

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE BIOPROTETORES PARA
O CONTROLE DE CONTAMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS
DO PROCESSO SUCRO-ALCOOLEIRO**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Mark Alexandrow Franchi**, aprovado pela Comissão Julgadora em 10 de maio de 2002.

Mark Alexandrow Franchi
Farmacêutico

Prof. Dr. Marcelo Cristianini
Orientador

Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
Coorientador

Campinas, 10 de maio de 2002

Prof. Dr. Marcelo Cristianini
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

Campinas – SP
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
F846a
EX
OMBO BC/ 49734
ROC 16-837102
DX
REÇO R\$ 11,00
ATA 18/06/02
CPD

CM00169260-5

B ID 245768

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

F846a Franchi, Mark Alexandrow
Avaliação da utilização de bioprotetores para o controle de
contaminações microbiológicas do processo sucro-alcooleiro /
Mark Alexandrow Franchi. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

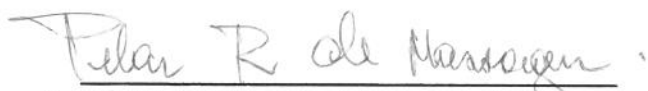
Orientador: Marcelo Cristianini
Co-orientador: Gil Eduardo Serra
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Bactérias lácticas. 2.Nisina. 3.Lisozima. 4.Fermentação
alcoólica. I.Cristianini, Marcelo. II.Serra, Gil Eduardo.
III.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. IV.Título.

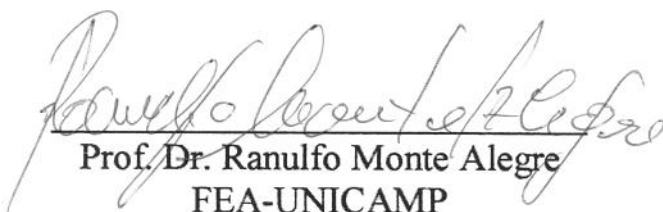
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcelo Cristianini
Orientador
FEA-UNICAMP



Prof.ª Dr.ª Pilar Rodriguez de Massaguer
FEA-UNICAMP



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
FEA-UNICAMP

Prof.ª Dr.ª Adilma R. Pippa Scamparini
FEA-UNICAMP

AGRADECIMENTOS

- À minha mulher Márcia e minha filha Veronica pelo amor e apoio incondicionais.
- Ao Prof. Marcelo Cristianini pela orientação, apoio, incentivo e profissionalismo.
- Ao bom amigo Marcelo Cristianini pela receptividade, compreensão e bom humor.
- Ao Prof. Gil Serra pela coorientação, confiança e incentivo e pelo empenho para a realização do trabalho.
- Aos meus pais e avó pelo apoio, incentivo e compreensão.
- À Ana Lourdes, Ana Maria, Judite e Rosa pela prontidão em ajudar e colaboração.
- Ao estagiário Johannes Svilossen pela ajuda, interesse e disponibilidade.
- Aos colegas do laboratório sempre prestativos e francos.

SUMÁRIO

RESUMO	xvii
SUMMARY	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo Geral	5
2.2 Objetivos Específicos	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 Fermentação alcoólica de cana de açúcar	6
3.2 Contaminação Microbiológica do Processo Sucro-Alcooleiro.	9
3.3 Floculação no Processo de Fermentação Alcoólica.	12
3.4 Uso de antibióticos no controle de contaminações microbianas	14
3.5 Resistência a antimicrobianos	16
3.6 Bioprotetores e mecanismos de ação	18
3.7 Tratamento térmico	29
3.8 Método da Concentração Mínima Inibitória e Alternativas	32
4 ESTUDO 1 - Determinação de Concentração Inibitória Mínima (Mic) e Estudo de Cinética Fermentativa.	34
1 Introdução	35
2 Objetivos	37
3 Material e Métodos	37
3.1 Microrganismos	38
3.2 Bioprotetores e Potencializadores	39
3.3 Meios de Cultura	39
3.4 Curva de cinética de crescimento das bactérias	39
3.5 Concentração Inibitória Mínima (MIC)	40
3.6 Medida de MIC dos Bioprotetores Sobre o Fermento (<i>S. cerevisiae</i>)	40
3.7 Cinética Fermentativa Frente aos Bioprotetores	41
4 Resultados e Discussão	43
4.1 Cinética de Crescimento Bacteriano	43
4.2 Concentração Inibitória Mínima dos Bioprotetores Sobre as Bactérias Contaminantes	44
4.3 Determinação de MIC de leveduras	49
4.4 Cinética da Fermentação Alcoólica	50
5 Conclusões	57
6 Bibliografia	58
5 ESTUDO 2 - Otimização da Combinação de Bioprotetores Sobre Bactérias Contaminantes da Fermentação Alcoólica.	61
1 Introdução	62
2 Objetivo	63
3 Materiais e métodos	63
3.1 Microrganismos	64
3.2 Bioprotetores	64
3.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC)	64
3.4 Estudo da Cinética de Crescimento das Bactérias Frente aos Bioprotetores	65
4 Resultados e Discussão	68
4.1 Análise dos resultados de <i>L. plantarum</i> .	73
4.2 Análise dos resultados de <i>L. fermentum</i> .	79
4.3 Validação dos modelos	86
5 Conclusões	86
6 Bibliografia	87

6	ESTUDO 3 - Determinação dos Parâmetros de Destruição Térmica de Bactérias Contaminantes do Processo Sucro-Alcooleiro e Influência do Uso de Bioprotetores na Resistência Térmica dos Contaminantes da Fermentação	90
1	Introdução	91
1.1	Bioprotetores	92
2	Objetivos	94
3	Material e métodos	95
3.1	Microrganismos	95
3.2	Bioprotetores	95
3.3	Tratamento Térmico	96
3.4	Clarificação do Caldo de Cana	96
3.5	Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Destruição dos Contaminantes	96
3.6	Influência dos Bioprotetores na Resistência Térmica	97
4	Resultados e Discussão	97
4.1	Determinação do parâmetro de morte térmica D e escolha do microrganismo alvo.	97
4.2	Determinação do parâmetro de temperatura Z do <i>L. fermentum</i>	102
4.3	Estudo do parâmetro de destruição térmica D na presença de bioprotetores	103
5	Conclusões	104
6	Bibliografia	105
7	CONCLUSÕES GERAIS	109
8	BIBLIOGRAFIA	111

Lista de Tabelas

ESTUDO 1 - Determinação de Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Estudo de Cinética Fermentativa

Tabela 1: Linhagens testadas e suas características de floculação e produção de dextrana.	38
Tabela 2: Bioprotetores testados, espectro de ação e princípios ativos.	39
Tabela 3: Composição do meio de fermentação (ANDRIETTA, 1995).	39
Tabela 4: Susceptibilidade dos microrganismos aos bioprotetores.	44
Tabela 5a: MIC para inóculo 1%, leituras às 24 e 48 horas de incubação.	45
Tabela 5b: MIC para inóculo 0,3%, 18 horas de incubação.	45
Tabela 6: MIC para nisina (ppm de Novasin).	46
Tabela 7: MIC para nisina + EDTA (1ppm para 1mMol).	47
Tabela 8 MIC para Nisina + Lisozima (1 para 3).	48
Tabela 9: Resultados de MIC para Nisina + Tween 20 (0,1%).	48
Tabela 10: MIC para lisozima em altas concentrações.	49
Tabela 11: Valores de MIC para bioprotetores contra levedura.	50
Tabela 12a: Resultados de velocidade máxima de produção de etanol para levedura Cle álcool.	54
Tabela 12b: Teste de Tuckey ($p < 0,05$) para médias de $p_{máx}$ de etanol para Cle álcool.	54
Tabela 13a: Resultados de $p_{máx}$ de etanol por levedura comercial.	55
Tabela 13b: Teste de Tuckey ($p < 0,05$) para médias de $p_{máx}$ de etanol por Cle álcool.	56
Tabela 14a: Resultados de velocidade máxima de produção de etanol por levedura comercial sob efeito de combinação de bioprotetores.	56
Tabela 14b: Teste de Tuckey ($p < 0,05$) para médias de produção máxima de etanol por levedura comercial sob efeito da combinação de bioprotetores.	57

ESTUDO 2 - Otimização da Combinação de Bioprotetores Sobre Bactérias Contaminantes da Fermentação Alcoólica.

Tabela 1: Níveis das variáveis independentes	67
Tabela 2: Resultados de MIC para nisina expressos em ppm de Novasin.	69
Tabela 3: Resultados de MIC para lisozima	70
Tabela 4: Resultados de tempo de fase lag e taxa máxima de crescimento de <i>L. plantarum</i>	73
Tabela 5: Análise dos efeitos dos bioprotetores sobre tempo de fase lag do <i>L. plantarum</i> .	74
Tabela 6: Análise dos efeitos dos bioprotetores sobre tempo da taxa máxima de crescimento de <i>L. plantarum</i> .	75
Tabela 7: ANOVA <i>L. plantarum</i> - tempo de lag	75
Tabela 8: Desvios entre tempos de lag estimados e medidos para <i>L. plantarum</i> .	76
Tabela 9: Resultados de tempo de fase lag e taxa máxima de crescimento de <i>L. fermentum</i> .	79
Tabela 10: Análise dos efeitos dos bioprotetores sobre tempo de fase lag de <i>L. fermentum</i> .	80
Tabela 11: Análise dos efeitos dos bioprotetores sobre a taxa máxima de crescimento de <i>L. fermentum</i> .	81
Tabela 12: ANOVA para <i>L. fermentum</i> – tempo de lag.	82
Tabela 13: ANOVA para <i>L. fermentum</i> – taxa máxima de crescimento.	83
Tabela 14: Desvios entre tempos de lag estimados e medidos para <i>L. fermentum</i> .	83

ESTUDO 3 - Determinação dos Parâmetros de Destruição Térmica de Bactérias Contaminantes do Processo Sucro-Alcooleiro e Influência do Uso de Bioprotetores na Resistência Térmica dos Contaminantes da Fermentação

Tabela 1- Valores de D a 60°C para bactérias contaminantes em caldo clarificado.	99
--	----

Lista de Figuras

ESTUDO 1 - Determinação de Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Estudo de Cinética Fermentativa

Figura 1: Curvas de crescimento bacteriano	43
Figura 2: Produção de etanol com e sem adição de bioprotetores.	51
Figura 3: Evolução de CO ₂ e ajuste de função sigmoidal para exp. com 180 ppm de nisina.	52
Figura 4: Gráfico da derivada e ponto de mínimo.	53

ESTUDO 2 - Otimização da Combinação de Bioprotetores Sobre Bactérias Contaminantes da Fermentação Alcoólica.

