30°C, respectivamente por 16h, utilizando meio complexo contendo (g.L⁻¹): glicose (10,0), extrato de levedura (0,0 – 10,0), triptona (2,5 – 12,5), sódio β-glicerofosfato (19,0), MgSO₄.7H₂O (0,25), MnSO₄.4H₂O (0,05) e Tween 80 (0,0 – 4,0), variando o pH entre 6,0 e 7,0, ajustados imediatamente antes da esterilização a 121°C por 15 min. Os resultados obtidos foram de 0,442 O.D. e atividade de 1408 BU.mL⁻¹ para a enterocina 1146, quando se usou 10,0 g.L⁻¹ de triptona, 2,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 1,0 g.L⁻¹ de Tween 80 e pH 6,75. A produção máxima de lactocina D foi de 0,321 O.D., conseguida com 7,5 g.L⁻¹ de triptona, 5,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 0,0 g.L⁻¹ de Tween 80 e pH 6,50, enquanto a máxima atividade (3392 BU.mL⁻¹), foi obtida com 5,0 g.L⁻¹ de triptona, 7,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 1,0 g.L⁻¹ de Tween 80 e pH 6,75. Os autores salientaram que o pH final da enterocina diminuiu, ficando entre 4,1 e 4,6, enquanto que no caso da lactocina, o mesmo não alcançou valores menores que 5,4. A O.D. a 600nm foi usada como medida indireta de biomassa, e a atividade em BU.mL⁻¹ foi empregada como a quantidade de bacteriocina necessária para obter 50% de inibição do microrganismo teste comparado com o padrão (sem a bacteriocina) (Parente e Hill, 1992-a).

Franz *et al.* (1996) estudaram a produção e caracterização da enterocina 900, uma bacteriocina produzida por *Enterococcus faecium* BFE 900 isolada de azeitonas pretas e, também, analisaram a influência do pH na produção deste lantibiótico. O pH inicial de amostras de caldo MRS foi ajustado para pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0 e inoculados com 1% de culturas produtoras de bacteriocina, que foram deixadas crescer durante à noite a 30°C. As pré-fermentações foram usadas (1%) para inocular meios MRS de diferentes composições, com pH inicial 6,5, cultivados aerobicamente a 30°C por 24h, utilizando como microrganismo teste para atividade antibacteriana o *Lactobacillus sake* DSM

20017. Os melhores resultados foram obtidos em meios de cultura com pH entre 6,0 e 10,0 e valores de produção variando entre 8,81 e 9,28 log CFU.mL⁻¹, onde a atividade de bacteriocina alcançou 6400 AU.mL⁻¹. A unidade de atividade arbitrária (AU) foi definida como a diluição mais alta, que produzia uma zona clara de inibição em placa de Petri inoculada com o microrganismo teste com adição da bacteriocina. Sendo multiplicado por um fator de 100 para obter a unidade AU.mL⁻¹ da amostra original.

Parente *et al.* (1997) relataram que, usualmente, a produção de bacteriocina mostra cinética metabólica primária, iniciando logo que o crescimento da célula começa, cessando no/ou imediatamente antes do fim do crescimento da mesma. A diminuição na atividade da bacteriocina pode ser resultado de degradação da mesma por proteases específicas ou não específicas, ou adsorção na célula produtora. Alguns fatores que aceleram o crescimento da célula aumentam a produção de bacteriocina. Sendo que a maior produção de bacteriocina é obtida em meio rico e quando o pH é controlado. Este tem uma forte influência não somente na produção de bacteriocina, mas também na adsorção/degradação. Os autores observaram também que, embora a produção de bacteriocina estivesse associada ao crescimento celular, não houve relação entre a sua taxa de crescimento e a de produção. Na produção de bavaricina MN por *Lactobacillus bavaricus* MN em fermentações contínua e batelada, o pH tem papel mais importante que a taxa de crescimento celular. Em fermentação contínua a produção de nisina é regular, pois parte permanece aderida às células, enquanto que em batelada a sua produção é afetada pela fonte de carbono.

Parente e Ricciardi (1994) e Parente *et al.* (1997) utilizaram o *Enterococcus faecium* DPC1146 como produtor da enterocina 1146 (E1146) e *Listeria innocua* BL86/26 como indicador para o ensaio de E1146. As culturas de *E. faecium* DPC 1146 cresceram em caldo M17 com 0,5% de glicose (GM17) a 37°C e a *Listeria innocua* BL86/26 em caldo triptona de

soja com 0,6% de extrato de levedura a 30°C (TSBYE) e foram armazenadas a 4°C. Para ensaios biológicos e químicos, o caldo de cultura foi centrifugado, a biomassa foi lavada com água destilada e seca a 105°C por 24h para quantificar o peso celular seco. O sobrenadante foi filtrado em membranas de HV Millipore para esterilizar, sendo estocados a -20°C. A atividade de bacteriocina em MBU.L⁻¹ (10⁶ unidades de bacteriocina por litro) foi medida por ensaios fotométricos, enquanto o substrato residual foi quantificado usando o método do ácido dinitrosalicílico.

Parente e Ricciardi (1994) analisaram a influência do pH na produção de enterocina 1146 em fermentação tipo batelada, utilizando reator agitado com turbinas Rushton. O meio empregado continha a seguinte composição (g.L⁻¹): glicose (10,0); triptona (7,5); caseína hidrolisada (5,0); extrato de levedura (2,5); KH₂PO₄ (5,0); Tween 80 (2,0); MgSO₄.7H₂O (0,25); MnSO₄.4H₂O (0,05); velocidade de agitação controlada em 300rpm e pH_{inicial} 5,0, que durante às diferentes fermentações foi controlado em 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5, sendo o meio esterilizado a 121°C por 15 min. O inóculo cresceu em meio com KH₂PO₄ substituído por sódio β-glicerofosfato (19g.L⁻¹) e pH ajustado para 6,8 antes da esterilização. O meio do fermentador foi inoculado com 5% (v/v) de cultura de *Enterococcus faecium* DPC1146 do inóculo e incubado a 37°C por 16h.

Estes autores observaram que, para o *Enterococcus faecium* DPC1146 durante a fermentação em batelada a pH 5,5, a produção de enterocina 1146 (E1146) iniciou quando começou o crescimento e cessou ao final do mesmo (Figura-3.3). A atividade máxima de bacteriocina (1,96 MBU.L⁻¹) foi obtida após 7h, ao final do crescimento celular, onde a atividade da mesma começa a decrescer. Resultados similares foram obtidos a pH 6,0 e 6,5, enquanto que a produção de bacteriocina foi muito menor a pH 5,0, como mostrado na Figura

3.4. Picos similares na atividade foram observados para outras bacteriocinas. Dois mecanismos podem ser responsáveis pela redução da atividade das bacteriocinas, que são a adsorção nas células e a sua degradação proteolítica. As técnicas de Yang *et al.* (1992) utilizadas por Parente e Ricciardi em 1994, mostraram que a E1146 é fortemente adsorvida em células vivas ou mortas a pH 4,5. Após a adsorção, quantidades significantes de bacteriocinas (60 – 80%) podem ser liberadas das células mortas pelo calor usando NaCl a pH 2,0, enquanto que somente 2 – 5% da atividade adsorvida pode ser liberada de células vivas (Parente e Ricciardi, 1994).

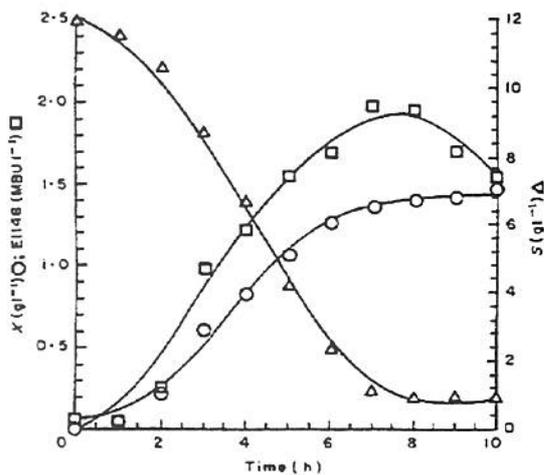


Figura 3.3: Biomassa (O; X , g.L^{-1}), concentração de substrato (Δ ; S , g.L^{-1}) e atividade de bacteriocina (\square ; E1146, MBU.L^{-1}) durante a fermentação em batelada com glicose por *Enterococcus faecium* DPC1146.

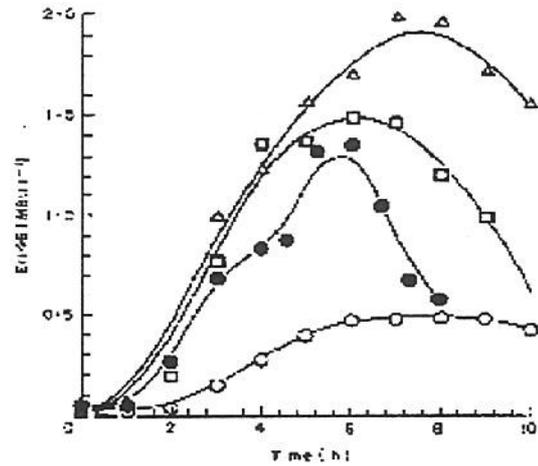


Figura 3.4: Atividade de bacteriocina (MBU.L^{-1}) durante a fermentação em batelada com glicose por *Enterococcus faecium* DPC1146 a pH 5,0 (O); 5,5 (Δ); 6,0 (\square) e 6,5 (\bullet).

Parente *et al.* (1997) analisaram o crescimento e produção de bacteriocina por *Enterococcus faecium* DPC1146 em fermentação batelada e contínua, utilizando reator agitado com turbinas Rushton e meio basal para sua produção com a seguinte composição (g.L^{-1}):

peptona de soja neutralizada (6,0); extrato de levedura (5,0); KH_2PO_4 (1,0); Tween 80 (2,0); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,25); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,05); pH 4,5 e cinco diferentes concentrações de glicose (5, 10, 20, 25 e 30 g.L^{-1}). O meio foi esterilizado a 121°C por 15 min. e o seu pH ajustado a 5,5 com NaOH, imediatamente antes da inoculação. Para o crescimento do inóculo foi usado glicose (10 g.L^{-1}) e sódio β - glicerofosfato (19 g.L^{-1}) que substituiu o KH_2PO_4 , o pH foi ajustado para 6,8 com HCl, antes da esterilização. O meio do fermentador foi inoculado com 6% (v/v) de cultura de *Enterococcus faecium* DPC1146 do inóculo e incubado a 37°C a 200rpm. Nas fermentações tipo batelada foram avaliados os efeitos de concentração inicial de glicose nas cinéticas de crescimento e produção de enterocina 1146 (E1146). A produção de enterocina mostrou-se associada ao crescimento celular, aumentando lentamente após 5h, atingindo a máxima produção (2,8 MBU.L^{-1}) e consequentemente a máxima atividade, no fim do crescimento celular. A máxima concentração de biomassa (2,4 g.L^{-1}) e de enterocina foram obtidas com concentração inicial de glicose de 20 g.L^{-1} (Figura 3.5). Em uma maior concentração inicial de glicose, o crescimento foi mais lento e a concentração de biomassa no fim da fermentação foi menor (1,9 e 1,7 g.L^{-1} à concentração de 25 e 30 g.L^{-1} , respectivamente). Na Figura 3.6 é apresentada uma comparação da produção de enterocina com meios contendo glicose a concentrações variando entre 5 e 30 g.L^{-1} .

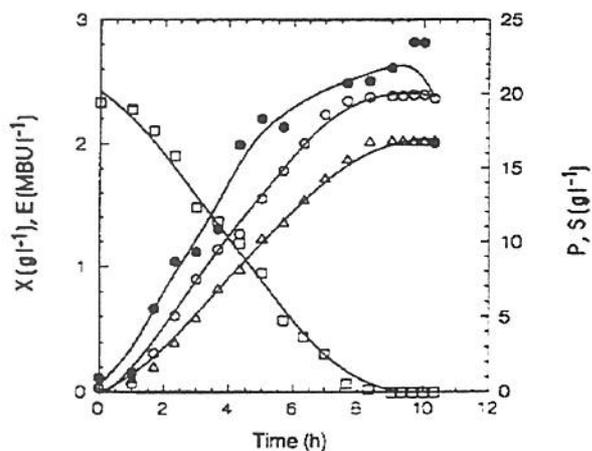


Figura 3.5: Cinética de crescimento de *Enterococcus faecium* DPC1146 (O; X, peso de célula seca - g.L⁻¹), produção de ácido láctico (Δ; P, g.L⁻¹), consumo de glicose (□; S, g.L⁻¹) e produção de enterocina 1146 (●, E, MBU.L⁻¹) em meio contendo 20 g.L⁻¹ de glicose durante a fermentação em batelada a 37°C e pH 5,5.

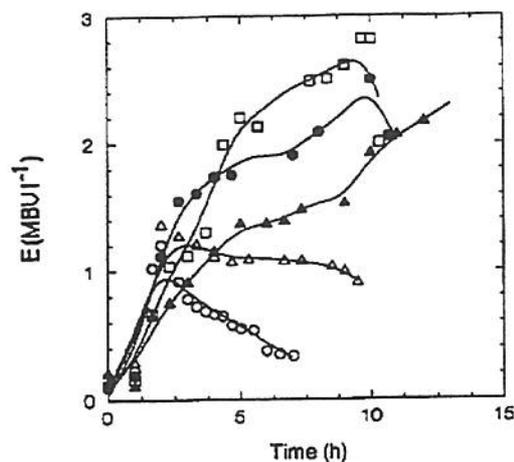


Figura 3.6: Cinética de enterocina 1146 (E, MBU.L⁻¹) produção por *Enterococcus faecium* DPC1146 durante a fermentação em batelada a 37°C e pH 5,5 em meio contendo 5 (O), 10 (Δ), 20 (□), 25 (●) e 30 (▲) g.L⁻¹ de glicose.

Estes autores relataram que, a inibição não competitiva de crescimento celular por ácido láctico tem sido citada por vários pesquisadores e concomitantemente a cinética de inibição por produto e substrato para o *Lactobacillus delbrueckii*. No entanto, o *Enterococcus faecium* DPC1146 pareceu ser extremamente sensível à inibição por ácido láctico e possivelmente pelo substrato. Nas fermentações em batelada com glicose (5 - 25 g.L⁻¹), a atividade de bacteriocina alcançou um pico antes do final do crescimento e então diminuiu. Para altas concentrações de glicose (30 g.L⁻¹) a produção foi menor e não foi observada uma diminuição na atividade, mas isto pode ser devido ao tempo relativamente pequeno usado para incubação, a qual foi cessada ao final do crescimento exponencial. As taxas de produção da enterocina média e máxima diminuem com o aumento da concentração inicial de glicose. Há falta de proporcionalidade entre atividade máxima de enterocina e a concentração inicial de glicose, em relação às fermentações prolongadas (Parente *et al.*, 1997).

Cintas *et al.* (1995) trabalharam com isolamento e caracterização de pediocina L50, uma bacteriocina de *Pediococcus acidilactici*, com extenso espectro inibidor. As bactérias ácido lácticas são amplamente usadas como culturas iniciadoras de fermentações de laticínios, carnes e vegetais, pois estas também têm potencial de inibir o crescimento de bactérias patogênicas e esporuladas, melhorando, desse modo, a qualidade higiênica e prolongando a vida de prateleira de diferentes carnes e produtos derivados da mesma. Embora a redução de pH e remoção de carboidratos sejam os efeitos primários exercidos por essas bactérias, elas também produzem outras substâncias, tais como peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil e bacteriocinas que são antagônicas a outros microrganismos. Foram usados como indicadores o *P. acidilactici* 347, *Lactobacillus sake* 148 e *Listeria monocytogenes*. Os autores relataram também, que algumas características conferem à pediocina L50 vantagens como preservativo alimentar, pois inibem o crescimento bacteriano de todas as bactérias esporuladas gram-positivo testadas, bem como patogênicas tal como *Listeria monocytogenes*, sendo que a bacteriocina parece ser estável sob ampla variedade de condições. A inclusão dessa cepa pode proteger alimentos refrigerados do crescimento de esporulados psicrotróficos e bactérias patogênicas naturais de alimentos, tal como a *Listeria monocytogenes*.

3.2.2- Aplicação e Uso

Entre os vários usos e aplicações dos lantibióticos, cita-se a capacidade de inibir a replicação de *Herpes simplex* vírus-1, como por exemplo, a cinamicina. Como resultado dessa atividade biológica, eles podem ter usos terapêuticos, incluindo o controle de pressão sanguínea alta e/ou de inflamação. Podem ser utilizados em produtos farmacêuticos, em tratamento de acnes e também evitar o câncer por ação de nitrito. A sensibilidade de bactérias

à ação de cada lantibiótico é bastante variada, sendo que enterocinas possuem alta atividade antimicrobiana, atuando sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas, entre elas a *Listeria*, além de células vegetativas e esporos de variedades de cepas de *Bacillus* e *Clostridium*. Os lantibióticos também são bastante eficazes para uso em alimentos fermentados e como biopreservativos em alimentos industrializados e naturais, aumentando a vida de prateleira dos mesmos, além de uma importante função no desenvolvimento do aroma, como por exemplo, no queijo durante o amadurecimento. O uso de lantibióticos como biopreservativos tem aumentado consideravelmente, porque além de servirem como preservativos de alimentos, eles também são capazes de substituir agentes químicos (Parente *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1997; Sahl *et al.*, 1995; Giraffa *et al.*, 1995; Parente e Ricciardi, 1994; Gutowski-Eckel *et al.*, 1994; Tarelli *et al.*, 1994; Schillinger *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1992; Barnby-Smith, 1992; Parente e Hill, 1992-a; Parente e Hill, 1992-b).

3.2.3- Atividade da enterocina

Segundo Lyon *et al.* (1995) nos últimos anos, tem-se noticiado vários casos de doenças com alimentos contaminados por microrganismos, entre eles a *Listeria monocytogenes*, infectando mulheres grávidas, recém nascidos e outros. Refrigeração e outros métodos de conservação não têm prevenido a sobrevivência e crescimento da *L. monocytogenes* em alimentos contaminados.

Bactérias da família dos enterococos, microrganismos gram-positivo e gram-negativo incluindo bactérias ácido lácticas, têm sido usadas para produzir bacteriocinas, que são frequentemente ativas contra patogênicos ou organismos esporulados de grande ocorrência em alimentos. A enterocina foi utilizada, por muitos autores, para inativar determinados

microrganismos, verificando sua atividade inibidora, dos quais alguns estão citados na Tabela 3.2 (Cintas *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1996; Aymerich *et al.*, 1996; Lyon *et al.*, 1995; Giraffa *et al.*, 1995; Parente e Ricciardi, 1994; Tarelli *et al.*, 1994; Olasupo *et al.*, 1994; Bierbaum *et al.*, 1994; Parente e Hill, 1992-a; Parente e Hill, 1992-b).

Tabela 3.2: Atividade da enterocina sobre alguns microrganismos

Microrganismo	Atividade Inibidora
<i>Lactobacillus sake</i>	+
<i>Lactobacillus fermentum</i>	+ -
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
<i>Lactobacillus buchneri</i>	+ -
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	+
<i>Clostridium perfringens</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	+ -
<i>Listeria innocua</i>	+
<i>Listeria spp</i>	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+ -
<i>Staphylococcus carnosus</i>	+ -
<i>Lactococcus cremoris</i>	-

(+) inibido e (-) não inibido

Franz *et al.* (1996) também avaliaram o efeito do pH na atividade da enterocina; para isso, o pH do sobrenadante de culturas produtoras de enterocina foi ajustado entre 2,0 e 10,0 com NaOH ou HCl 6N, usando como microrganismo teste para a atividade antibacteriana o *Lactobacillus sake* DSM 20017. Os resultados obtidos mostraram que a enterocina foi mais

ativa em sobrenadantes ajustados a pH 6,0 e para os de pH entre 3,0 e 9,0, no entanto, a atividade da enterocina foi baixa.

Tarelli *et al.* (1994) relataram que o leite foi um meio apropriado para produção de bacteriocina durante o processo de fabricação de queijo fresco. Subsequentemente, pesquisas mostraram que o crescimento de *Listeria* spp. em queijo camembert foi inibido por substâncias produzidas por bactérias, sendo que enterocina 1146 e enterocina 226 NWC de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, respectivamente, inibiram o crescimento de *Listeria monocytogenes*.

3.3 – CAPACIDADE DE MULTIPLICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos nos produtos alimentícios são normalmente controlados por exclusão ou remoção e inibição de multiplicação ou destruição. Os processos atualmente usados dependem da sensibilidade dos microrganismos a serem controlados e da própria natureza do produto. Características importantes dos microrganismos incluem sensibilidade ao calor ou ao frio, necessidade de água, sensibilidade a ácidos ou álcalis, radiação e a substâncias químicas com ação antimicrobiana. Em termos práticos, essas características são exploradas pelo resfriamento, congelamento, pasteurização, enlatamento, secagem, salga, adição de açúcares, fermentação, tratamento por radiação ionizante e uso de conservantes. A gama de valores do pH nas quais alguns microrganismos podem se multiplicar é mostrada na Tabela 3.3 (Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas dos Alimentos).

Tabela 3.3: Limites de pH que permitem início de desenvolvimento de vários microrganismos, em meios de culturas laboratoriais ajustados com ácido ou álcali fortes¹

Microrganismo	pH mínimo	pH máximo
<i>Escherichia coli</i>	4,4	9,0
<i>Clostridium botulinum</i>	4,7	8,5
<i>Enterococcus</i> spp.	4,8	10,6
<i>Streptococcus faecium</i>	4,4-4,7	9,2

¹ ICMSF, 1980^a, Tabela 5.3, p.101 (condensado).

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- MEIOS DE MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

4.1.1- Microrganismo

Os microrganismos utilizados para a produção de enterocina foram os *Enterococcus faecium* CCT5079 (Coleção de Culturas Tropical) e NRRL1295 (National Center For Agricultural Utilisation Research).

4.1.2- *Enterococcus faecium* – cultura estoque

O microrganismo produtor da enterocina cresceu em tubos de ensaio inclinados contendo 7mL de meio basal (20g.L⁻¹ de agar), citado na Tabela 4.1, sendo que nesta etapa a concentração de glicose foi de 5g.L⁻¹ e o pH ajustado para 6,8, antes da esterilização a 121°C por 15 min. O crescimento ocorreu a 37°C por 24h sem agitação.

Tabela 4.1: Composição do meio basal de fermentação

Composto	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicose	20,0
Triptona	7,5
Extrato de levedura	5,0
KH ₂ PO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05
Tween 80	2,0

Ajuste do pH com NaOH 2N ou HCl 2N

4.1.3- Pré-inóculo

Para o preparo do pré-inóculo, utilizou-se uma amostra da cultura estoque (item 4.1.2) para inocular 200mL de meio basal nas mesmas proporções e condições anteriores. Após 24h, 5mL deste meio foram distribuídos em tubos de ensaio contendo 5mL de glicerol 40%, previamente esterilizados e posteriormente congelados.

4.1.4- Microrganismos teste

Foram utilizados como microrganismos teste para a atividade antibacteriana o *Rhodococcus equi*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus buchneri*, crescidos em tubos de ensaio inclinados contendo 7mL de caldo MRS (20g.L^{-1} de agar), sendo a concentração de glicose de 20g.L^{-1} e o pH ajustado para 6,8, antes da esterilização a 121°C por 15 min. O crescimento ocorreu a 37°C por 24h sem agitação. Os tubos foram mantidos em refrigerador.

4.2- MEIO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE ENTEROCINA

4.2.1- Inoculo

Um tubo com as culturas descritas no item 4.1.3 foi utilizado para inocular 400mL de meio basal (Tabela 4.1), com o pH ajustado para 6,8 antes da esterilização a 121°C por 15 min, sendo este incubado a 37°C por 24h sem agitação.

4.2.2- Produção de enterocina em fermentação tipo batelada em frascos de Erlenmeyer

4.2.2.1- Definição preliminar das condições operacionais

A primeira etapa das fermentações realizou-se em frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 200mL de meio basal (Tabela 4.1), esterilizados a 121°C por 15 min. Estes foram inoculados com 10% v/v de inóculo (item 4.2.1) e incubados por 24h com agitação de 200rpm. Nesta etapa, que compreendeu o estudo da influência de algumas condições operacionais na produção de enterocina, foi empregado um planejamento estatístico fatorial, analisado através do software “statistica for Windows 5.0”, para determinação das variáveis mais importantes do processo. As variáveis independentes foram: microrganismo produtor, temperatura de incubação e pH_{inicial}. A variável resposta foi a atividade de enterocina, determinada para cada ensaio, segundo protocolo descrito no item 4.3.2.