Figura 1: Valores de contagem de ufc do <i>L. fermentum</i> em função da densidade ótica	68
Figura 2: Valores de contagem de ufc do <i>L. plantarum</i> em função da densidade ótica da cultura	68
Figura 3: Curva de crescimento de <i>L. fermentum</i> em presença de 10 ppm de nisina	71
Figura 4: Derivada da função sigmoidal adaptada e ponto de máximo	72
Figura 5: Valores estimados pelo modelo e observados para tempo de fase lag de <i>L. plantarum</i> .	77
Figura 6: Superfície de resposta para tempo da fase lag de <i>L. plantarum</i> em função das concentrações de nisina e lisozima (0,1% de Tween 20).	78
Figura 7: Curvas de nível para tempo da fase lag de <i>L. plantarum</i> em função das concentrações de nisina e lisozima (0,1% de Tween 20).	78
Figura 8: Valores estimados pelo modelo e medidos para tempo de fase lag de <i>L. fermentum</i> .	84
Figura 9: Superfície de resposta para tempo da fase lag de <i>L. fermentum</i> em função das concentrações de nisina e Tween 20.	85
Figura 10: Curvas de contorno para tempo da fase lag de <i>L. fermentum</i> em função das concentrações de nisina e Tween 20.	85

ESTUDO 3 - Determinação dos Parâmetros de Destruição Térmica de Bactérias Contaminantes do Processo Sucro-Alcooleiro e Influência do Uso de Bioprotetores na Resistência Térmica dos Contaminantes da Fermentação

Figura 1- Curva de sobreviventes <i>L. plantarum</i> a 60°C	98
Figura 2- Curva de sobreviventes <i>L. fermentum</i> a 60°C em caldo de cana-de-açúcar clarificado	98
Figura 3- Curva de sobreviventes <i>Lc. mesenteroides</i> a 60°C em caldo de cana-de-açúcar clarificado	99
Figura 4 – Curva fantasma de Destruição térmica de <i>L. fermentum</i> em caldo de cana-de-açúcar clarificado	102
Figura 5- Curva dos sobreviventes de <i>L. fermentum</i> a 60°C em presença de bioprotetores.	103

Lista de Abreviaturas

∇	gradiente	MBC	Concentração Bactericida Mínima
λ	tempo de fase lag	MIC	Concentração Inibitória Mínima
μ	micro (10 ⁻⁶)	min	minutos
μ _{máx}	taxa máxima de crescimento	Mol	molar
°B	graus Brix	MRS	meio de Man Rogosa Sharpe
°C	graus Celsius	N	população de viáveis
AR	açúcares redutores	N ₀	população inicial
ART	açúcares redutores totais	Ni	nisina ou Novasin
CCT	Coleção de Culturas Tropical	p	significância estatística
CIP	Clean in place	p/p	peso por peso
CLE	cepa de levedura	PA	para análise
CV	coeficiente de variancia	pmáx	taxa máxima de produção
D	tempo de morte térmica	ppm	partes por milhão
DO	densidade ótica	R ²	% de variação explicada
EDTA	ácido diaminotetracético	rpm	rotações por minuto
exp.	experimento	s	segundos
F	teste F	T	temperatura
F _{tab}	F tabelado	t	tempo
g	gramas	t	teste t
h	horas	ton	tonelada métrica
k	kilo (10 ³)	UA	unidades aleatórias
L	litros	uAbs	unidades de absorbância
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>	ufc	unidades formadoras de colônias
<i>L., Lc.</i>	<i>Leuconostoc</i>	UI	unidades internacionais
Li	lisozima ou Novagard	v/v	volume por volume
m	mili (10 ⁻³)	Z	parâmetro de temperatura
M	molar		

RESUMO

Foi testada a ação dos bioprotetores nisina (Novasin), lisozima (Novagard), e Microgard 400 (produto comercial obtido de fermentação de bactérias lácticas) sobre bactérias contaminantes da indústria suco-alcooleira e sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizou-se o método de concentração mínima inibitória (MIC) em meio líquido. *Lactobacillus fermentum* apresentou o valor de MIC de $9,0 \pm 1,7$ ppm de nisina. A adição de 1mM de EDTA por ppm de Novasin resultou na redução do valor de MIC para $3,6 \pm 0,6$ ppm. *Lactobacillus plantarum* foi mais resistente à combinação nisina e EDTA. O *Leuconostoc mesenteroides* apresentou um MIC de $83,3 \pm 5,8$ ppm para nisina. A lisozima foi efetiva na inibição de *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum* em concentrações próximas a 1000 ppm, mas apresentou-se ineficaz contra *L. fermentum*. Microgard não foi eficaz contra os microrganismos testados. O *Saccharomyces cerevisiae* não foi inibido pela nisina à concentrações de até 90 ppm mesmo com adição de EDTA, lisozima ou Tween 20.

A cinética de produção de álcool por leveduras comerciais e cultura de usina de *Saccharomyces cerevisiae* foi medida pela quantificação da perda de gás carbônico durante o processo. Obtiveram-se os valores das máximas produções de álcool ($p_{\text{máx}}$). As médias de $p_{\text{máx}}$ foram submetidas ao teste de Tuckey. Não houve influência sobre as velocidades máximas de produção de etanol pela adição de bioprotetores.

Um planejamento fatorial completo 2^4 foi utilizado para otimizar as concentrações de dosagem dos bioprotetores e potencializadores contra *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*. As variáveis dependentes foram o tempo de fase lag (tempo necessário para aumento de $0,1 \text{ uAbs} - 10^7 \text{ ufc}$) e taxa máxima de crescimento. Modelos matemáticos foram obtidos para o tempo de fase lag para ambos os microrganismos. Não houve diminuição das taxas máximas de crescimento pelos bioprotetores exceto um pequeno efeito de nisina sobre *L. fermentum*. Nisina foi eficaz para prolongar a fase lag de ambos os microrganismos e observou-se sinergismo com lisozima para *L. plantarum* e com Tween 20 para *L. fermentum*. EDTA foi antagônico à nisina. As concentrações de uso para a fermentação alcoólica foram determinadas em 10 ppm de Novasin, 30 ppm de Novagard e 0,1% de Tween 20.

O parâmetro de destruição térmica $D_{60^{\circ}\text{C}}$ (tempo de morte térmica), das bactérias estudadas foi determinado em caldo de cana clarificado obtendo-se os seguintes resultados: *Lactobacillus fermentum* (0,75 min), *Lactobacillus plantarum* (0,29 min), *Leuconostoc mesenteroides* (1,57 min). Não foi possível medir o parâmetro D para *L. confusus* que se apresentou demasiadamente sensível ao tratamento. A bactéria *L. fermentum* foi escolhida como alvo dos estudos de morte térmica dentre os microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica. O parâmetro Z (parâmetro de temperatura) foi determinado: $7,7^{\circ}\text{C}$. A adição da combinação otimizada de bioprotetores ao caldo clarificado resultou na redução de $D_{60^{\circ}\text{C}}$ em 16,7%. Foi verificada a ação sinérgica do tratamento térmico combinado à ação dos bioprotetores sobre *L. fermentum*.

SUMMARY

The inhibition by bioprotectants, nisin (Novasin), lysozyme (Novagard), and Microgard 400 (commercial product obtained by lactic fermentation), was tested over contaminant bacteria and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) from ethanol distilleries and sugar mills. The method used was the minimum inhibitory concentration test (MIC) in broth. *Lactobacillus fermentum* showed a MIC value of $9,0 \pm 1,7$ ppm of nisin. 1mM of EDTA addition per ppm of Novasin resulted on a reduction of MIC value to $3,6 \pm 0,6$ ppm. *Lactobacillus plantarum* showed to be the most resistant to the nisin-EDTA combination. The *Leuconostoc mesenteroides* MIC results were $83,3 \pm 5,8$ ppm of nisin. Lysozyme inhibited *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* at concentrations as high as 1000 ppm, but presented no effect on *L. fermentum*. Microgard was ineffective on all tested strains. *Saccharomyces cerevisiae* was not inhibited by nisin at levels up to 90 ppm even with de addition of EDTA, lysozyme and Tween 20.

The ethanol production kinetics of fermentation by commercial and cultured yeast was measured by CO₂ mass balance. The average values of the maximum alcohol production rate were statistically tested (Tuckey test). There was no significant influence of bioprotectant addition on fermentation kinetics.

A complete factorial design (2^4) was used to study effects and optimize the concentrations use of bioprotectants and potentiators. Lag phase time (time necessary to increase 0.1 units of absorbance - 10^7 cfu) and growth rate (slope of log phase growth) of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* were the dependant variables. The microorganisms were inoculated on MRS broth containing bioprotectants and potentiators and incubated at 37°C. The increase of optic density (550 nm) was measured.

Nisin was the most effective against both microorganisms. Its effect over *Lactobacillus plantarum* was ten-fold higher then lysozyme for lag phase delay. Interactions were not significant. For lag phase delay of *Lactobacillus fermentum* only nisin was effective and synergism was observed with Tween 20. There was no positive effect on reducing growth rate of any microorganism. Obtained mathematical models gave optimized combinations of

10 ppm of nisin to 0.1% of Tween 20 to 30 ppm of lysozyme for fermentation bioprotection.

The thermal destruction parameter $D_{60^{\circ}\text{C}}$ (thermal death time) was determined for the studied strains as follows: *Lactobacillus fermentum* (0,75 min), *Lactobacillus plantarum* (0,29 min), *Leuconostoc mesenteroides* (1,57 min). The D parameter for *L. confusus* was impossible to measure as the microorganism showed to be too sensitive to the heat treatment. The *L. fermentum* was the most resistant strain of the fermentation contaminants. Thus, Z (temperature parameter) was determined to the cited strain: 7,7°C. $D_{60^{\circ}\text{C}}$ was reduced of 16,7% by the addition of the optimized bioprotectant combination. Synergy was observed between heat treatment and bioprotectant activity on *L. fermentum*.

1 INTRODUÇÃO

Os grandes volumes de produção de cana-de-açúcar no Brasil revelam a importância econômico-social da indústria sucro-alcooleira no país.

A Tabela 1 mostra alguns números da produção nacional de cana:

Tabela 1- Produção nacional de cana-de-açúcar.

Safra - ano	Hectares plantados	Toneladas produzidas
1987*	4.314.416	268.741.069
1999	4.575.561	322.473.011
2000	4.845.989	327.705.197
2001**	4.870.262	339.135.641

Fonte – IBGE. *Ano cuja produção recebia incentivos do Proálcool. ** Expectativa.