A Tabela 4.2 apresenta os valores reais das variáveis correspondentes aos níveis inferior (-1) e superior (+1), do planejamento estatístico fatorial.

Tabela 4.2: Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo

VARIÁVEIS	NÍVEIS	
	-1	+1
Microrganismo	<i>Enterococcus faecium</i> NRRL1295	<i>Enterococcus faecium</i> CCT5079
Temperatura (°C)	30	37
pH _{inicial}	5	8

A Tabela 4.3 apresenta a matriz do planejamento fatorial completo 2^3 na forma codificada.

Tabela 4.3: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3

Ensaio	Microrganismo	Temperatura	pH _{inicial}
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

4.2.2.2- Influência das concentrações de triptona e extrato de levedura

Após a definição do melhor microrganismo produtor de enterocina e das melhores condições de temperatura de incubação e pH_{inicial}, estes resultados foram utilizados nas fermentações em frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 200mL de meio basal (Tabela 4.1), no qual variou-se as concentrações de triptona e extrato de levedura, conforme a Tabela 4.4, para avaliar a influência dessas variáveis na produção de enterocina. Os meios foram inoculados com 10% v/v de inóculo (item 4.2.1) e incubados por 24h com agitação de 200rpm.

Tabela 4.4: Composição do meio basal variando a concentração de triptona e extrato de levedura

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (g.L ⁻¹)					
	1	2	3	4	5	6
Glicose	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Triptona	7,5	10,0	5,0	7,5	7,5	10,0
Ext. Levedura	5,0	5,0	5,0	7,5	2,5	7,5
KH ₂ PO ₄	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Tween 80	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

4.2.2.3- Influência do pH_{inicial} no meio contendo glicose ou sacarose

Utilizando-se o melhor microrganismo produtor da enterocina e as melhores condições de temperatura de incubação e composição do meio, fez-se fermentações com triagem do melhor pH_{inicial} de acordo com o item 4.2.2.1. Foram testados valores de pH_{inicial} de 7 a 12, em meio basal, com concentrações de glicose ou sacarose de 20g.L⁻¹. O crescimento ocorreu em frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 200mL de meio definido no item 4.2.2.2, que foram inoculados com 10% v/v de inóculo (item 4.2.1) e incubados por 24h com agitação de 200rpm.

4.2.2.4- Influência da composição do meio basal

Fez-se fermentações em frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 200mL de meio basal em diferentes composições, utilizando-se sacarose segundo a Tabela 4.5, com pH_{inicial}

definido no item 4.2.2.3. Estes meios foram inoculados com 10% v/v de inóculo (item 4.2.1) e incubados a uma temperatura já definida (item 4.2.2.1), por 24h com agitação de 200rpm.

Tabela 4.5: Meio basal em diferentes composições utilizando sacarose

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (g.L ⁻¹)					
	1	2	3	4	5	6
Sacarose	10,0	20,0	30,0	40,0	60,0	120,0
Triptona	11,77	10,55	9,43	8,35	6,39	2,09
Ext. Levedura	8,83	7,93	7,07	6,25	4,79	1,57
KH ₂ PO ₄	2,36	2,12	1,89	1,67	1,28	0,42
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,30	0,26	0,24	0,21	0,16	0,05
MnSO ₄ .H ₂ O	0,06	0,053	0,047	0,042	0,032	0,011
Tween 80	2,36	2,12	1,89	1,67	1,28	0,42

4.2.2.5- Influência da concentração de sacarose

Fez-se fermentações em frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 200mL de meio, com sua melhor composição determinada no item 4.2.2.2 e o melhor pH_{inicial} definido no item 4.2.2.3, utilizando-se diferentes concentrações de sacarose (g.L⁻¹): 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100,0; 120,0; 140,0 e 150,0. Estes meios foram inoculados com 10% v/v de inóculo (item 4.2.1) e incubados a uma temperatura já definida (item 4.2.2.1), por 24h com agitação de 200rpm.

4.2.3- Produção de enterocina em fermentação tipo batelada em fermentador de bancada

Após a definição das melhores condições de composição, concentração de substrato, temperatura de incubação e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ do meio basal, em fermentação tipo batelada, foram feitas fermentações em fermentador de bancada para estudar o efeito das seguintes condições operacionais: aeração (anaeróbia e aeróbia - 1,5VVM), alimentação do meio em batelada alimentada e convencional.

As fermentações foram conduzidas em fermentador de bancada tipo “New-Brunswick-Bioflow III”.

4.2.3.1- Influência da aeração

Para determinação da influência da aeração no sistema, foram conduzidas fermentações separadamente, uma sem aeração e outra com aeração de 1,5VVM, em biorreatores contendo 4L de meio basal. A composição do meio, a concentração de substrato, a temperatura de incubação e o $\text{pH}_{\text{inicial}}$ empregado, foram previamente selecionados de acordo com os itens 4.2.2.2, 4.2.2.5, 4.2.2.1 e 4.2.2.3, respectivamente. O equipamento foi inoculado com 10% v/v de inóculo (item 4.2.1) por 24h a 200rpm.

4.2.3.2- Influência da aeração e alimentação em fermentação tipo batelada alimentada

Após definir a cinética de fermentação (itens 4.2.3.1), fez-se fermentação com alimentação do tipo batelada alimentada. O bioreator, contendo 2L de meio definido anteriormente, foi inoculado com 10% v/v de inóculo (item 4.2.1), incubado à temperatura definida no item 4.2.2.1, por 20h com agitação de 200rpm e aeração de 1,5VVM. Após as 20h

de fermentação, cessou-se a aeração e alimentou-se o equipamento, de uma só vez, com 2L do mesmo meio, ocorrendo a fermentação por mais 12h, completando assim 32h de cultivo.

4.2.4- Cultivo do microrganismo teste

O cultivo dos microrganismos teste foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 200mL de caldo MRS com concentração de glicose de 20g.L^{-1} e o pH ajustado para 6,5, esterilizado a 121°C por 15 min. Estes frascos foram inoculados com alçadas de inóculo obtido no item 4.1.4 e incubados a 37°C por 24h com agitação de 200rpm.

O caldo MRS também foi utilizado como o meio de reação para determinação da atividade de enterocina e como branco para zerar o espectro na leitura da absorbância.

4.3- MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1- Determinação de massa celular seca (MCS)

As amostras das fermentações foram centrifugadas a 5000rpm (4218,75g) por 20min; o sobrenadante foi separado e a biomassa lavada por duas vezes com água destilada, seguindo-se de secagem em estufa a vácuo a 65°C até peso constante (~16h), sendo determinada a quantidade de massa celular por diferença de peso. O sobrenadante foi reservado para as demais análises.

4.3.2- Determinação da atividade de enterocina (UE)

A atividade de enterocina foi determinada em tubos de ensaio contendo 5mL de caldo MRS mais 1mL de meio fermentado do microrganismo teste e mais 2mL do sobrenadante, que continha a enterocina, obtido no item 4.3.1, com o pH ajustado para 6,5. Os tubos foram incubados a 37°C por 6h, juntamente com um tubo contendo 7mL de caldo MRS e 1mL de meio fermentado do microrganismo teste, que foi denominado como padrão. Após, tiveram sua absorbância lida em espectrofotômetro a 600nm, usando como branco um tubo contendo 8mL de caldo MRS. Os valores lidos, dos tubos contendo a enterocina, foram comparados com o padrão para determinação da sua atividade.

Uma unidade de atividade de enterocina foi definida como a quantidade ou massa de enterocina que reduziu a absorbância da cultura do microrganismo teste de 0,1 unidade em relação ao padrão.

Quando a fermentação era conduzida a 30°C, os tubos também eram incubados a esta temperatura. Esta metodologia é uma modificação do procedimento descrito por Berridge & Barret, 1952.

4.3.3- Determinação da concentração de glicose e sacarose (S)

A concentração de glicose foi determinada pelo método da glicose oxidase-peroxidase, utilizando reagente Glicose Enz-Color da Biodiagnóstico. No caso dos meios contendo sacarose, uma alíquota do sobrenadante foi hidrolisada com igual volume de HCl 2N por 5min em banho a 100°C e após neutralização com igual volume de NaOH 2N, determinou-se a concentração de glicose, como descrito acima.

4.3.4- Determinação de pH

A determinação de pH de cada amostra foi feita através de potenciômetro.

4.4- ESTABILIDADE DA ENTEROCINA QUANTO À CONSERVAÇÃO

Os testes foram realizados com o sobrenadante do meio fermentado contendo a enterocina, obtido em fermentação com as melhores condições de composição do meio basal, concentração de substrato, temperatura de incubação e pH_{inicial}. O pH do sobrenadante foi ajustado a 6,5 e este distribuído em tubos de ensaio com tampa para análise dos efeitos relativos ao congelamento e à temperatura de pré-incubação.

4.4.1- Efeito do congelamento

Após mantido alguns tubos (item 4.4) sob congelamento em “freezer” (-20°C), para os tempos 0, 7, 14 e 60 dias, determinou-se a atividade de enterocina, segundo protocolo descrito no item 4.3.2.

4.4.2- Efeito da temperatura de pré-incubação

Após o ajuste do pH, alguns tubos (item 4.4) foram submetidos a diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70, 80 e 90°C), sendo retirados em intervalos de tempo de 15min por 3h e usados para determinação da atividade de enterocina segundo protocolo descrito no item

4.3.2. Podendo também ser determinado, neste item, o tempo de meia vida da enterocina, pela equação (4.1).

$$\ln \frac{A_0}{A} = K \cdot t \quad (4.1)$$

Onde:

A_0 – Absorbância inicial

A – Absorbância final

K – Constante de velocidade de inibição

t – Tempo

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM FERMENTAÇÃO TIPO BATELADA EM FRASCOS DE ERLLENMEYER

5.1.1- Definição preliminar das condições operacionais

Nesta etapa foram definidos o melhor microrganismo e as melhores condições de temperatura e $pH_{inicial}$ da fermentação para a produção de enterocina. Os resultados foram expressos em atividade de enterocina, utilizando-se os microrganismos teste *Rodococcus equi*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus buchneri*. Na Tabela 5.1 estão representadas as variáveis com os valores reais e os resultados de atividade obtidos.

Tabela 5.1: Matriz com os valores reais e as respostas de atividade de enterocina do planejamento fatorial completo 2^3 para os microrganismos teste

Ensaio	Linhagem <i>E. faecium</i>	T (°C)	pH	Atividade (UE) – Microrganismos teste			
				<i>R. equi</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. buchneri</i>
1	NRRL1295	30	5	0,0	0,45	0,0	0,0
2	CCT5079	30	5	0,37	0,34	0,0	0,0
3	NRRL1295	37	5	0,0	0,93	0,36	0,0
4	CCT5079	37	5	0,23	1,35	0,54	0,38
5	NRRL1295	30	8	0,0	0,84	0,0	0,0
6	CCT5079	30	8	0,36	0,43	0,0	0,0
7	NRRL1295	37	8	0,0	1,31	0,57	0,0
8	CCT5079	37	8	0,30	1,67	2,56	2,81

Os resultados da Tabela 5.1 mostram que a melhor atividade de enterocina, ou seja, a maior inibição dos microrganismos testados ocorreu no ensaio de número 2, no qual o microrganismo produtor utilizado foi o CCT5079, à temperatura de incubação de 30°C e o pH_{inicial} 5,0, para o *R. equi* com o valor de 0,37UE. Para os demais microrganismos teste a melhor atividade ocorreu no ensaio de número 8,0, no qual o microrganismo produtor utilizado foi o CCT5079, à temperatura de incubação de 37°C e o pH_{inicial} 8, atingindo os valores de 1,67UE para o *E. faecium*, 2,56UE para o *L. fermentum* e 2,81UE para o *L. buchneri*.

Aplicando o planejamento fatorial, obtendo-se as respostas através do software “statistica for Windows 5.0”, tens-se como resultado as Tabelas 5.1a a 5.1d, que apresentam os valores dos efeitos estimados para a resposta atividade de enterocina (UE). Os parâmetros com (*) são estatisticamente significativos a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 5.1a: Valores dos efeitos estimados para a resposta de atividade de enterocina, usando o *Rhodococcus equi* como microrganismo teste

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(1)	p
Média	0,1575*	0,0100*	15,7500*	0,0404*
Microrganismo	0,3150*	0,0200*	15,7500*	0,0404*
Temperatura	-0,0500	0,0200	-2,5000	0,2422
pH	0,0150	0,0200	0,7500	0,5903

$R^2 = 0,99621$

MS residual = 0,0008

Tabela 5.1b: Efeitos estimados para a resposta de atividade de enterocina, usando o *Enterococcus faecalis* como microrganismo teste

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(1)	p
Média	0,9150*	0,0300*	30,5000*	0,0209*
Microrganismo	0,0650	0,0600	1,0833	0,4745
Temperatura	0,8000*	0,0600*	13,3333*	0,0477*
pH	0,2950	0,0600	4,9167	0,1277

$R^2 = 0,99577$
MS residual = 0,0072

Tabela 5.1c: Efeitos estimados para a resposta de atividade de enterocina, usando o *Lactobacillus fermentum* como microrganismo teste

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(1)	p
Média	0,5037	0,2262	2,2265	0,2687
Microrganismo	0,5425	0,4525	1,1989	0,4426
Temperatura	1,0075	0,4525	2,2265	0,2687
pH	0,5575	0,4525	1,2320	0,4340

$R^2 = 0,92229$
MS residual = 0,4095125

Tabela 5.1d: Efeitos estimados para a resposta de atividade de enterocina, usando o *Lactobacillus buchneri* como microrganismo teste

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(1)	p
Média	0,3987	0,3037	1,3128	0,4144
Microrganismo	0,7975	0,6075	1,3128	0,4144
Temperatura	0,7975	0,6075	1,3128	0,4144
pH	0,6075	0,6075	1,0000	0,5000

$R^2 = 0,89095$
MS residual = 0,7381125

A Tabela 5.1e e a Figura 5.1 apresentam os efeitos das variáveis estudadas sobre as respostas analisadas.

Tabela 5.1e: Representação geral dos efeitos estimados para a resposta de atividade de enterocina sobre os microrganismos teste

Fator	Efeitos			
	R. equi	E. faecalis	L. fermentum	L. buchneri
Microrganismo	0,3150*	0,0650	0,5425	0,7975
Temperatura	-0,0500	0,8000*	1,0075	0,7975
pH	0,0150	0,2950	0,5575	0,6075

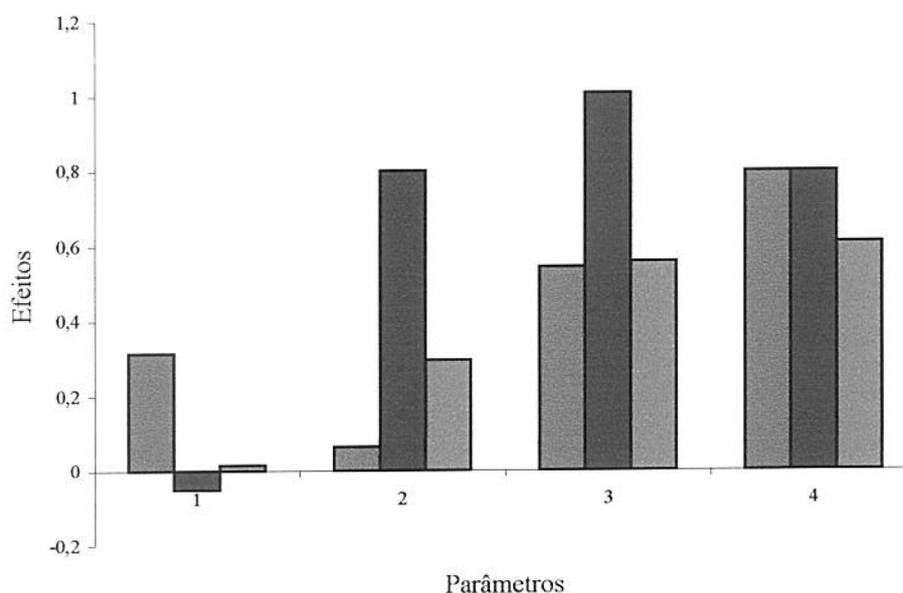


Figura 5.1: Representação geral dos efeitos estimados para a resposta de atividade dos microrganismos teste. Microrganismo (■), Temperatura (■) e pH (■)

Analisando os resultados da Tabela 5.1e que estão representados na Figura 5.1 sob a forma de efeitos estatísticos, pode-se dizer que, para o *Rhodococcus equi*, a variável de maior significância em relação a produção de enterocina na resposta de sua atividade foi o microrganismo *Enterococcus faecium* CCT5079. Já para o *Enterococcus faecalis* a variável de maior significância em relação à produção de enterocina na resposta de atividade foi à

temperatura de 37°C e para o *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus buchneri* os efeitos não foram estatisticamente significativos. Os únicos efeitos significativos foram o microrganismo *Enterococcus faecium* CCT5079 para atividade de enterocina sobre o *Rhodococcus equi* e a temperatura de 37°C para o *Enterococcus faecalis*. No entanto, observa-se que, as maiores influências na resposta dos efeitos foram o *Enterococcus faecium* CCT5079, temperatura de 37°C e pH_{inicial} 8,0, que correspondem ao nível +1, com exceção da temperatura de 30°C para a atividade de enterocina sobre o *Rhodococcus equi*, porém com baixa influência.

Analisando os resultados experimentais de atividade e os efeitos estimados, visando obter o maior valor possível de atividade, conclui-se que o melhor microrganismo produtor de enterocina é o *Enterococcus faecium* CCT5079 e as melhores condições são temperatura de incubação de 37°C e pH_{inicial} 8,0.

Como os efeitos significativos estão associados ao nível +1, as respostas indicam que as melhores atividades poderiam ser conseguidas, numa nova região experimental, com níveis superiores àqueles estudados. Porém, a otimização das condições operacionais não foi realizada, devido à utilização de uma variável qualitativa (tipo de microrganismo) e uma quantitativa restritiva (temperatura) à fermentação.

5.1.2- Influência das concentrações de triptona e extrato de levedura

Após a definição do item 5.1.1, utilizou-se os melhores resultados em novas fermentações, para avaliar a influência das concentrações de triptona e extrato de levedura no meio basal (Tabela 4.4). Estes meios foram ajustados a pH_{inicial} 8,0, sendo inoculados com *Enterococcus faecium* CCT5079 e então incubados a 37°C.

A partir deste experimento, utilizou-se como microrganismo teste somente o *Enterococcus faecalis*, devido a sua facilidade de manutenção quando comparado aos outros microrganismos utilizados como teste.

Os resultados das fermentações em função do pH_{final} , massa celular seca e atividade, estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Valores de pH_{final} , massa celular seca (MCS) e atividade (UE) de produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 com variação da concentração de triptona e extrato de levedura no meio basal

Ensaio	Concentração (g.L^{-1})		pH_{final}	MCS (g.L^{-1})	UE
	Triptona	Ext. Levedura			
1	7,5	5,0	4,55	0,90	1,16
2	10,0	5,0	4,58	0,92	1,23
3	5,0	5,0	4,52	0,84	1,19
4	7,5	7,5	4,58	0,91	1,08
5	7,5	2,5	4,58	0,88	1,21
6	10,0	7,5	4,54	0,94	1,26

Comparando-se os resultados de atividade de enterocina (Tabela 5.2) representados também pela Figura 5.2, percebe-se uma pequena diferença nos valores, indicando, porém, que o ensaio de número 6 é o que apresentou maior atividade de enterocina, atingindo 1,26UE, sendo, portanto este, considerado como o melhor resultado de atividade para estes ensaios.

Devido a estes resultados, as demais fermentações foram realizadas com composição do meio basal de 10g.L^{-1} de triptona e $7,5\text{g.L}^{-1}$ de extrato de levedura, para garantir o excesso destes nutrientes no meio.

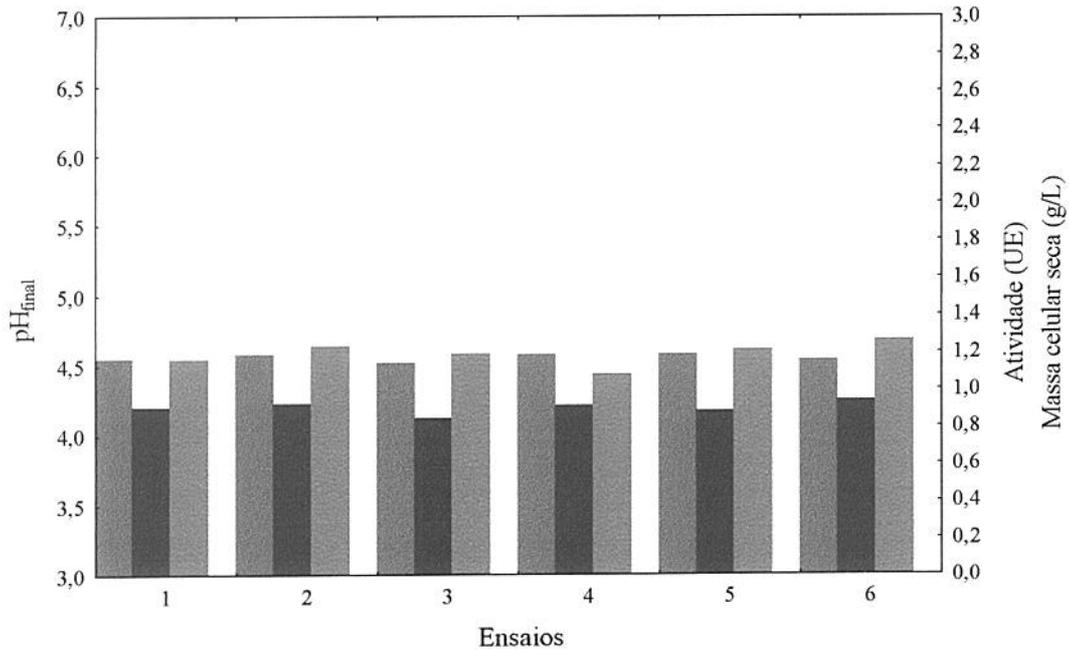


Figura 5.2: Valores de pH_{final} (■), massa celular seca (■) e atividade (■) na produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 com variação da concentração de triptona e extrato de levedura no meio basal.

Da mesma forma, pode-se observar na Tabela 5.2 e na Figura 5.2 que os resultados de pH_{final} e massa celular seca, apresentaram pequena variação nos seus valores, próximos a 4,55 e 0,90g.L⁻¹ respectivamente. Realizou-se também, nestes primeiros experimentos, a determinação da concentração de substrato pelo método de Somogy-Nelson, porém não se obteve resultados positivos, devido ao método não ser o ideal para as concentrações e/ou meio utilizados.

Nesta etapa, fez-se um teste utilizando o soro de queijo em pó, que fornecesse 20g.L⁻¹ de lactose, como substituto da glicose, para avaliar a produção de enterocina. O resultado obtido foi negativo, ou seja, o meio contendo soro de queijo após fermentado não inibiu o *Enterococcus faecalis*.

5.1.3- Influência do $\text{pH}_{\text{inicial}}$ no meio contendo glicose ou sacarose

Com o microrganismo *Enterococcus faecium* CCT5079 como produtor da enterocina e a composição do meio basal definida no item 5.1.2, utilizando-se nesta etapa concentrações de glicose e sacarose de 20g.L^{-1} , fez-se fermentações com $\text{pH}_{\text{inicial}}$ variando de 7 a 12, com os meios sendo incubados a 37°C .

Na Tabela 5.3 estão descritos os resultados das fermentações em termos de pH_{final} , massa celular seca e atividade de enterocina, em função do $\text{pH}_{\text{inicial}}$, para a glicose ou sacarose, como fontes de carbono.