O álcool mostrou-se um combustível alternativo viável e o processo de produção é eficaz. Na medida que a biotecnologia evolui no sentido de aumentar continuamente a eficiência das fermentações e o aproveitamento de subprodutos e resíduos, e os problemas sociais como o equilíbrio entre produção de energia e de alimentos são resolvidos, o valor de mercado do etanol deverá aumentar, encorajando outros países a adotar a solução para energia alternativa (MEHTA, 2001).

Com o fim dos incentivos governamentais aplicados no programa Proálcool (Programa Nacional do Álcool), o setor entra em uma fase de modernização, otimização dos processos, pesquisa de novos produtos para se adaptar à nova realidade.

MOREIRA (1997) aponta que a indústria sucro-alcooleira necessita, para viabilizar o álcool como combustível de biomassa competindo com combustível de fonte tradicional, estruturar-se nos seguintes pontos:

- Ampliar o mercado do álcool, pela exportação como aditivo à gasolina ou como combustível.
- Reduzir custos de produção especialmente no que tange a uma tecnologia mais racional de colheita.
- O aproveitamento total da energia armazenada da cana-de-açúcar deve ser almejado como exigência do mercado.

Por outro lado, um crescente interesse pelos recursos renováveis, pela biotecnologia, e por alternativas viáveis ao petróleo, encaminham esta indústria para um futuro de importância estratégica no âmbito mundial.

Para se obter produtos de maior valor agregado, como produtos de biotecnologia, açúcar e derivados de alta qualidade, ou para conseguir a redução dos custos de produção, deve-se realizar investimentos e desenvolver a tecnologia do setor.

Processos biológicos como a fermentação podem ser em muito otimizados, quanto ao custo de produção e a produtividade, por um eficiente controle microbiológico e pelo uso da tecnologia de instalações industriais de grau sanitário. Esta última é extremamente custosa em termos de investimentos iniciais, já que requer materiais nobres e construção especial.

Também os custos de operação (paradas freqüentes para limpeza, uso de produtos especiais, pessoal especializado e treinado) tornam-se mais altos. Seu uso só se justifica em partes críticas do processo em um complexo industrial do porte da indústria sucro-alcooleira. Um tratamento térmico do mosto de fermentação associado à instalação de equipamento grau sanitário, e emprego de tecnologia de CIP pode surtir efeito no controle de contaminações de fermentações, mas ainda não é aplicado na indústria canavieira, sendo por sua vez comum industrialmente no setor de alimentos e bebidas.

O controle microbiológico é aplicado neste tipo de indústria com bons resultados no processo produtivo, podendo-se utilizar técnicas como HACCP, limpeza e sanitização (CIP), rastreabilidade das contaminações e aplicação de agentes antimicrobianos.

Alguns pontos críticos de controle, importantes do ponto de vista da produtividade, podem ser evidenciados no processo produtivo de açúcar e álcool; dentre eles citamos a fermentação onde a contaminação pode produzir a floculação do fermento interrompendo o processo, com graves consequências para a produtividade.

As infecções por bactérias e leveduras são importantes em outro ponto crítico: a moagem, em que há a formação de polissacarídeos, as dextranas, que reduzem drasticamente a qualidade do açúcar, a eficiência dos processos, obstruindo filtros e equipamentos, e ainda diminuindo o valor final pago pelo produto, já que a filtrabilidade é avaliada para se compor o preço de venda do açúcar.

O tratamento térmico realizado para a clarificação do caldo de cana, tanto para a produção de açúcar como para se reduzir a espuma na fermentação, é um importante ponto crítico de redução e eliminação de contaminantes.

O uso de produtos capazes de controlar infecções dos processos de fermentação é praticado desde os anos 50, quando penicilina era adicionada às dornas de fermentação e à moenda de usinas de açúcar e destilarias. Porém fenômenos de resistência aos antibióticos têm obrigado a indústria a utilizar novos produtos.

O risco de uso indiscriminado de antibióticos é o da inutilização do antibiótico para uso posterior na terapêutica. As populações de microrganismos, ao entrarem em contato com concentrações subletais do antibiótico podem desenvolver resistência por diversos mecanismos, como mutação, seleção dos mais resistentes e transferência de material genético de resistência.

Em processos industriais como o sucroalcooleiro, todo um agroecossistema é envolvido e um sem número de espécies microbianas afetado. A prática da fertilização da área de plantio com o efluente do processo conhecido por vinhaça é uma possível fonte de resíduos de antibióticos, assim como de material genético codificando resistência.

É de se esperar que a cada ciclo de produção os microrganismos contaminantes apresentem resistência crescente aos antimicrobianos utilizados no processo, já que parte da contaminação microbiológica do processo é carregada pela própria planta de cana-de-açúcar.

Para amenizar este tipo de problema os antibióticos da terapêutica humanos têm sido substituídos por promotores de crescimento de uso veterinário, antibióticos que selecionam a flora intestinal de aves para o máximo aproveitamento das rações de criadores.

Estes produtos que também tem seu impacto no agroecossistema da criação de aves, também agem negativamente no aparecimento de resistência, mas teoricamente não ameaça a eficiência dos antibióticos da terapêutica – a não ser por possíveis problemas de resistência cruzada – transferência de R-plasmídios (LIMA, 1999).

No entanto, não se resolve o problema do aparecimento de resíduos destes antibióticos no açúcar, quando do seu uso principalmente na moenda.

Bioprotetores são um grupo de antimicrobianos, comumente empregados para agregar estabilidade microbiológica a alimentos e processos de produção, estender e otimizar vida de prateleira: são culturas lácticas, enzimas, metabólitos não purificados, com ação inibitória aos microrganismos contaminantes, deteriorantes ou patogênicos.

Destes antimicrobianos destacam-se alguns princípios ativos como a nisina e a lisozima. A nisina é um antibiótico de ação bactericida produzido por culturas lácticas. Lisozima é proveniente do complexo protéico de ovos, e uma vez processada e parcialmente desnaturada, exibe ação antimicrobiana. Ácidos orgânicos fracos produzidos por culturas lácticas também exibem ação antimicrobiana pela sua capacidade de desestabilizar o equilíbrio hidrogeniônico de microrganismos contaminantes impedindo seu crescimento (THOMAS, 2000).

São formas de controle de contaminação microbiana reconhecidamente seguras para o homem. Seu uso em processos açucareiros seria mais seguro no que se refere aos possíveis resíduos no produto final.

Além disso, seu uso não incute em problemas de resistência à antibióticos da terapêutica humana e seu consumo em alimentos é cada vez mais disseminado.

Neste trabalho estudou-se a ação de bioprotetores, suas concentrações de uso, frente aos contaminantes encontrados nos diferentes pontos críticos do processo de produção de açúcar e álcool. A outras fases do processo, como água de lavagem de cana, trocadores de calor para resfriamento de mosto, tratamento de fermento, e outros pontos críticos para a microbiologia do processo, poderia se aplicar também formas de bioproteção.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação de bioprotetores no processo de fermentação alcoólica e moagem de cana-de-açúcar.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a atividade antimicrobiana (MIC) dos bioprotetores nisina, lisozima e MICROGARD 400 sobre os lactobacilos: *L. confusus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*.
- Avaliar a influência dos bioprotetores na cinética de fermentação alcoólica e obter o valor de MIC sobre o fermento.
- Determinar os parâmetros de cinética de destruição térmica dos lactobacilos: *L. confusus*, *L. fermentum* e *L. plantarum* e do *Leuconostoc mesenteroides*. Avaliar a influência dos bioprotetores sobre a destruição térmica da bactéria contaminante mais resistente da fermentação.
- Estudar os efeitos da combinação dos bioprotetores na cinética de crescimento dos contaminantes acima referenciados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fermentação alcoólica de cana-de-açúcar

O sucesso da fermentação alcoólica depende diretamente do estado fisiológico da levedura utilizada e da concentração celular na dorna. Os principais resultados que revelam o desempenho da fermentação são o rendimento, definido pela relação do volume de álcool produzido pela massa de açúcar inicialmente presente, e o tempo de ciclo de fermentação que é o tempo para o consumo dos açúcares presentes no mosto e sua conversão para o etanol nas condições de máximo rendimento.

A fermentação alcoólica moderna é conduzida de modo que o fermento se mantenha no estado de máxima produção de álcool, que corresponde à fase estacionária da curva de crescimento.

Nestas condições a produção de biomassa é minimizada e o processo de produção é otimizado. A fermentação contínua é uma tecnologia empregada atualmente com sucesso favorecendo estas condições.

Dados de produções específicas e de crescimento podem evidenciar um problema de fermentação associados à cepa ou matéria-prima do processo (ANDRIETTA *et al.*, 1995).

Assim, o estudo da velocidade de conversão e de níveis de produção de etanol são importantes para caracterizar o estado do fermento frente à manipulação de parâmetros de processos.

Para a estimar o desempenho da fermentação alcoólica e comparar linhagens de leveduras de fermentação da espécie *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol, realizou-se um acompanhamento da cinética fermentativa obtendo-se os parâmetros cinéticos: eficiência de fermentação, conversão de substrato em etanol e velocidade específica de crescimento da levedura. Linhagens diferentes apresentaram características cinéticas próprias e vinhos de composições diferentes conforme RIBEIRO (1998).

O acompanhamento da fermentação alcoólica pode ser feito através do monitoramento e balanço de massa, utilizando-se o método de determinação de massa seca, com boa precisão (WELTEN, 1994).

Métodos gravimétricos são úteis para se estabelecer balanços de massa medindo-se a evolução de CO₂ na fermentação alcoólica.

Observou-se boa correlação entre a produção de álcool e a de gás carbônico em uma relação de um para um em peso*, já que estequiometricamente pode-se esperar que 100 kg de glicose fermentada produzam 51,1 kg de etanol e 48,9 kg de CO₂.

Em testes de cinética é importante minimizar interferências de modo a não causar inibição ao desenvolvimento da fermentação. Um fator de inibição importante relaciona-se aos teores de açúcar do mosto e álcool produzido. Em estudo realizado a temperatura de 30°C, com *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces baianus* (*S. cerevisiae*), observou-se que concentrações de etanol superiores a 16% (v/v), geraram perda de aminoácidos intracelulares para o meio externo, o que está intimamente relacionado à indução da morte celular (SALGUEIRO *et al.*, 1988).