Tabela 5.3: Valores de pH_{final} , massa celular seca (MCS) e atividade (UE) de produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 em meio basal com glicose ou sacarose como fontes de carbono

Ensaio	$\text{pH}_{\text{inicial}}$	Glicose (20g.L^{-1})			Sacarose (20g.L^{-1})		
		pH_{final}	MCS(g.L^{-1})	UE	pH_{final}	MCS(g.L^{-1})	UE
1	7	4,72	0,77	1,24	4,88	0,98	1,26
2	8	4,76	0,76	1,38	4,94	0,97	1,42
3	9	4,57	0,85	1,86	4,82	0,73	2,59
4	10	5,82	0,69	2,97	7,08	0,65	2,69
5	11	8,50	0,44	0,98	8,89	0,48	1,21
6	12	9,88	0,56	0,68	10,46	0,52	0,80

Analisando-se os resultados de atividade de enterocina (Tabela 5.3), representados nas Figuras 5.3a para glicose e 5.3b para sacarose, ambas relacionadas na Figura 5.3c, observa-se que, a atividade de enterocina cresceu com o aumento do $\text{pH}_{\text{inicial}}$ de 7,0 a 10,0, alcançando os valores máximos de 2,97UE e 2,69UE, para os meios contendo glicose e sacarose,

respectivamente. Para pHs maiores, 11,0 e 12,0, a atividade de enterocina caiu drasticamente em ambos os casos.

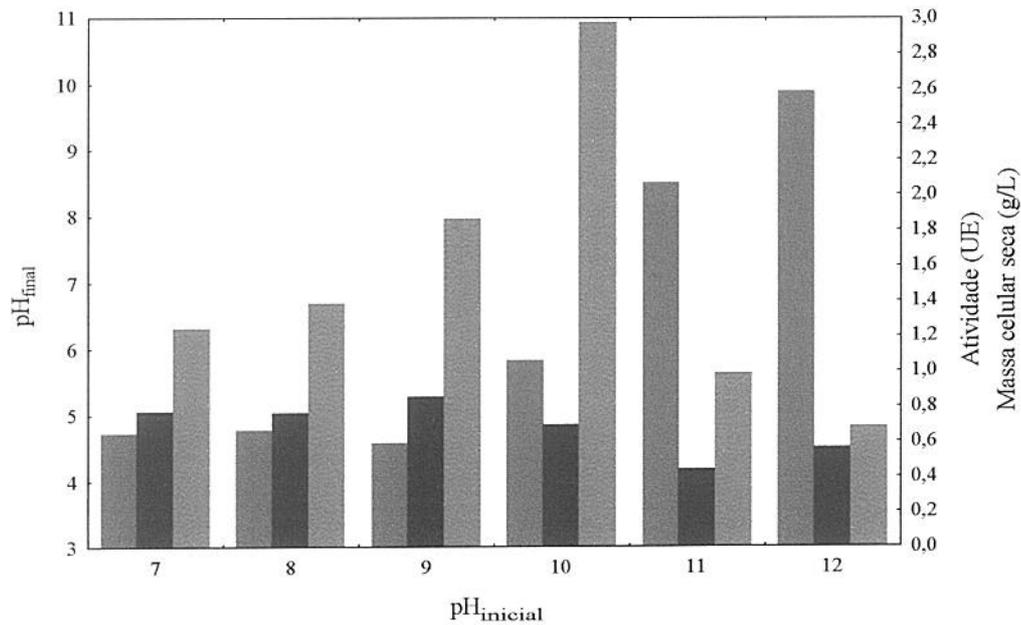


Figura 5.3a: Valores de pH_{final} (■), massa celular seca (■) e atividade (■) na produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 em meio basal contendo glicose em diferentes pH_{inicial}

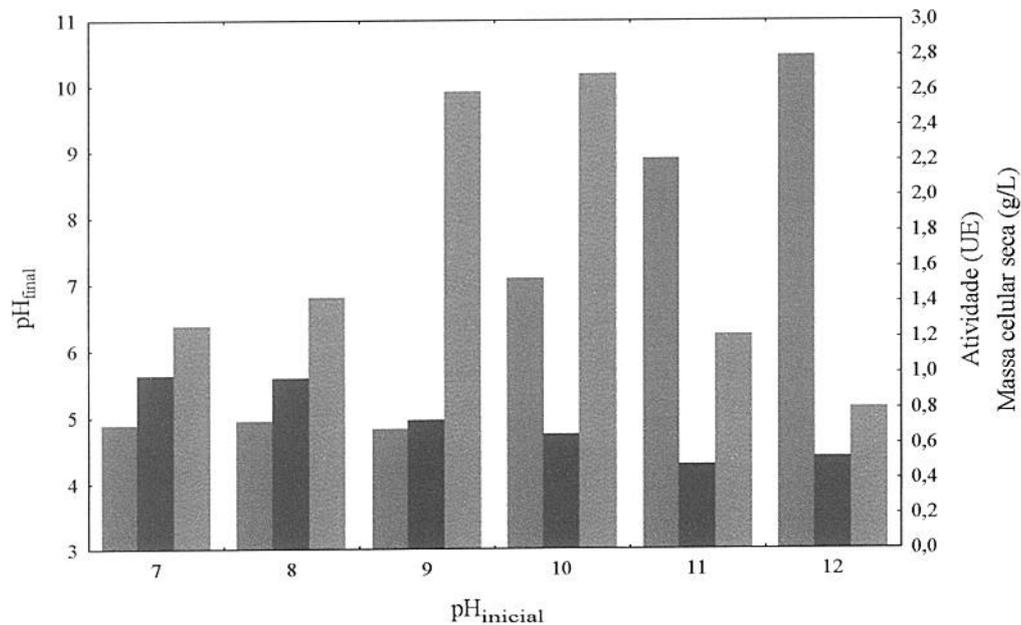


Figura 5.3b: Valores de pH_{final} (■), massa celular seca (■) e atividade (■) de produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 em meio basal contendo sacarose em diferentes pH_{inicial}

Em ambos os casos, nos meios contendo glicose ou sacarose, o pH_{final} cresce com o $\text{pH}_{\text{inicial}}$, ou seja, com o aumento do $\text{pH}_{\text{inicial}}$ o decréscimo do pH ao longo do tempo de fermentação é menor. A massa seca cresce inicialmente, até $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 9,0 para a glicose e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 8,0 para a sacarose, decrescendo para os pHs superiores.

A Figura 5.3c apresenta uma comparação da atividade de enterocina produzida nos meios contendo glicose ou sacarose, em função do $\text{pH}_{\text{inicial}}$. Os melhores resultados, para ambos os casos, foram obtidos em fermentações realizadas com $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0. Observa-se também que, os valores de atividade de enterocina do meio contendo glicose são menores quando comparados ao meio com sacarose, para cada $\text{pH}_{\text{inicial}}$, com exceção do $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0. Logo, a partir deste experimento, adotou-se o $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 e a sacarose como fonte de carbono, baseando-se nos resultados e no seu baixo custo.

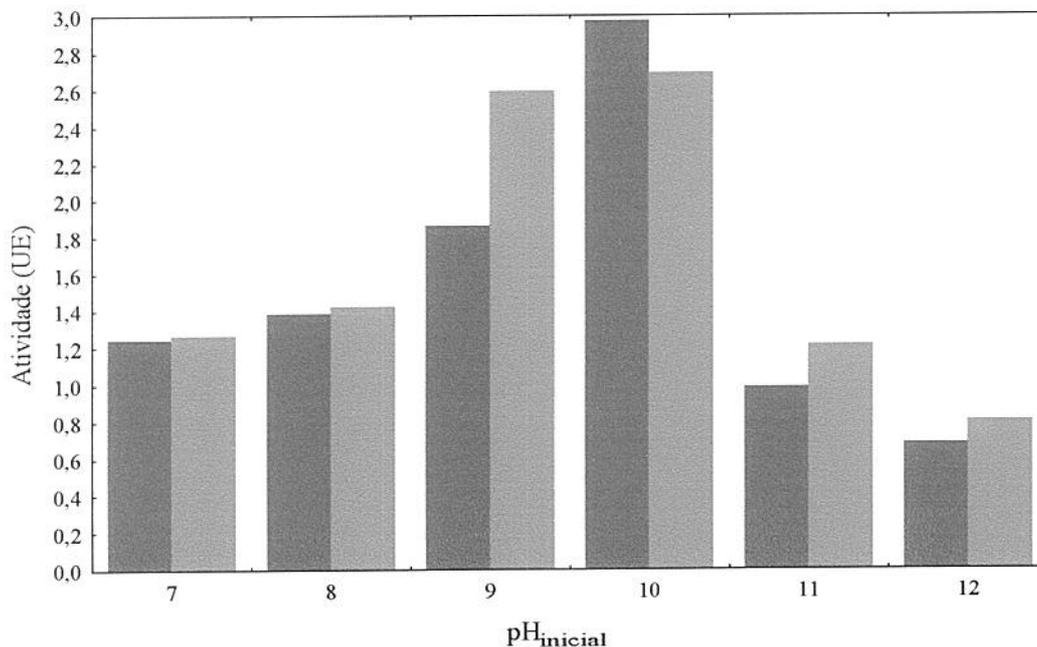


Figura 5.3c: Valores da atividade de enterocina produzida por *Enterococcus faecium* CCT5079 em meio basal contendo glicose (■) ou sacarose (□) como fonte de carbono em função do $\text{pH}_{\text{inicial}}$

5.1.4- Influência da composição do meio basal

A influência das diferentes composições do meio basal, para a produção de enterocina, foi analisada conforme a Tabela 4.5, utilizando-se como microrganismo produtor o *Enterococcus faecium* CCT5079, sendo estes meios ajustados a $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 e incubados a 37°C.

Os resultados das fermentações são mostrados na Tabela 5.4 e Figura 5.4, em função do pH_{final} , massa celular seca e atividade de enterocina.

Tabela 5.4: Valores de pH_{final} , massa celular seca (MCS) e atividade (UE) na produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 no meio basal em diferentes concentrações

Ensaio	pH_{final}	MCS(g.L ⁻¹)	UE
1	6,80	0,23	2,36
2	6,85	0,24	2,68
3	7,72	0,11	2,55
4	7,34	0,12	2,65
5	8,19	0,06	2,43
6	6,33	0,19	2,97

Comparando-se os resultados de atividade (Tabela 5.4 e Figura 5.4), juntamente com os valores de pH_{final} e massa celular seca, percebe-se que não há diferença significativa em seus valores, com exceção do pH e das atividades dos ensaios 1 e 6, que apresentam variação um pouco maior. Baseando-se nestas respostas, pode-se dizer que a atividade da enterocina é pouca influenciada pela variação da concentração dos constituintes do meio basal.

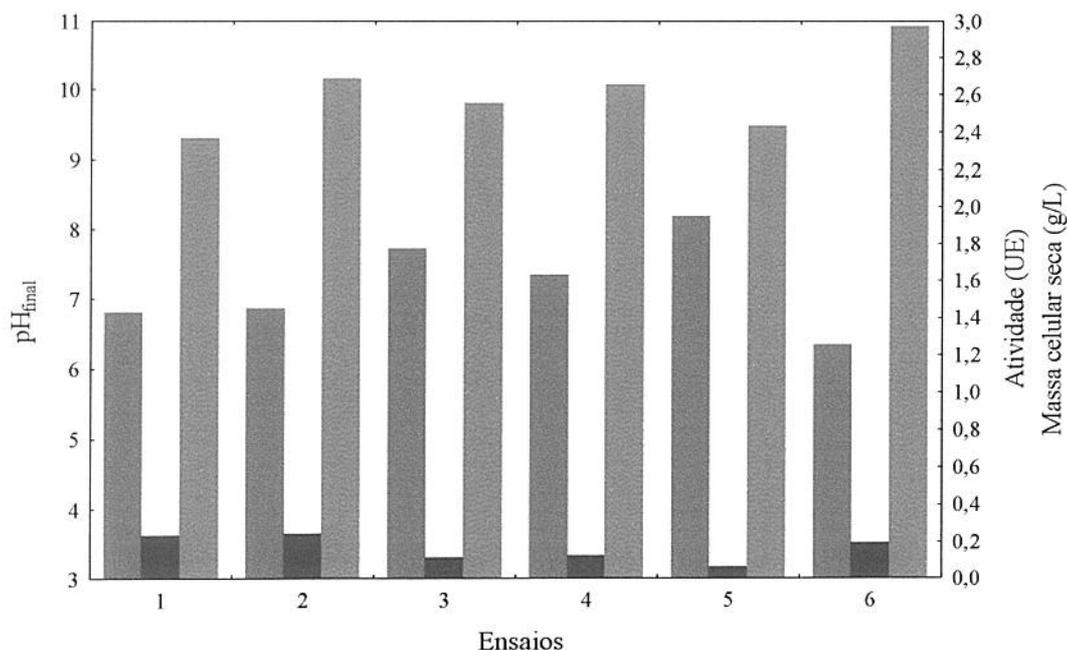


Figura 5.4: Valores de pH_{final} (■), massa celular seca (■) e atividade (■) na produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 no meio basal em diferentes concentrações

Com base nestes resultados, adotou-se para os experimentos subsequentes a composição do meio apresentada na Tabela 4.4 para os constituintes (g.L⁻¹): KH₂PO₄ 2,0; MgSO₄.7H₂O 0,25; MnSO₄.H₂O 0,05 e Tween 80 2,0; para a triptona e extrato de levedura as concentrações de 10,0 g.L⁻¹ e 7,5 g.L⁻¹, respectivamente, definidas no item 5.1.2.