VIEGAS (1996) estudou a relação entre altos teores de etanol e ácidos orgânicos na inibição de leveduras de fermentação alcoólica e observou que os ácidos octanóico e decanóico têm importante influência sobre a viabilidade celular no final dos ciclos fermentativos, principalmente a baixas temperaturas. Em pH próximo ao valor de pKa (abaixo de 4,9) dos ácidos a morte celular aumentou devido ao efeito específico de lipossolubilidade destes ácidos e capacidade de interagir principalmente com a membrana plasmática da levedura. Estas observações explicam a perda de viabilidade celular do fermento no decorrer do processo de fermentação e fornece uma explanação acerca dos mecanismos de bioproteção por etanol e ácidos fracos para alimentos e processos.

* Comunicação verbal acerca de experimento realizado para tese de doutorado.

THOMAS *et al.* (1996) estudou a produção de etanol pela técnica de VGH (fermentação em concentrações de açúcares muito altas) e obteve formulas para cálculos de produtividade e rendimento para utilização de *S. cerevisiae* em fermentações com mais de 300 g/L de sólidos solúveis.

O estado fisiológico do inóculo também influencia os parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica. A idade do fermento é um fator fisiológico importante e repiques sucessivos devem ser realizados para se garantir atividade adequada da levedura.

JAKUBOWSKI *et al.* (1999) estudou os efeitos do envelhecimento e da oxidação de culturas de leveduras de fermentação, comparando parâmetros bioquímicos de culturas de 5 dias e 3 meses em cultura estacionária. Observou que as culturas envelhecidas apresentavam formação de espécies reativas de oxigênio em reações de oxidação, diminuição de atividade de dismutase de superóxido, diminuição dos níveis de glutathione e aumento de proteínas com grupamentos carbonila. Linhagens com deficiências antioxidativas mostraram-se mais sensíveis ao envelhecimento.

Assim, sob ação de um fator inibidor, ocorrem alterações da cinética do processo de fermentação alcoólica que podem não ocorrer quando as condições de fermentação estão próximas do ótimo. Em condições reais de fermentação (temperaturas elevadas, teores de açúcar altos, pH baixos) a inibição pode se manifestar.

Em escala laboratorial o método de fermentação semi-sólida (tecnologia alternativa de fermentação que consiste em não separar o bagaço do caldo de cana), mostrou-se executável e de grande potencial, gerando álcool de composição similar ao produzido pelo método convencional (MUTTON *et al.*, 1995).

SREE (2000) isolou de solo leveduras produtoras de etanol capazes de tolerar temperaturas de 44°C ou mais. Porém foi observado que acima desta temperatura houve perda de produtividade de etanol e redução do crescimento microbiano. As leveduras também eram osmotolerantes até 350 g/L de açúcares, e a concentrações de 15 g/L produziam rendimentos de 70 e 60 g/L em fermentações a 30 e 40°C respectivamente, sendo de importância estratégica para produção em regiões de clima quente.

3.2 Contaminação Microbiológica do Processo Sucro-Alcooleiro.

A flora comumente encontrada na cana-de-açúcar destinada ao processamento é de modo geral oportunista e não sofre seleção por qualquer composto presente no vegetal, instalando-se e crescendo na medida em que há a disponibilização de nutrientes pela quebra da estrutura fisiológica do colmo, na moagem ou em situações adversas como o congelamento e o manuseio. Isto gera o decréscimo do conteúdo de sacarose e aumento de substâncias tóxicas, dextranas e levanas, e competição por açúcares com leveduras do processo fermentativo (LOPEZ *et al.*, 1988).

GALLO (1989) identificou bactérias contaminantes do processo sucroalcooleiro dentre as quais leuconostoc (*L. mesenteroides* e *L. dextranicum*, micrococcos, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus lactis*, bacilos (*B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. coagulans*), e lactobacilos (*L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. confusus*, *L. fermentum*, *L. bulgaricus*).

Leveduras contaminantes naturais do caldo (leveduras selvagens) podem apresentar-se em concentrações de 10^4 ufc/mL. Quando dominantes do processo fermentativo chegam a concentrações de 10^6 ufc/mL (ANDRIETTA *et al.*, 1995).

Muitas vezes leveduras provenientes do ecossistema dominam a fermentação instalando-se no processo com bons níveis de rendimento, recuperando-se ao fim da safra cepas diferentes daquelas utilizadas no pé de cuba. Algumas leveduras selvagens, no entanto, contaminam a moenda causando perdas de açúcar ou na fermentação desviam seu metabolismo para subprodutos como glicerol causando perdas em rendimento; outras são floculentas (floculam-se espontaneamente) e interrompem a fermentação precocemente.

Saccharomyces cerevisiae com atividade “killer”, que são linhagens de leveduras que produzem toxinas protéicas ativas contra outras cepas da mesma espécie ou não, tendo assim grande capacidade de dominar fermentações, foi estudada por SOARES (1999), constatando-se grande atividade sobre fermentos comerciais comumente empregados para formação de pé de cuba de fermentações alcoólicas. A linhagem apresentou alta produtividade de etanol. A seleção deste tipo de microrganismo representa vantagens técnicas já que além de se garantir

boas produtividades de etanol, diminui-se a probabilidade de infecção do processo por leveduras selvagens problemáticas (floculentas ou de pouca produtividade) ou simplesmente de desempenho desconhecido.

CABRINI (1998) isolou do processo de usina, leveduras identificadas como pertencentes a 15 espécies, sendo que no caldo primário obteve-se incidências das espécies *Candida entomophila* (30%), *Saccharomyces cerevisiae*: *S. uvarum* (*S. cerevisiae*), 16,6% e *S. coreanus* (*S. cerevisiae*), 13,4%. No mosto, predominou a espécie *Saccharomyces cerevisiae*: *S. uvarum* (*S. cerevisiae*) (42,86%), *S. coreanus* (*S. cerevisiae*) (28,58%), *Saccharomyces chevalieri* (*S. cerevisiae*) (14,28%) e *Schizosaccharomyces pombe* (14,28%). E no leite de levedura, *Saccharomyces cerevisiae*: *S. uvarum* (*S. cerevisiae*) (50%), *S. bayanus* (21,44%), *S. pretoriensis* (*Torulaspora pretoriensis*) (10,71%), *Candida entomophila* (10,71%), *Saccharomyces chevalieri* (*S. cerevisiae*) (3,57%) e *Pichia ohmeri* (3,57%).

JIN (1999) estudando a taxonomia das linhagens de fermentos observou que três fases distintas de estudos (anos de 1952, 1970 e 1984) classificam uma série leveduras antes consideradas de espécies distintas como *Saccharomyces cerevisiae*, devido aos estudos genéticos recentes.

A moenda é um dos principais focos de infecção em usinas, predominantemente por microrganismos do gênero *Leuconostoc*, havendo grandes consumos de sacarose, com perdas econômicas importantes e queda de rendimento em açúcar causada pela produção de gomas e aumento de viscosidade do xarope, decréscimo na taxa de cristalização da sacarose, entupimento de equipamentos, cristalização em forma de agulha alongada, clarificação deficiente e interferência em análises (TROMBINI, 1998).

Cada 333 ppm de dextrana medida em teor de açúcar gera um aumento de 0,15 pontos de polarização, mascarando resultados de análise (CALDAS, 1998).

KAJI (1989) não pôde recuperar bactérias do gênero *Leuconostoc* presentes no início das fermentações ao final dos ciclos, o que indicou uma baixa tolerância ao etanol dos microrganismos – concentrações de 3% de etanol no vinho são capazes de reduzir em mais de

50% a velocidade específica de crescimento. Estas observações restringem a importância do gênero *Leuconostoc* na fermentação.

Ainda, segundo KAJI (*ibid.*) as velocidades específicas de crescimento e tempos de fase lag de bactérias contaminantes do gênero *Leuconostoc*, crescendo em meio fermentativo composto de caldo de cana suplementado de nutrientes (nitrogênio e fosfato), a 30°C é de 0,21 h⁻¹ e 4 horas, respectivamente: velocidades baixas que diminuem com o aumento da temperatura de fermentação.

A fermentação é um ponto crítico do processo, onde as infecções podem causar grandes prejuízos; este processo pode até mesmo ser interrompido no caso da indução da floculação do fermento pela flora contaminante. No estado floculado a produtividade do fermento é mínima.

A contaminação por *L. fermentum* de linhagens floculantes (que causam floculação), tem grande influência sobre a viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* devido à toxidez dos produtos metabólicos, como concluiu OLIVEIRA (1998) em seu estudo de culturas mistas entre leveduras e contaminantes em caldo de cana-de-açúcar.

OLIVA NETO (1990) encontrou no leite de levedura uma proporção de 62% de *L. fermentum* e 2% de *L. plantarum*, contaminando dornas em seu trabalho com usinas de álcool.

O tempo de fermentação ou ciclo fermentativo influi no desenvolvimento da população bacteriana em fermentações alcoólicas: ciclos prolongados favorecem o crescimento bacteriano e competição com a levedura (OLIVA NETO, 1995).

Alguns autores citam ainda que o consumo do açúcar e sua conversão para ácidos orgânicos por bactérias causam grandes perdas de rendimento. Em trabalho realizado com microrganismos isolados de fermentações contaminadas, STROPPA *et al.* (1998) simulou o processo de fermentação de açúcares por bactérias, e quantificou as perdas de açúcares em diversas condições. Obtiveram-se curvas de cinética de fermentação que revelaram velocidades baixas de conversão, e pequenos consumos do açúcar foram medidos em comparação ao consumo das leveduras produtoras de álcool.

Assim, as observações práticas sobre perdas de rendimento por contaminações bacterianas (exceto nos casos de floculação) devem ser na realidade provenientes de desvios de rotas metabólicas da própria levedura de fermentação. Um importante desvio que acarreta em perdas de rendimento em etanol é a produção de glicerol.

FINGERUT *et al.* (s.d.) observou que a produção de glicerol, como consequência da fisiologia normal de leveduras estudadas, foi a principal causa de redução do rendimento fermentativo; e que a produção de ácidos, embora significativa nas amostras de seu trabalho, não explicou a brusca perda de rendimento em etanol.

KAJI (1989) relatou que fermentações só seriam afetadas por contaminantes que estivessem em concentrações celulares altas, da ordem de 10^7 ufc/mL.

3.3 Floculação no Processo de Fermentação Alcoólica.

A floculação é um processo em que o fermento suspenso no vinho em fermentação, por meio de uma influência externa ou por características genéticas, se agrega em flocos, formando partículas que devido aos seus diâmetros crescentes se precipitam concentrando-se no fundo das dornas de fermentação.