5.1.5- Influência da concentração de sacarose

Utilizando-se como microrganismo produtor de enterocina o *Enterococcus faecium* CCT5079, fez-se fermentações com meio basal em diferentes concentrações de sacarose, variando de 10,0 a 150,0 g.L⁻¹. Estes meios foram ajustados a pH_{inicial} 10,0 (definido no item 5.1.3) e incubados a 37°C.

Na Tabela 5.5 estão descritos os resultados da fermentação, em termos de pH_{final} , massa celular seca, concentração final de sacarose e atividade de enterocina.

Tabela 5.5: Valores de pH_{final} , massa celular seca (MCS), concentração final de sacarose (S) e atividade (UE) na produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 com sacarose em diferentes concentrações no meio basal

Ensaio	S_{inicial} (g.L ⁻¹)	pH_{final}	MCS (g.L ⁻¹)	Sacarose			UE
				S_{final} (g.L ⁻¹)	Consumo (g.L ⁻¹)*	Consumo (%)*	
1	10,0	8,09	0,21	7,88	4,03	33,84	2,08
2	20,0	7,90	0,24	12,62	9,29	42,40	2,65
3	30,0	7,83	0,26	21,72	10,19	31,93	2,55
4	40,0	7,58	0,27	29,54	12,37	29,52	2,61
5	60,0	7,26	0,30	46,69	15,22	24,58	2,63
6	80,0	6,87	0,38	63,78	18,13	22,13	2,91
7	100,0	6,91	0,40	81,80	20,11	19,73	2,81
8	120,0	5,83	0,51	92,68	29,23	23,98	2,65
9	140,0	5,54	0,53	117,30	24,61	17,34	2,67
10	150,0	5,22	0,60	126,00	25,91	17,06	2,95

* Para o cálculo do consumo (%) foi considerado como a concentração inicial de sacarose a amostra do tempo zero, incluindo-se também os 10% do meio de inóculo (+ 1,91 g.L⁻¹)

Os resultados apresentados na Tabela 5.5 e na Figura 5.5 mostram que os valores de atividade, para a variação da concentração de sacarose de 20 a 150 g.L⁻¹ foram elevados, mas não tiveram variações significativas entre eles, com exceção do ensaio com concentração de 10 g.L⁻¹, no qual o valor obtido foi de 2,08UE, enquanto que, para os demais os valores foram superiores a 2,55UE. Em relação ao pH_{final} e massa celular seca, tem-se que, o primeiro é inversamente e o segundo é diretamente proporcional ao aumento da concentração de

sacarose. Observa-se também a tendência indicando que, quanto maior a concentração inicial de sacarose menor é o seu consumo em valores relativos (%), possivelmente devido ao excesso de sacarose que pode conduzir à inibição de substrato. Já em valores absolutos, nota-se que a massa de sacarose consumida aumenta com a elevação da concentração inicial, até o ensaio de número 8, onde começa então a diminuir.

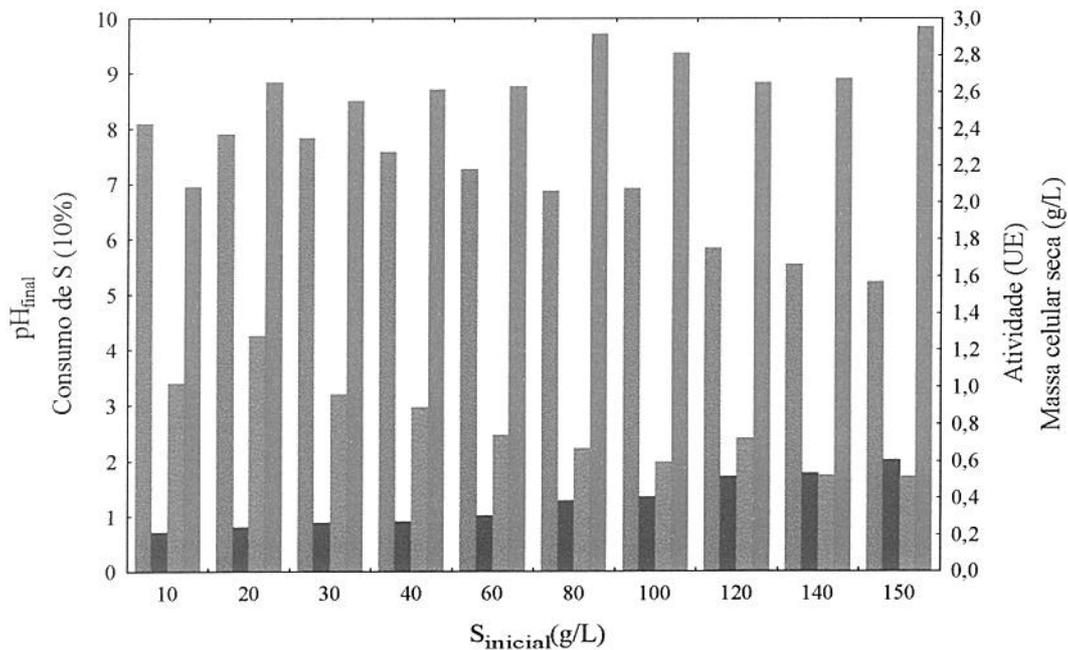


Figura 5.5: Valores de pH_{final} (■), massa celular seca (■), concentração final de sacarose (■) e atividade (■) na produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 no meio basal com diferentes concentrações de sacarose

A melhor resposta de atividade obtida foi de 2,95UE, em concentração inicial de sacarose de 150 g.L⁻¹, com consumo de apenas 17,06% desse substrato. Isto representa grandes perdas de sacarose no processo e pode causar dificuldade na separação do produto. Já para a concentração inicial de sacarose de 20 g.L⁻¹ com consumo de 42,40%, a atividade obtida foi de 2,65UE, sendo esta próxima ao maior valor obtido, adotou-se por esta concentração para os demais experimentos. Esta opção pode ser confirmada pelo cálculo da

produtividade desses pontos, para 2,95UE por 150g.L⁻¹ tem-se 0,0196 UE.g⁻¹.L⁻¹, e para o segundo 2,65UE por 20g.L⁻¹ tem-se 0,1325 UE.g⁻¹.L⁻¹.

5.2- PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM FERMENTAÇÃO TIPO BATELADA EM FERMENTADOR DE BANCADA

Com a escolha do *Enterococcus faecium* CCT5079 como o melhor microrganismo produtor de enterocina e a melhor temperatura de incubação a 37°C, definidos no item 5.1.1, com a melhor composição do meio basal, definida no item 5.1.2, com o meio ajustado a pH_{inicial} 10,0, definido no item 5.1.3, e com a concentração de sacarose de 20 g.L⁻¹, definida no item 5.1.5, foram realizadas fermentações em fermentador de bancada (fermentador Bioflow III), para traçar as curvas de crescimento celular, produção de enterocina, pH e consumo de substrato.

5.2.1- Influência da aeração

5.2.1.1- Fermentação sem aeração

A fermentação ocorreu durante um período de 24h, sendo que amostras foram retiradas em intervalos de 1h. Os valores de pH, massa celular seca, concentração de substrato e atividade de enterocina são mostrados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6: Valores de pH, massa celular seca (MCS), concentração de sacarose (S) e atividade (UE) na produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 em fermentação tipo batelada sem aeração em fermentador de bancada

Tempo (h)	pH	MCS (g.L ⁻¹)	S (g.L ⁻¹)	UE
0	9,85	0,50	22,13	1,13
1	9,85	0,48	22,13	1,08
2	9,80	0,47	21,95	1,25
3	9,73	0,48	21,81	1,46
4	9,65	0,51	21,51	1,47
5	9,52	0,53	20,96	1,39
6	9,39	0,54	19,97	1,38
7	9,27	0,49	19,68	1,42
8	9,18	0,40	18,94	1,73
9	9,07	0,40	18,66	2,23
10	8,99	0,34	18,60	2,42
11	8,93	0,34	18,45	2,56
12	8,85	0,31	18,14	2,57
13	8,78	0,32	17,78	2,60
14	8,73	0,31	17,21	2,64
15	8,68	0,27	16,66	2,61
16	8,65	0,25	16,40	2,61
17	8,59	0,25	16,26	2,66
18	8,53	0,24	16,13	2,57
19	8,45	0,25	15,45	2,59
20	8,38	0,24	15,16	2,59
21	8,27	0,28	14,80	2,58
22	8,16	0,27	14,28	2,58
23	8,02	0,29	13,63	2,62
24	7,86	0,33	13,11	2,62

Os resultados apresentados na Tabela 5.6 estão representados pelas curvas da Figura 5.6, que descrevem o comportamento característico das fermentações em batelada.

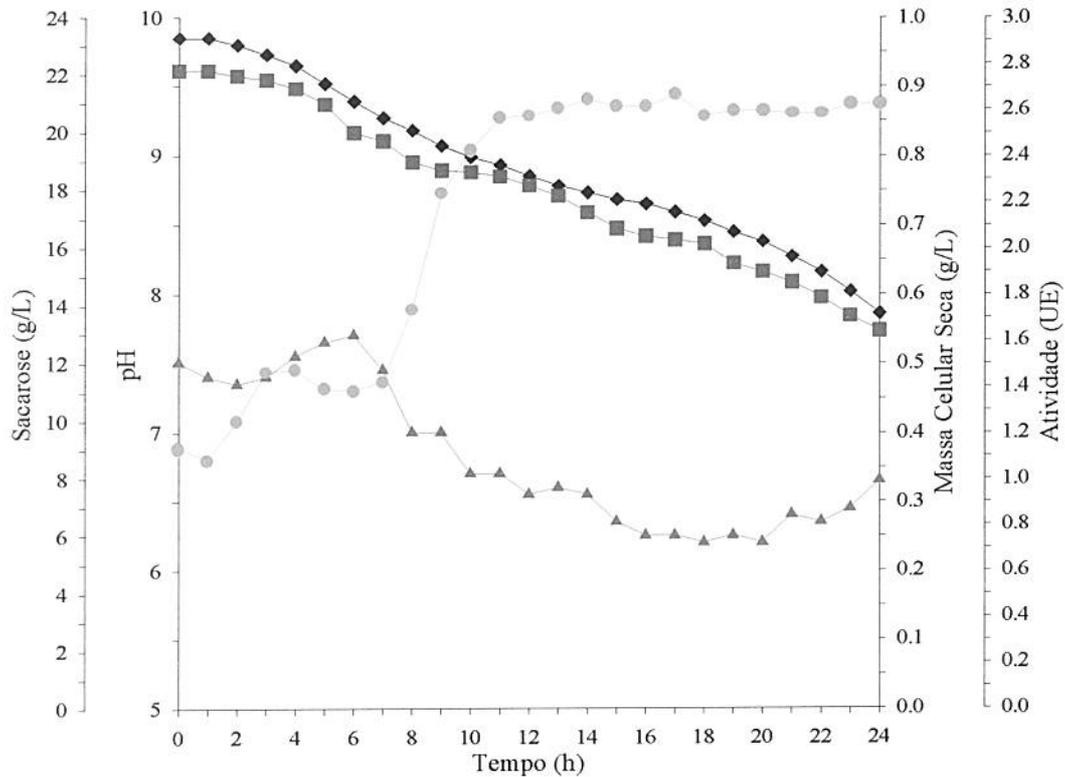


Figura 5.6: Valores de pH (◆), massa celular seca (▲), concentração de sacarose (■) e atividade (●) na produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 em fermentação tipo batelada sem aeração em fermentador de bancada

As curvas da Figura 5.6 mostram ao longo do tempo de fermentação, que o valor final da concentração de sacarose foi $13,11 \text{ g.L}^{-1}$, ou seja, consumo de $9,02 \text{ g.L}^{-1}$. O pH variou de 9,85 a 7,86, sendo que este valor final não atingiu o esperado, em nível ácido, característico deste tipo de fermentação em frascos de Erlenmeyer. A produção de massa celular seca manteve-se em valores baixos entre $0,20$ a $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ e a atividade de enterocina manteve-se aproximadamente constante após 11h de fermentação, com valor de 2,56UE.