Leveduras ditas floculentas são capazes de flocular por si próprias estimuladas por fatores como baixo teor de açúcares. Suas características fisiológicas podem ser aproveitadas para separar o vinho do fermento ao fim da fermentação, mas em fermentações contínuas com sistemas de separação diferentes como centrifugação, estes microrganismos são potenciais contaminantes que causam interrupções do processo. Leveduras não floculentas podem sofrer floculação por ação de bactérias contaminantes denominadas floculantes.

A produção de floculação por *L. fermentum* na levedura *Saccharomyces cerevisiae* só pôde ser realizada com uma nítida separação de fases em concentrações altas da bactéria: de 1,38g/L (biomassa seca) para 65,4g/L (biomassa seca) de levedura (LUDWIG *et al.*, 2001).

São considerados dois mecanismos para floculação de leveduras na fermentação, que ocorrem de maneira simultânea: ligação entre lectinas (proteínas da parede celular) e receptores polissacarídicos de outras células que podem ser mananas, galactomananas,

mediadas por íons bivalentes; mecanismos físico-químicos em que forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas, expressão de superfícies hidrofóbicas na parede externa da célula, e diminuição das forças de repulsão entre células, geram a aproximação formando agregados (STRATFORD, 1996).

O mecanismo de floculação por lectinas é o mais aceito e baseia-se em uma teoria de receptores específicos; assim as interações têm sido demonstradas pela inibição da floculação pela adição de manose ao meio, ou pela retirada de cálcio por quelantes, uma vez que o cálcio tem função de manter a conformação de zimolectinas, acceptoras dos resíduos de mananas. Esta teoria é mais aceita que a teoria de pontes de hidrogênio realizadas pela presença de íons divalentes, pois a inibição por açúcares não pode ser explicada pelo mecanismo de ligações de cálcio (JIN, 1999).

Alguns fatores para a floculação de leveduras são apresentados: a dependência de íons de metais bivalentes, de floculação reversível por EDTA, dependência da ligação entre proteínas-carboxila das paredes celulares, independência do estado metabólico da célula uma vez ocorrida a floculação, dependência do teor de açúcares no meio, cofloculação ou floculação mútua (que explica o processo que ocorre na floculação devido à contaminação por bactérias). Em comparação a leveduras de baixa fermentação, observou-se que as de alta fermentação sofrem floculação sem requererem grandes quantidades de cálcio, mas sim, no ponto isoelétrico celular.

Teores de álcool e a conformação da parede celular afetam a capacidade de flocular da célula, ao contrário de leveduras de baixa fermentação que parecem ter polímeros protuberantes suportando lectinas capazes de se interligar através da barreira de repulsão (DENGIS *et al.*, 1995).

STAN (2000) estudando o modelo de lectinas propôs um modelo matemático para prever o comportamento biológico do processo de floculação segundo os parâmetros: teor de cálcio no meio extracelular, eficiência da célula em utilizar açúcares, e probabilidade de colisão entre células em função da temperatura. O modelo foi eficaz em prever o aumento significativo da floculação em função de aumentos de teores de cálcio no meio.

Outro problema, estudado por NEGRO (1999), é a formação de “canjica”, que é constituída de grumos de dextrana e bactérias contaminantes que produzem obstrução e perda de rendimento em trocadores de calor das usinas. A dextrana é produzida pelas próprias bactérias que formam os flocos e que provém do caldo de cana utilizado no processo. Isolando estes microrganismos e promovendo a produção de gomas, constatou-se que várias linhagens de lactobacilos e algumas de leuconostoc eram capazes de aumentar consideravelmente a viscosidade do meio pela produção de dextranas, mas não houve precipitação abaixo de teores alcoólicos de 20%.

3.4 Uso de antibióticos no controle de contaminações microbianas

O controle microbiológico de fermentações em destilarias de álcool combustível tem sido realizado pela adição de ácido sulfúrico às dornas de leite de levedura, lavando a suspensão de células em pH até próximo de 2,0.

Tal tratamento foi comumente utilizado em fermentos da indústria de alimentos com ácidos fracos e mais recentemente associando sanitizantes como dióxido de cloro.

Antibióticos como a monensina e a penicilina, comumente empregados no controle das infecções do processo sucro-alcooleiro, mostraram-se bastante eficientes na redução de contaminações por bactérias.

OLIVA NETO (2001) testou os antibióticos Penicilina V ácida, clindamicina e cefamandol obtendo inibição do crescimento de bactérias contaminantes de caldo utilizando até 0,2; 0,40 e 1,45µg/mL, respectivamente. Testou também os produtos químicos: sulfito, nitrito, sulfato de cobre, etileno-bis-ditiocarbamato de zinco e manganês, dimetildietilcarbamato, metilditiocarbamato, tiocianato, bromofenato, n-alquildimetilbenzil cloreto de amônio, lisozima e formaldeído.

Antibióticos como a monensina e a penicilina, comumente empregados no controle das infecções do processo sucro-alcooleiro, mostraram-se bastante eficientes na redução do consumo de açúcar por bactérias; estes consumos, expressos em gramas de sacarose por ciclo logarítmico da população, foram quantificados para diversas bactérias contaminantes e concluiu-se que: variam de espécie para espécie, e bactérias do gênero *Bacillus* apresentaram

consumos maiores que as do gênero *Lactobacillus*, e são irrelevantes comparados aos consumos de leveduras no processo de fermentação (STROPPIA, 1998).

Foi observado ainda, que a penicilina, utilizada no processo desde a década de 50 – 60, não foi eficiente em conter o crescimento de algumas das bactérias testadas após 48 horas de incubação por resistência desenvolvida por estas espécies, o que ocorreu também para *L. plantarum* frente às dosagens de monensina (STROPPIA, 1998).

Virginiamicina, FermacolTM, cloranfenicol, penicilina e quaternário de amônio foram testados contra contaminantes comuns da fermentação alcoólica industrial de cana-de-açúcar, para determinação das concentrações mínimas inibitórias do crescimento, verificando-se maior resistência aos compostos para bactérias da espécie *L. plantarum* (ANDRIETTA *et al.*, 1993).

STUPIELLO (1993) observou que *L. plantarum* foi o microrganismo mais resistente aos antibióticos utilizados na indústria sucro-alcooleira, podendo ser utilizado como microrganismo alvo de estudos de antimicrobianos e que os contaminantes do gênero bacilos não apresentaram resistência semelhante, sendo inibidos com maior eficácia pelos antibióticos.

Perdas de até 11% em etanol produzido foram observadas na inoculação conjunta de lactobacilos e leveduras em macerado de trigo em caráter experimental, que puderam ser reduzidas ou minimizadas com o uso de virginiamicina. Concentrações de 0,5 mg/kg foram capazes de reduzir o crescimento de diversas bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, mas não o impediram após períodos maiores de fermentação, seja devido à mutação, variações da sensibilidade, seleção ou consumo da virginiamicina por lactobacilos resistentes (HYNES *et al.*, 1997).

3.5 Resistência a antimicrobianos

O uso de antibióticos da terapêutica para controle microbiológico industrial é condenável pela possibilidade de induzir fenômenos de resistência, que podem aparecer tanto no ecossistema agroindustrial como em populações humanas circunvizinhas.

Bactérias isoladas do rastreamento de um agroecossistema de cana-de-açúcar foram testadas para resistência a antibióticos sendo que entre os isolados, 86% e 43% cresceram na presença de 10-100 U/mL de penicilina e 100-300 µg/mL de virginamicina, respectivamente. Estes antibióticos foram utilizados no processo de produção da usina em estudo (LIMA *et al.*, 1999).

Genes de resistência à tetraciclina, identificados em suínos tratados com promotores de crescimento, foram encontrados na microflora de poços e lagoas da região de abatedouros, o que evidencia o potencial risco de propagação destes genes de resistência (CHEE *et al.*, 2001).

O método MIC foi utilizado para determinar o desenvolvimento de resistência a sete antibióticos e um antimicrobiano, e os valores de concentração inibitória mínima foram sempre crescentes para os organismos expostos aos resíduos destes compostos, sem no entanto apresentarem reações cruzadas à eles (BRADY, 1992).

MIRANDA (1998) encontrou maiores porcentagens de microrganismos resistentes a diversos antibióticos em águas com maior grau de poluição, sugerindo que os resíduos destes antimicrobianos, alguns de uso industrial estariam presentes e causando esta resistência na microflora. A transferência de plasmídios de resistência também foi cogitada no trabalho como mecanismo de adaptação.

Como alternativa aos antibióticos da terapêutica humana são utilizados em usinas antibióticos da classe dos promotores de crescimento para animais. No entanto doenças relacionadas a contaminações microbiológicas de alimentos podem ser disseminadas, pois a microflora selecionada pelos promotores de crescimento e profiláticos pode exibir resistência a diversos antibióticos; nove antibióticos foram testados na microflora de aves e humanos,

constatando-se a elevação da resistência e presença de microrganismos multiresistentes (BOONMAR *et al.*, 1998).

Foram reportados casos de resistência a nisina, apesar do seu relativamente recente emprego em alimentos, onde *Listeria monocytogenes* adquiriu resistência impossibilitando o mecanismo de formação de poros na parede celular pela exposição ao lantibiótico. Também se verificou a resistência cruzada destes microrganismos resistentes a outros grupos de bacteriocinas, especificamente da classe IIa, pediocina (BOWER, 1999).

A resistência à antimicrobianos de bactérias láticas pode ser produzida por vários mecanismos, como a produção de enzimas proteolíticas, impedimento à penetração da nisina pela parede celular, ou mudanças na composição da membrana plasmática que modifica a sua afinidade química pela molécula de nisina (BRUL, 1999).

A imunidade a bacteriocinas é uma propriedade inerente ao microrganismo produtor e se expressa geneticamente com a produção da bacteriocina. Está associada à produção de proteínas específicas: as imunoproteínas e as proteínas de transporte-ABC que têm a propriedade de impedir a ação da bacteriocina sobre a bactéria produtora. A proteína Lan1, uma imunoproteína, tem capacidade de se ligar fortemente à membrana celular plasmática impedindo a ação de lantibióticos. Imunoproteínas semelhantes podem gerar imunidade cruzada a bacteriocinas, mas o mecanismo de ação é extremamente específico, o que faz com que bacteriocinas como nisina e pediocina que compartilham em 60% suas estruturas, apresentem imunoproteínas diferentes e específicas quanto à ação (McAULIFFE *et al.*, 2001).

LORCA (1999), utilizando análise de proteína por SDS, observou que *Lactobacillus acidophilus* desenvolviam resistência cruzada pela exposição a substâncias com ação antimicrobiana como ácidos, cloranfenicol, etanol e peróxido de hidrogênio, e a condições stressantes de crescimento. Não foi constatado mecanismo específico (proteína indicando resistência) entre resistência a etanol e a cloranfenicol, apesar de ter sido observada resistência cruzada.

Em estudo conduzido em bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, resistentes a virginiamicina por meio de sequenciamento genético, isolou-se gene de plasmídio bacteriano,

VGA, codificando uma suposta proteína de resistência. Proteína semelhante identificada em *Escherichia coli* não conferiu resistência à virginamicina ao microrganismo (ALIGNET *et al.*, 1992).

3.6 Bioprotetores e mecanismos de ação

Alimentos fermentados têm sido produzidos desde a antiguidade no intuito de preservar, diminuir toxidez ou aumentar a digestibilidade dos alimentos. O uso de fermentos lácticos, que produzem bacteriocinas de efeito antibiótico desejado, pode melhorar sensivelmente as características microbiológicas do alimento (CAPLICE, 1999).

A extensão da vida de prateleira pela adição de culturas lácticas a alimentos como produtos cárneos foi obtida, pois este tipo de microrganismo tem capacidade de formar uma microflora dominante sobre a patogênica, preservando o alimento com uma “fermentação oculta” (STILES, 1996).

A utilização de bioprotetores extraídos e purificados ao invés da adição de culturas bacterianas ao alimento traz inúmeras vantagens de estabilidade, maior tempo de prateleira, possibilidade de realizar um tratamento térmico ao final da cadeia de produção. Outra dificuldade em se usar bactérias lácticas produtoras de bioprotetores é que por vezes a cultura utilizada, selecionada para produzir o bioprotetor é pouco eficiente para o processo em geral. *L. lactis*, produtor de nisina inoculado como cultura láctica para fermentação de queijo, mostrou-se lento na fermentação da glicose e incapaz de produzir proteases, necessárias na maturação dos queijos (MORENO *et al.*, 1999). Como a produção de nisina está relacionada à ausência de enzimas proteolíticas, a adição de nisina purificada durante o processo poderia ser uma solução viável.

Os bioprotetores têm por característica positiva o fato de serem classificados como grau alimentício, já que derivam de processos de produção de alimentos; mas seu emprego deve ser racional de modo a agregar qualidade ao produto e não substituir importantes práticas de higiene e BPF (HOLZAPFEL *et al.*, 1995).

CATTE *et al.* (1999) utilizou um planejamento fatorial 2^3 completo para investigar o efeito de cloreto de sódio e fumaça líquida, substâncias potencialmente inibidoras do

crescimento, e condições de atividade de água no crescimento de *L. plantarum* em meio MRS, medido por densidade ótica à 600 nm. Foram medidas as respostas: tempo de fase lag, tempo de crescimento e acidificação do meio. O tratamento dos dados indicou que a atividade de água e teor de sal influenciaram o crescimento sem interações significativas, mas a fumaça líquida não influenciou nem o crescimento nem a acidificação.

Ácidos orgânicos são comumente empregados na estabilização microbiológica de alimentos, como por exemplo: ácido sórbico, láctico, acético, benzóico e propiônico. O mecanismo de ação proposto para a sua ação antimicrobiana propõe que em pH baixo estas moléculas se encontram em equilíbrio químico com predominância da forma não dissociada molecular, com grande capacidade de se dissolver nas membranas citoplasmáticas, penetrando nas células até que o equilíbrio osmótico se estabeleça. Uma vez dentro da célula, onde o pH é mais próximo da neutralidade ocorre a dissociação de prótons e ânions aumentando criticamente a concentração protônica intracelular, inativando enzimas e paralisando o metabolismo celular (BRUL, 1999).

Estes antimicrobianos são influenciados pela composição do meio e pH, cada qual segundo a característica físico-química da molécula - especificamente o coeficiente de partição (pKa), que para ácido sórbico em óleo é de 3,0; para ácido propiônico de 0,17; para ácido benzóico de 6,1, por exemplo (LÜCK, 1995).

Algumas bactérias lácticas probióticas são capazes de produzir ácidos fracos, que são metabólitos que segundo SANDERS (1999) tem ação benéfica sobre a saúde estomacal, inibindo bactérias patogênicas. Esta mistura de ácidos pode ser utilizada como bioprotetor em alimentos.

A fermentação de bactérias lácticas caracteriza-se pelo acúmulo de substâncias ácidas baixando significativamente o pH do meio, tornando-o seletivo; algumas substâncias presentes neste tipo de bioprotetor que tem comprovada ação antimicrobiana são descritas por DEVUYST (1994): ácido láctico, ácidos orgânicos voláteis, etanol, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil e acetaldeído.

MONTVILLE (1998) define biopreservação de alimentos como a utilização de bactérias lácticas (probióticos), seus metabólitos ou ambos para melhorar ou assegurar a qualidade e a segurança de alimentos que não são necessariamente fermentados.

Bacteriocinas são compostos protéicos, produzidos por bactérias com modo de ação bactericida sobre microrganismos semelhantes ou com largo espectro de ação. A classificação das bacteriocinas é realizada segundo a estrutura química das moléculas que as compõem, definindo um número de classes de bacteriocinas de bactérias lácticas:

A classe I dos lantibióticos, composta por pequenas moléculas peptídicas (<5kDa) que contém um aminoácido pouco usual, a lantionina (Lan), β -metil lantionina e aminoácidos desidratados é dividida em subclasses conforme estrutura e modo de ação. Os lantibióticos do tipo A, são formados por 34 aminoácidos em cadeias alongadas, com similaridade na conformação das pontes entre Lan, agindo na ruptura da membrana citoplasmática da bactéria alvo. Nisina, subtilina e epidermina são classificados como bacteriocinas tipo I A. Os lantibióticos do tipo B agem na inibição da função enzimática da célula alvo, sendo constituídos de moléculas globulares de 19 resíduos de aminoácidos. Duramicina e cinamicina são exemplos deste tipo de bacteriocinas.

A classe II é composta por peptídeos pequenos (<5 kDa), que não contém Lan, ativos sobre membrana plasmática, e são subdivididos conforme sua ação antilisteria em IIa (ex.: pediocina, sakacina); IIb, que requer dois componentes peptídicos para exibir ação (ex.: lacticina); IIc de excreção sec-dependente para a atividade (ex.: acidocina).

Por fim, a classe III é constituída por bacteriocinas termolábeis de alto peso molecular (>30 kDa) (McAULIFFE *et al.*, 2001).

Nisina é uma bacteriocina obtida por fermentação, na fase de crescimento exponencial, de *Lactococcus lactis*, não tóxica, termoestável, eficiente contra bactérias gram positivas, e quando associada ao EDTA, eficiente contra bactérias Gram negativas (CHAN *et al.*, 1996; HELANDER, 2000).

É um polipeptídeo constituído de 34 aminoácidos com cinco ligações sulfidrílicas circulares formando os aminoácidos não protéicos: lantionina e beta metil lantionina. É uma

molécula anfifílica formada por um terminal N e um terminal C de conformação helicoidal, unidos por uma região flexível que confere rotação à molécula: tal característica é importante para sua solubilidade e penetração em membranas fosfolipídicas. Segundo a cepa bacteriana que a produz, a nisina pode ser do tipo A ou Z, que diferem entre si do ponto de vista estrutural em apenas um aminoácido na posição 27 (His na nisina A e Asn na nisina Z). Algumas diferenças com relação à produção e a ação antimicrobiana foram reportadas. Em testes MIC a formação de halos maiores para a nisina Z em placas inoculadas com microrganismos indicadores é causada exclusivamente pela maior facilidade de difusão do tipo em agar (ABEE *et al.*, 1995).

A Figura 1 mostra a estrutura da sequência dos resíduos dos aminoácidos da molécula da nisina e as pontes de sulfeto envolvidas nas formações dos aminoácidos cíclicos lantionina (Ala – S – Ala).

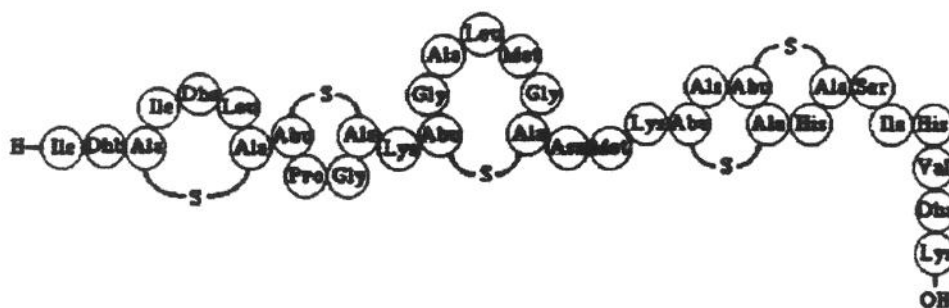


Figura 1: Molécula de nisina (BOWER, 2001).

O espectro de ação da nisina é relativamente estreito sendo ativa contra bactérias gram positivas, como bactérias lácticas, clostridium, bacilos, estreptococos e em combinação com quelantes contra algumas bactérias gram negativas, mas ineficaz contra fungos e leveduras (LÜCK, 1995).

Os mecanismos de ação da nisina, constituinte de bioprotetores em alimentos, e de substâncias derivadas – lantibióticos, subtilina e nisina com substituições obtidas por engenharia genética – são pouco conhecidos, mas são dependentes da estrutura química destes

compostos (CHAN *et al.*, 1996), provavelmente relacionados à formação de poros nas paredes dos microrganismos, com perda de material celular vital.

Bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* apresentaram um modo de ação e um mecanismo de adsorção similares ao da nisina, substancialmente bactericida contra células em fase exponencial de crescimento, com intensidade maior para as que se encontravam na metade dessa fase (MORENO *et al.*, 1999).

Assim, alguns modelos mecanísticos foram propostos por THOMAS (2000). A ação inibitória da formação de parede celular bacteriana pode ocorrer pela ligação da molécula de nisina com um precursor da peptidoglicana ou pela absorção de ácido teicóico da parede celular que deflagra um processo de autólise.

Mas os modelos relativos à parede celular não explicam a ação biocida e instantânea observada, ou a resistência observada em cepas com composição de fosfolipídios de membrana, diferente das cepas sensíveis (BRUL, 1999).