5.2.1.2- Fermentação com aeração

Nessa condição, a fermentação ocorreu durante período de 24h com aeração de 1,5 VVM, sendo as amostras retiradas em intervalos de 1 e 2h, com os valores de pH, massa celular seca, concentração de substrato e atividade mostrados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7: Valores de pH, massa celular seca (MCS), concentração de sacarose (S) e atividade (UE) na produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 em fermentação tipo batelada com aeração em fermentador de bancada

Tempo (h)	pH	MCS (g.L ⁻¹)	S (g.L ⁻¹)	UE
0	9,78	0,49	21,84	0,97
2	9,70	0,44	21,84	0,99
4	9,61	0,51	21,22	1,02
6	9,38	0,50	20,88	1,03
8	9,10	0,43	20,14	1,04
10	8,86	0,45	19,74	1,15
11	8,76	0,43	19,68	1,17
12	8,74	0,37	19,68	1,36
13	8,68	0,34	18,83	1,41
14	8,33	0,45	18,60	0,88
15	7,44	1,93	18,26	0,87
16	7,13	3,65	18,15	0,74
18	6,75	5,32	14,90	0,73
20	6,46	7,46	11,60	0,72
22	6,00	10,75	7,17	0,61
24	5,33	10,70	2,90	0,49

As curvas da Figura 5.7 apresentam os resultados da Tabela 5.7, as quais descrevem comportamento característico.

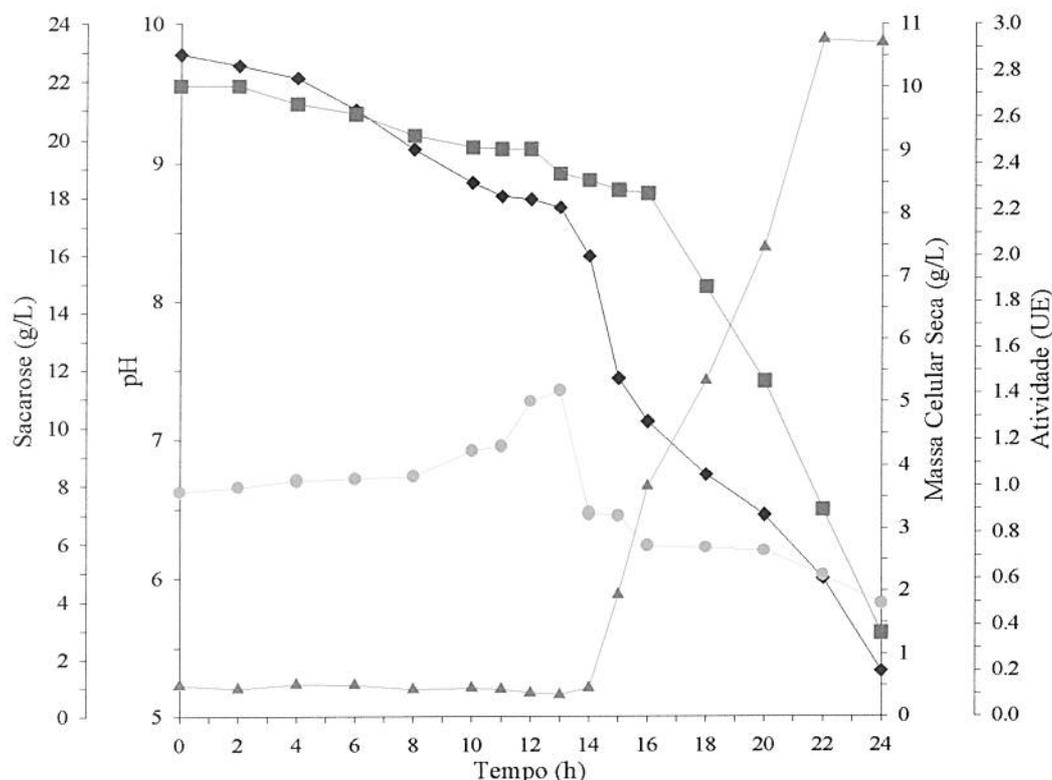


Figura 5.7: Valores de pH (◆), massa celular seca (▲), concentração de sacarose (■) e atividade (●) na produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 em fermentação tipo batelada com aeração em fermentador de bancada

As curvas da Figura 5.7 mostram que ao longo do tempo de fermentação houve alto consumo de sacarose ($18,94\text{g.L}^{-1}$), cuja concentração final alcançou $2,90\text{g.L}^{-1}$; o pH variou de 9,78 a 5,33, atingindo assim o valor esperado para este tipo de fermentação; a produção de massa celular seca até as 14h manteve-se em valores próximos ao inicial, a partir deste ponto, aumentou até alcançar a concentração de $10,70\text{g.L}^{-1}$ em 24h e a atividade de enterocina mostrou pequeno aumento em relação ao valor inicial em 13h, atingindo 1,41UE, diminuiu a partir deste tempo até 0,49UE no final das 24h de fermentação.

Comparando os valores de atividade de enterocina apresentados nas Figuras 5.6 e 5.7, conclui-se que nas condições experimentais usadas a fermentação com aeração, para a produção de enterocina, não é de grande interesse, devido aos baixos valores de atividade obtidos em relação à fermentação sem aeração.

5.2.2- Influência da aeração e alimentação em fermentação tipo batelada alimentada

Com base nos resultados obtidos nos itens 5.2.1 e 5.2.2, realizou-se uma fermentação com aeração (1,5 VVM), até o tempo de 20h, em meio basal já definido, com a finalidade de aumentar a massa celular. A partir desse instante, cessou-se a aeração, o fermentador foi alimentado com o mesmo meio, e a fermentação transcorreu por mais 12h.

Na Tabela 5.8 são apresentados os resultados da fermentação em batelada alimentada, em termos de pH, massa celular seca, concentração de sacarose e atividade de enterocina.

Tabela 5.8: Valores de pH, massa celular seca (MCS), concentração de sacarose (S) e atividade (UE) na produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 em fermentação tipo batelada alimentada

Tempo (h)	pH	MCS (g.L ⁻¹)	S (g.L ⁻¹)	UE
0	9,96	0,36	21,92	0,78
2	9,83	0,35	21,63	0,92
4	9,49	0,53	20,93	0,92
20	5,69	2,35	13,80	1,24
21	8,10	1,14	17,01	1,39
22	7,66	1,30	17,01	1,42
24	6,90	1,36	16,78	1,45
26	6,30	1,47	15,43	1,62
28	5,67	1,47	14,44	1,86
30	5,32	1,50	13,33	2,21
32	5,24	1,56	12,57	2,28

A Figura 5.8 apresenta os resultados da Tabela 5.8.

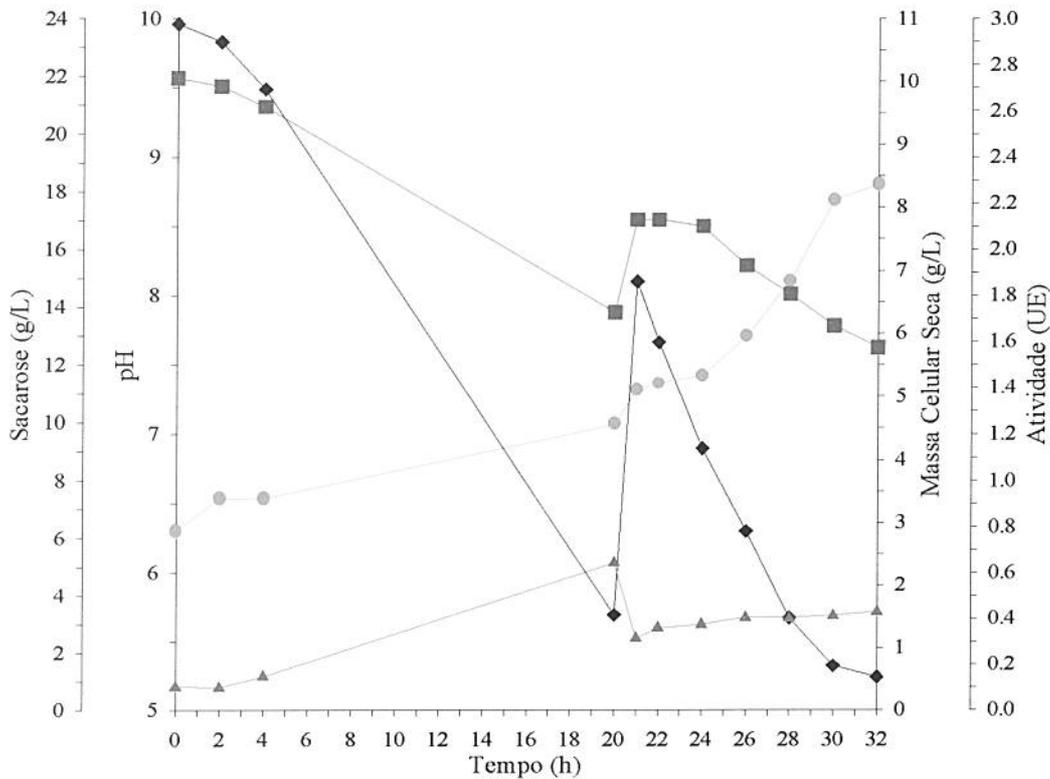


Figura 5.8: Valores de pH (◆), massa celular seca (▲), concentração de sacarose (■) e atividade (●) na produção de enterocina por *Enterococcus faecium* CCT5079 em fermentação tipo batelada alimentada

Na Tabela 5.8 e na Figura 5.8, observa-se que o comportamento das curvas até 20h segue as características da fermentação em batelada com aeração (item 5.2.2); após este tempo, ocorreu uma diluição em relação à massa celular seca devido à alimentação do fermentador. Neste mesmo ponto, cessou-se a aeração a fim de induzir um aumento na produção de enterocina devido ao grande número de células presentes no meio. A partir deste instante, a fermentação ocorreu conforme suas características sem aeração (item 5.2.1), atingindo valores de pH_{final} 5,24, massa celular seca de $1,56 \text{ g.L}^{-1}$, concentração final de sacarose de $12,57 \text{ g.L}^{-1}$ e atividade de enterocina de 2,28UE.

Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho com os de alguns autores citados nas referências, que utilizaram metodologias de análises (unidades) diferentes, pode-se dizer que, nos trabalhos de Parente e Hill (1992-a) utilizando o *E. faecium* como microrganismo produtor e *Listeria innocua* como microrganismo teste, à mesma temperatura e uma pequena diferença nas concentrações dos compostos do meio, porém com pH 6,75, conseguiram respostas consideradas boas para atividade de enterocina com valor de 1408 BU.mL⁻¹. Para Parente e Ricciardi (1994) em fermentador de bancada acrescentando caseína hidrolisada na composição do meio, em fermentações a diferentes pH obtiveram a atividade máxima de 1,96 MBU.L⁻¹, após 7h de fermentação em pH 5,5. Parente *et al.* (1997) também em fermentador de bancada, substituindo a triptona da composição do meio por peptona de soja neutralizada, analisando a influência da concentração de glicose, obtiveram a máxima atividade de 2,8 MBU.L⁻¹, com concentração inicial de 20g.L⁻¹, diminuindo no final da fermentação. Já autores como Franz *et al.* (1996) obtiveram a melhor atividade (6400 AU.mL⁻¹) utilizando como microrganismo teste o *Lactobacillus sake*, o caldo MRS como meio de crescimento e temperatura de 30°C.

5.3- ESTABILIDADE DE ENTEROCINA QUANTO À CONSERVAÇÃO

5.3.1- Efeito do congelamento

Após submeter a enterocina ao congelamento em “freezer” (-20°C), as amostras foram analisadas com relação à sua atividade, para a avaliação do tempo de conservação. Os valores obtidos estão mostrados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9: Valores de atividade de enterocina (UE) produzida por *Enterococcus faecium* CCT5079 sob congelamento (-20°C)

Tempo de congelamento (dias)	Atividade(EU)
0	2,63
7	2,54
14	2,58
62	2,57

Através dos resultados da Tabela 5.9, observa-se que o tempo de congelamento até 62 dias mantém as características da enterocina, com relação a atividade, podendo então ser mantida sob congelamento.