Assim, modelos relativos à ação sobre a membrana plasmática parecem explicar melhor os efeitos da nisina sobre as células (MONTVILLE, 1998; THOMAS, 2000):

Mecanismo de barril e aduela – Nisina, pela sua característica anfifílica, combina-se e penetra na membrana plasmática da célula bacteriana, perpendicularmente à superfície. Como uma molécula de nisina é por demais pequena para promover a formação de um poro, o modelo sugere que ocorre um posicionamento de varias moléculas de nisina, em torno de uma luz repleta de água em forma de barril, de tal forma que as porções hidrofóbicas se orientem para o exterior do barril e as porções hidrofílicas para a luz. O mecanismo é extremamente dependente do estado metabólico e do potencial trans-membrana do microrganismo. A formação de poros causa uma perda de conteúdo intracelular interrompendo rapidamente reações metabólicas vitais.

A Figura 2 ilustra o mecanismo descrito apresentando uma porção da membrana plasmática e a formação de um poro pela disposição das moléculas de nisina.

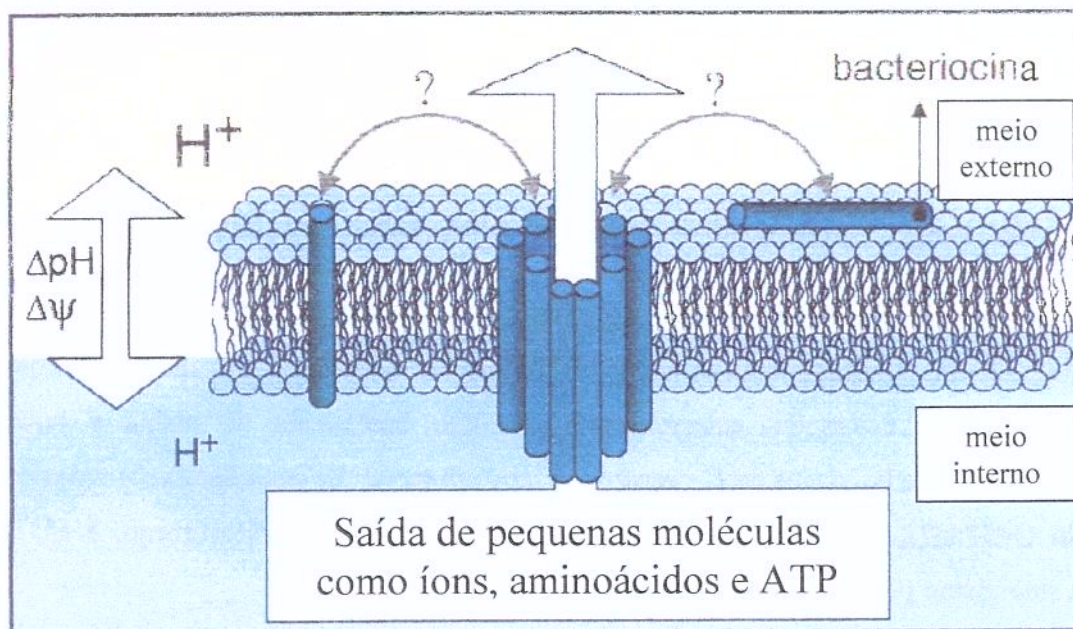


Figura 2 – Mecanismo de ação da nisina. Modelo do Barril e aduelas (McAULIFFE *et al.*, 2001).

Mecanismo de cunha – por mecanismos eletrostáticos a nisina se liga e penetra na membrana plasmática bacteriana, o que depende tanto do potencial de membrana como da composição química dos fosfolípidios. A formação de poros ocorre quando várias moléculas de nisina penetram e perturbam a dinâmica da membrana, pela inserção de grupamento positivamente carregado, causando um defeito na camada dupla de fosfolípidios.

Também um mecanismo independente da força motriz protônica é citado por ABEE *et al.* (1995), no qual a composição lipídica da membrana influi na penetração das moléculas de nisina que age como carreador de ânions, causando eflúvio citoplasmático.

Um outro mecanismo proposto baseia-se também nas características anfífilas da molécula da nisina e propõe que ocorre o rompimento da membrana plasmática bacteriana por detergência (MONTVILLE, 1998).

Mas, o comportamento da ação antibacteriana da nisina é classicamente dose dependente. Isto também incute no fato que a carga bacteriana influi proporcionalmente na ação do lantibiótico.

Tratamentos térmicos subletais induzem a sensibilidade de esporos a nisina, sendo especialmente sensíveis os endósporos de *Clostridium* e *Bacillus*, com efeitos esporostáticos e até esporocidas, evitando crescimento de células de esporos germinados (KIM, 1993).

Constatou-se que as substâncias que compõem os alimentos alteram o desempenho dos antimicrobianos: concentrações adicionadas de lecitina, sais de cátions divalentes como cálcio e magnésio, e caseína antagonisaram o efeito bactericida de nisina e outros antimicrobianos sobre linhagens de *L. curvatus*, *Listeria innocua*, *Salmonella*, *Escherichia coli* (incluindo O157:H7), enquanto que pH baixo, cloreto de sódio, propilparabeno, e EDTA exibiram sinergismo (GÄNZLE *et al.*, 1998).

Análises da estrutura da molécula de nisina em diferentes concentrações hidrogeniônicas revelaram que em faixas de pH abaixo de 5,5 o polipeptídeo assume uma conformação espacial espiralada ao acaso, que está relacionada com sua solubilidade e estabilidade nestas condições, e acima do pH de 5,5 a nisina, que se mostra menos estável e perde gradativamente sua atividade, assume conformação fixa (DYKES, 1998).

O uso de concentrações de 1 a 20 mmol / L de EDTA em combinação com nisina resulta em sinergismo e eficácia contra bactérias Gram positivas (GÄNZLE *et al.*, 1998) e negativas, pela ação sobre a funcionalidade de membranas bacterianas (STEVENS, 1992).

THOMAS (2000) relatou que concentrações de 20 mmol de EDTA e 12,5 a 25 ppm de nisina tem eficaz ação antimicrobiana.

No processo de homogeneização de leite a 200 bar foi observado que a população de *Listeria innocua* foi reduzida pela adição de 100 UI/mL em 2,6 a 2,9 ciclos logarítmicos, enquanto que a inibição no leite integral chegou a 3,7 a 3,8 ciclos; as perdas de atividade antimicrobiana da nisina chegaram a 64% comprometendo o seu uso para bioproteção do processo de homogeneização de leite (ZAPICO *et al.*, 1998).

A proteção de alimentos contra bactérias Gram negativas pela combinação de nisina com ácidos orgânicos e EDTA foi investigada por HELANDER (2000), que realizou tratamentos com o bioprotetor contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. marginalis*, e *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium*. A subsequente adição de 1 mmol de EDTA aumentou a penetração de substância fluorescente (1-N-fenilnaftilamina) indicadora de formação de poros na membrana citoplasmática, mas 0,1 mmol de EDTA e ácidos orgânicos não tiveram efeito, havendo ao contrário, estabilização da parede lipopolissacarídica pela nisina.

O método de MIC foi utilizado para medir a susceptibilidade de *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* e *Pediococcus*, e esporos de *Clostridium* e *Bacillus* às bacteriocinas: nisina A, nisina Z e pediocina. Pediocina se mostrou mais eficaz contra *Listeria monocytogenes*, mas nisina A e Z tiveram MIC de 23 a 69 µg/L contra o crescimento de esporos por 10 dias enquanto que pediocina pode ter tido efeito germinativo de *B. subtilis*, conforme concluído por MEGHROUS *et al.* (1999).

L. plantarum (ATCC 8014) e *L. cremoris* (ATCC 9596) foram testados pelo método MIC resultando em concentrações mínimas inibitórias de 0,15µg/mL de nisina A (expressos em substância pura) para ambos os microrganismos, 0,34 e 0,15 µg/mL de nisina Z respectivamente e 22,1 µg/mL para pediocina sobre *L. plantarum* (MEGHROUS *et al.*, 1999).

O valor de tempo de destruição térmica (D) foi determinado para o tratamento térmico à 90°C de esporos ativados de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em bebidas ácidas de frutas. O D_{90°C} na bebida de maçã foi de 20,8; 19,3; 15,5 e 14,8 minutos para 0 (controle), 50, 100 e 200 UI/mL de nisina, respectivamente; e o D_{90°C} para a bebida de laranja foi de 23,1; 20,4; 20,6 e 17,6 minutos para 0, 50, 100, 200 UI/mL de nisina, respectivamente. A redução de D entre a concentração de 200 UI/mL de nisina, equivalente a 5 ppm de nisina ativa, e o controle foi de 71% e 76% para bebidas de maçã e laranja respectivamente, sendo a nisina tão ou mais ativa que a lisozima na inibição de esporos de *A. acidoterrestris* (YAMAZAKI *et al.*, 2000).

Um método de imunoensaio foi desenvolvido por NANADAKUMAR *et al.* (1999) para detectar e quantificar nisina em matrizes complexas e meios de fermentação, em que

partículas poderiam interferir nos resultados, conseguindo recuperações de amostras adicionadas de nisina em leite, meio de fermentação e solução tampão de 86, 96, 98% em média, respectivamente.

O efeito bactericida de nisina adicionada a concentração de 100 UI/mL em *Micrococcus luteus* em solução tampão fosfato em pH 6,8, resultou na redução de 1,4 ciclos logarítmicos na contagem de viáveis. Já o efeito sobre a mesma amostra de um tratamento por campo de pulso elétrico (PEF) a 50 pulsos a 33kv/cm, resultou na redução de viáveis em 2,4 log. A combinação dos tratamentos na ordem nisina seguida de PEF e tratamento por PEF seguido de nisina resultou em reduções de 5,2 e 4,9 log, respectivamente (DUTREUX, 2000).

PARENTE *et al.* (1998) estudou a combinação de bacteriocinas nisina e leucocina, teores de NaCl e pH, adição de EDTA e concentração de inóculo sobre a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em caldo. Análises estatísticas dos efeitos indicaram que nisina teve maior efeito sobre a sobrevivência da bactéria, mas leucocina também foi efetiva. NaCl e EDTA tiveram pequenos efeitos, enquanto que a redução dos valores de pH foram efetivos em diminuir a sobrevivência.

Carvacrol, um composto fenólico presente em orégano e tomilho, foi avaliado quanto sua ação antibacteriana em combinação com nisina contra linhagens de *Bacillus cereus*, nas concentrações de 0,15 ppm de nisina para 0,3 mmol/L de carvacrol. A combinação mostrou-se mais eficiente que a nisina somente, indicando sinergia tanto no tratamento a 30°C, pH 7,0 e 5,7 como a baixas temperaturas (8°C, pH 7,0 e 6,3), indicando o potencial do uso da combinação nisina e carvacrol, em baixos valores de pH, para alimentos minimamente processados (PERIAGO, 2001).