5.3.2- Efeito da temperatura de pré-incubação

A enterocina foi submetida a diferentes temperaturas para avaliação de sua resistência térmica, através da análise de sua atividade. Os valores obtidos estão mostrados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10: Valores de atividade de enterocina (UE) produzida por *Enterococcus faecium* CCT5079 relacionados às diferentes temperaturas de pré-incubação

Tempo (min)	Atividade (UE)					
	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C
0	2,56	2,56	2,56	2,56	2,56	2,56
15	--	--	--	2,56	2,21	2,01
20	--	2,69	2,50	--	--	--
30	2,54	--	--	2,58	1,95	1,86
40	--	2,80	2,55	--	--	--
45	--	--	--	2,60	1,49	1,22
60	2,75	2,85	2,58	2,60	1,26	0,81
75	--	--	--	2,35	1,24	0,70
80	--	2,86	2,58	--	--	--
90	2,80	--	--	2,34	1,16	0,62
100	--	2,87	2,60	--	--	--
105	--	--	--	2,27	0,99	0,51
120	2,89	2,96	2,61	2,26	0,90	0,47
135	--	--	--	2,05	0,84	0,33
140	--	2,98	2,69	--	--	--
150	2,90	--	--	2,05	0,71	0,28
160	--	3,00	2,81	--	--	--
165	--	--	--	2,00	0,55	0,22
180	2,96	3,02	2,93	1,97	0,29	0,13

Os resultados apresentados na Tabela 5.10 e representados na Figura 5.9, mostram que as temperaturas de pré-incubação de 40 a 60°C induziram o aumento da atividade de

enterocina. Da mesma forma, observa-se que para a temperatura de 70°C a atividade teve um pequeno aumento até 60 min, praticamente desprezível, caindo lentamente após este tempo. No entanto, para as temperaturas de 80 e 90°C a atividade teve uma queda brusca, atingindo valores finais próximos a 0,2UE.

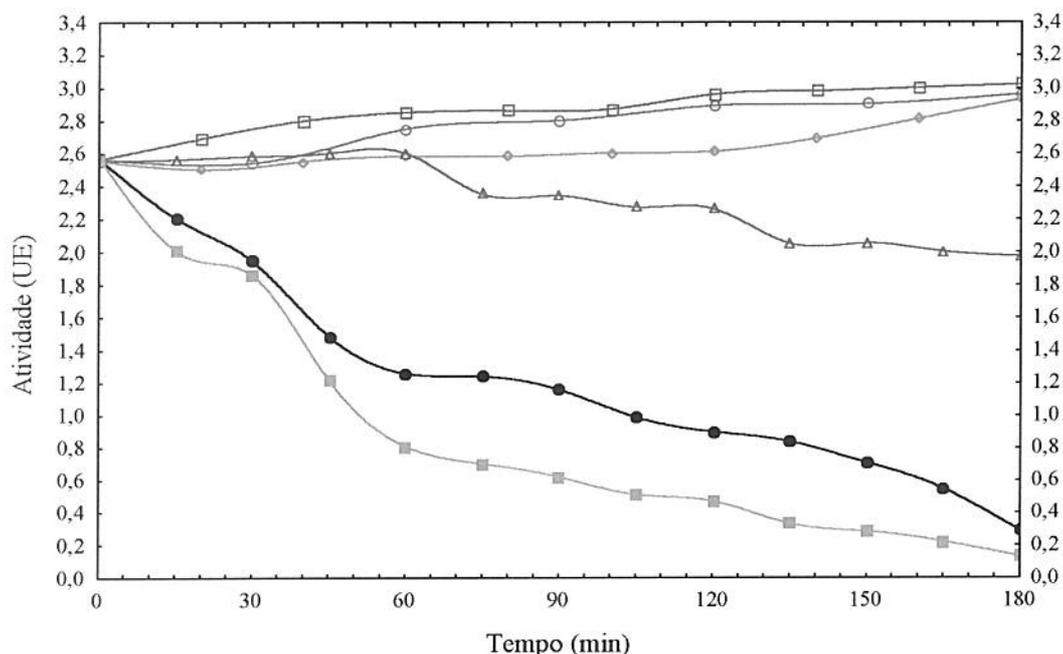


Figura 5.9: Valores de atividade de enterocina (UE) produzida por *Enterococcus faecium* CCT5079 relacionados às diferentes temperaturas de pré-incubação: 40°C (○), 50°C (□), 60°C (◇), 70°C (△), 80°C (●) e 90°C (■)

Franz *et al.* (1996) estudaram a ação de enzimas como α -quimotripsina, tripsina, pepsina, papaína, proteinase K, α -amilase, lipase, catalase e lisozina, sobre enterocina de *Enterococcus faecium* BFE900 e observaram que, as cinco primeiras inibiram a atividade da enterocina, enquanto que, as demais enzimas não afetaram sua atividade, mostrando que a enterocina é de natureza protéica. Quanto à estabilidade térmica da enterocina, observaram que não houve perda de atividade quando o sobrenadante da cultura foi mantido a 100°C por 20min, porém, quando tratado a 121°C por 15min houve redução de 89% da atividade, mostrando que esta enterocina é termoestável, diferindo da enterocina de *Enterococcus*

faecium DPC1146, que é parcialmente ou totalmente inativada em temperaturas acima de 60°C (Parente e Hill, 1992-b).

Com base nos valores de atividade relacionados à temperatura de pré-incubação de 80°C, determinou-se, a partir da Equação 4.1, o tempo de meia vida para a enterocina, sendo seu valor de 78,77 min.

6- CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- para a fermentação em batelada em frascos de Erlenmeyer, os melhores resultados para a atividade de enterocina foram obtidos utilizando o *E. faecium* CCT5079 como microrganismo produtor e o meio basal com a seguinte composição (g.L^{-1}): glicose e/ou sacarose 20,0; triptona 10,0; extrato de levedura 7,5; KH_2PO_4 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,05 e Tween 80 2,0, temperatura de incubação de 37°C e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0;
- com relação à fermentação em batelada convencional em fermentador de bancada, utilizando-se as melhores condições definidas nas fermentações em frascos de Erlenmeyer, a atividade máxima atingida foi de 2,56UE em fermentação anaeróbia, obtida em 11h que, manteve-se constante até o final da fermentação;
- com relação à fermentação em batelada alimentada não ocorreu aumento da produção de enterocina como esperado;
- quando congelada até 62 dias a enterocina manteve sua atividade inicial;
- temperaturas de pré-incubação de até 60°C induziram ao aumento da atividade de enterocina, enquanto que, temperaturas acima de 70°C provocam a perda de atividade;
- o tempo de meia vida calculado para a temperatura de 80°C foi de 78,77 min.

7- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- realizar fermentações convencionais em fermentador de bancada mantendo o pH constante;

- investigar processos de purificação para obtenção de enterocina pura;

- testar, para a atividade de enterocina, outros microrganismos teste, como o *Clostridium botulinum*.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ATKINSON, B. **Biochemical reactors**. Pion Limited. London, 1984. 267p.
- 2- AYMERICH, T.; HOLO, H.; HAVARSTEIN, L. S.; HUGAS, M.; GARRIGA, M.; NES, I. F. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.5, p.1676-1682, **May**, 1996.
- 3- BARNBY-SMITH, F. M. Bacteriocins: applications in food preservation. **Trends in Food Science & Technology**, v.3, n.6, p.133-137, **June**, 1992.
- 4- BERRIDGE, N. J.; BARRET, J. A rapid method for the turbidimetric assay of antibiotics. **Journal General of Microbiology**, 6, p.14-20, 1952.
- 5- BIERBAUM, G.; REIS, M.; SZEKAT, C.; SAHL, H. G. Construction of an expression system for engineering of the lantibiotic Pep5. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.12, p.4332-4338, **Dec.**, 1994.
- 6- BRÖTZ, H.; BIERBAUM, G.; LEOPOLD, K.; REYNOLDS, P. E.; SAHL, H. G. The lantibiotic inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.1, p.154-160, **Jan.**, 1998.

- 7- CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; HAVARSTEIN, L. S.; HERNANDEZ, P. E.; NES, I. F.
Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.11, p.4321-4330, Nov., 1997.
- 8- CINTAS, L. M.; RODRIGUEZ, J. M.; FERNANDEZ, M. F.; SLETTEN, K.; NES, I. F.; HERNANDEZ, P. E.; HOLO, H. Isolation and characterization of pediocin-L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.7, p.2643-2648, July, 1995.
- 9- COMISSÃO INTERNACIONAL PARA ESPECIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS DOS ALIMENTOS (ICMSF). APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos: Análises de perigos e pontos críticos de controle para garantir a qualidade e a segurança microbiológica de alimentos, p.7-8, Varela, SP. 1997.
- 10- FOGARTY, W. M.; WARD, O. P. **Pectinases and pectic polysaccharides**. In: HOCKENHULL, D. J. D. (ed.) **Progress in industrial microbiology**. London: Churchill Livingstone, 1974. v.13, p.59-119.
- 11- FRANZ, C. M. A. P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, n.2/3, p.255-270, 1996.

- 12- GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; TARELLI, G. T. Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 7C5. **Journal of Food Protection**, v.58, n.6, p.621-623, **June**, 1995.
- 13- GUTIERREZ-ROJAS, M.; FAVELA-TORRES, E. Curso de fermentaciones en medio solido. **Biotecnologia para el aprovechamiento de residuos agroindustriales y municipales**. Jaguariuna: EMBRAPA, 1992. 80p. (Apostila do curso).
- 14- GUTOWSKI-ECKEL, Z.; KLEIN, C.; SIEGERS, K.; BOHM, K.; HAMMELMANN, M.; ENTIAN, K. D. Growth phase-dependent regulation and membrane localization of SpaB, a protein involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.1, p.1-11, **Jan.**, 1994.
- 15- KLEIN, C.; KALETTA, C.; SCHNELL, N.; ENTIAN, K. D. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.1, p.132-142, **Jan.**, 1992.
- 16- LYON, W. J.; OLSON, D. G.; MURANO, E. A. Isolation and purification of enterocin EL1, a bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecium*. **Journal of Food Protection**, v.58, n.8, p.890-898, **Aug.**, 1995.

- 17- OLASUPO, N. A.; SCHILLINGER, U.; FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from 'wara' - a fermented skimmed cow milk product from West Africa. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, n.6, p.438-441, 1994.
- 18- ORIOL, E.; SCHETTINO, B.; VINIEGRA-GONZALES, G.; RAIMBAULT, M. Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. **Journal of Fermentation Technology**, v.66, n.1, p.57-62, **Feb.**, 1988.
- 19- PARENTE, E.; BRIENZA, C.; RICCIARDI, A.; ADDARIO, G. Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, n.1, p.62-67, 1997.
- 20- PARENTE, E. e RICCIARDI, A. Influence of pH on the production of enterocin-1146 during batch fermentation. **Letters in Applied microbiology**, v.19, n.1, p.12-15, 1994.
- 21- PARENTE, E. e HILL, C. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v.73, n.4, p.290-298, 1992-a.
- 22- PARENTE, E. e HILL, C. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.55, n.7, p.497-502, **July**, 1992-b.

- 23- REGULY, J. C. **Biotechnologia dos Processos Fermentativos**. Pelotas: Editora Universitária-UFPeL, 1996. V.1, 344p.
- 24- REIS, M.; ESCHBACH-BLUDAU, M.; IGLESIAS-WIND, M.I.; KUPKE, T.; SAHL, H.G. Producer immunity towards the lantibiotic Pep5: identification of the immunity gene pepI and localization and functional analysis of its gene product. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.8, p.2876-2883, Aug. 1994.
- 25- SAHL, H. G.; JACK, R. W.; BIERBAUM, G. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. **European Journal of Biochemistry**, v.230, n.3, p.827-853, 1995.
- 26- SCHILLINGER, U.; STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. **International-Journal-of-Food-Microbiology**, v.20, n.3, p.131-147, 1993.
- 27- TARELLI, G. T.; CARMINATI, D.; GIRAFFA, G. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. **Food Microbiology**, v.11, n.3, p.243-252, 1994.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