Nisina e outros lantibióticos têm sido estudados devido às suas propriedades características de reatividade e modo de ação antimicrobiana diferente dos antibióticos da terapêutica. Foram testados com sucesso contra uma série de patógenos e alguns lantibióticos foram caracterizados por sua ação antiviral. São estudados para diversas aplicações farmacêuticas, utilizados como surfactantes capazes de promover a absorção por mucosas de fármacos como proteínas ou compostos pouco solúveis, emulsificantes devido sua característica anfílica, e barreira microbiológica em superfícies de materiais sintéticos.

Segundo BOWER (2001) as características importantes para a utilização de lantibióticos são: moléculas de baixo P.M., catiônicas, atividade em pH baixo e resistentes à hidrólise por lisozima, características reunidas pela nisina.

Foi observado que a adição de nisina em concentrações de até 200 UI/mL, tratamento térmico brando (50°C) e resfriamento rápido, causou a perda de potássio intracelular de bactérias de *Clostridium perfringens* para o meio, composto por solução tampão (pH 7,2). O aumento da fase lag do microrganismo e o aumento da perda de viabilidade foram associados aos aumentos de concentração de nisina, e o extravasamento dos íons potássio associado a esta perda de viabilidade. O crescimento subsequente foi associado à multiplicação de indivíduos resistentes (GUERLAVA, 1998).

O efeito sinérgico entre nisina e lisozima foi observado sobre bactérias lácticas deteriorantes, quando adicionados ao meio MRS e MRS modificado acrescido de 2 e 4% de cloreto de sódio; as proporções de 37,5 ppm de nisina para 112,5 ppm de lisozima provocaram a redução de 4 ciclos logarítmicos da população de *L. curvatus* em uma hora e 8 ciclos em duas horas, contra 4 ciclos em duas horas para nisina apenas. Proporções de um terço de nisina para lisozima reduziram o valor de MIC de bactérias lácticas em até 16 vezes (CHUNG, 2000). A proporção indicada da combinação nisina lisozima de 1 para 3 foi considerada melhor, dado o custo quase 3 vezes maior da nisina em comparação com lisozima.

GILL (2000) aplicou esta combinação de bioprotetores para produtos cárneos em concentrações de 500 mg/kg e conseguiu prolongar a vida de prateleira de maneira significativa para as contagens de patógenos e deteriorantes. Presunto inoculado com *B. thermosphacta* e *E. coli* O157:H7 não exibiu crescimento até a 4ª semana e para *S. typhimurium*, até a 3ª semana. Em embutidos tipo “bologna” e presunto *L. curvatus* não cresceu até a 3ª semana. A população de *Lc. mesenteroides* foi reduzida enquanto que *L. sakei*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia grimesii* e *Shevanella putrefaciens* não foram inibidas pelo tratamento com os bioprotetores.

Uma cultura do microrganismo indicador *Micrococcus luteus* foi utilizada para o método de dosagem direta de nisina em placa, adicionando-se diretamente ao meio o microrganismo produtor *L. lactis*. O método modificado provou ser eficaz para estudar a

influência da adição de sais e de parâmetros da produção de nisina, para balizar ensaios posteriores em escala maior (CHANDRAPATI, 1998).

A atividade antimicrobiana da lisozima é associada a sua atividade enzimática de muramidase, que hidrolisa ligações glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina dos glicopolissacarídeos (LÜCK, 1995).

Segundo LOSSO *et al.* (2000) a lisozima promove a catálise que envolve os aminoácidos Asp52 e Glu35 de seu sítio ativo, sobre a ligação glicosídica devido às formas dissociada e protonada respectivamente, destes aminoácidos.

Lisozima de ovos parcialmente desnaturada apresenta uma alta atividade antibacteriana tanto contra bactérias Gram negativas e positivas, por um mecanismo de ruptura de membranas independente de sua atividade como muramidase. Íons divalentes como cálcio e magnésio tendem a estabilizar as paredes bacterianas, diminuindo significativamente a atividade da lisozima, porém a associação de quelantes (EDTA) reverte tal processo, pois o mecanismo de ação da lisozima consiste na retirada de íons divalentes, pela inserção de seu grupo hidrofóbico exposto, da estrutura polissacarídica externa à membrana plasmática, desestabilizando-a e causando a lise celular (IBRAHIM *et al.*, 1997).

Também se constatou a eficácia da associação de lisozima e EDTA utilizados com outros agentes de preservação de alimentos em variáveis teores de cloreto de sódio e pH (RAZAVI-ROHANI, 1996.).

A interação dos cátions cálcio, magnésio, ferro e dos anions citrato com lisozima foi estudada, não podendo ser observada qualquer afinidade entre Ca^{++} e Mg^{++} e lisozima nos pHs de 6 e 9, enquanto que Fe^{3+} apresentou afinidade com a enzima causando coordenação e diminuição da carga positiva, indicando a perda de um próton de um grupamento amônio da molécula. O anion citrato interagiu com a lisozima por ligações eletrostáticas dependentes da carga da proteína (CROGUENEC *et al.*, 2000).

A desnaturação protéica de lisozima pelo tratamento à 80°C por 20 minutos resultou em uma atividade aumentada do composto sobre bactérias Gram negativas, sem detrimento de sua atividade contra bactérias Gram positivas, obtendo-se reduções significativas em culturas

de *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *S. aureus* tratadas com 200 ppm de lisozima por 24 horas (IBRAHIM *et al.*, 1996).

A adição de 0,32 AU/mL de bacteriocina acidocina a 50 mg/L de lisozima inibiu em 82,4% o crescimento da cultura do microrganismo indicador *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* LTI 30, contra apenas 58,5% de inibição por lisozima apenas, tendo sido indicado sinergismo entre os antimicrobianos (CHUMCHALOVÁ *et al.*, 1998).

Um estudo de inativação térmica de lisozima em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5, a 72°C revelou que o comportamento da cinética de destruição foi de primeira ordem e a constante de inativação medida foi $0,9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ sem agitação e $3,6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ sob agitação de 700 rpm (COLOMBIÉ *et al.*, 2001).

3.7 Tratamento térmico

A preparação do caldo de cana-de-açúcar é realizada após o processo de moagem em que ocorre a separação das duas grandes frações da cana: caldo e bagaço. O caldo é uma solução impura de açúcares dos quais a sacarose predomina constituindo em média 14%.

Para uma boa evolução do processo fermentativo algumas impurezas devem ser eliminadas sem depleção de nutrientes:

- Partículas coloidais – que causam entupimentos em filtros, e prejudicam a centrifugação.
- Impurezas grosseiras – areia e fibra.
- Contaminantes microbianos.

O tratamento térmico de caldo não é um processo obrigatório, mas a eficiência da clarificação e eliminação de proteínas e colóides que provocam espumação durante a fermentação depende do processo, assim como a redução de microrganismos.

A temperatura de tratamento pode variar de 95°C em tanque aberto, a 105°C quando há “flasheamento” do caldo.

BOVI (1999) realizou um trabalho para avaliar as conseqüências da presença de impurezas no caldo de cana, especificamente pela adição de 0,25; 0,50 e 0,75 pontos percentuais sobre o teor de fibras de cana-de-açúcar e constatou que a presença de folhas verdes causou a redução de Brix (0,075°B para 1% de folhas verdes), pol, pureza do caldo, elevação de teores de cinzas e de açúcares redutores.

O tratamento térmico do processo de clarificação do caldo, aplicado em conjunto com a calagem e a sulfitação, gera reduções na população bacteriana da ordem de 10^3 ufc/mL, podendo algumas cepas – notadamente do gênero *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, produtoras de dextrana – tolerar os efeitos da temperatura e produtos químicos (TROMBINI, 1998).

REICHARDT (2001) propôs um modelo matemático para calcular os parâmetros de morte térmica dos microrganismos *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis* para condições variadas de temperatura de tratamento, pH, atividade de água e valor redox do meio, cuja validação serviu para que o modelo possa ser usado tanto para prever os tempos de morte térmica segundo as condições ambientais, como obter os parâmetros termodinâmicos do processo.

Os parâmetros de morte térmica são definidos como D, que é o tempo de redução decimal de um fator termicamente vulnerável (microrganismo alvo) expresso em minutos e Z que é a taxa de declínio da curva do tempo de destruição térmica em função da temperatura, em graus Celsius ou Fahrenheit.

A equação que correlaciona os parâmetros é apresentada:

$$D_r/D = 10^{(T-Tr)/Z}$$

Onde D é o parâmetro de tempo de destruição térmica, D_r é o parâmetro de tempo de destruição térmica à temperatura de referência, T é a temperatura do processo, T_r é a temperatura de referência e Z é o parâmetro cinético de temperatura.

Tratamentos combinando teores de etanol e temperatura foram desenvolvidos para avaliar a resistência térmica de microrganismos patogênicos resistentes e sensíveis ao calor e um deteriorante razoavelmente resistente. As temperaturas praticadas nos tratamentos foram de 70 a 97°C para *B. cereus*, 48 a 54°C para *S. typhimurium* e 44 a 60°C para *L. delbrueckii*, em diferentes valores de pH (3, 5 e 7) e concentrações de etanol (0; 2,5; 5; 7,5 e 10%). Ambos os fatores foram muito influentes nos valores de D do processo de destruição térmica e a variação entre os níveis das variáveis gerou reduções de até 100 vezes do valor de D. Para todas as bactérias testadas os efeitos de pH e teor de etanol foram maiores em temperaturas mais baixas de tratamento, concluindo-se que estes são parâmetros importantes no estudo de reduções dos tratamentos térmicos (CASADEI *et al.*, 2001).

FRANZ (2001) determinou os valores de D de bactérias lácticas contaminantes de embutidos para dimensionar e testar um processo de pasteurização do produto em sua embalagem. Os valores de D a 57, 60 e 63°C obtidos foram: 52,9; 39,3; 32,5 s para *Lactobacillus sakei*, 34,9; 31,3; 20,2 s para *Leuconostoc mesenteroides* e 22,5; 15,6; 14,4 s para *Lactobacillus curvatus*.

Observou-se sinergismo no uso de nisina combinada com tratamento térmico brando (48 e 56°C) na destruição de bactérias Gram positivas, em particular *Lactobacillus plantarum*, devido ao aumento da formação de poros e da permeabilidade de membrana medida (UECKERT *et al.*, 1998).

Espera-se menor efeito sinérgico em tratamentos térmicos mais severos devido à desestabilização térmica da nisina em altas temperaturas, que perde menos de 5% de sua atividade em tratamentos a 115°C por 20 minutos em pH 3,0. Em pHs próximos à neutralidade a estabilidade da nisina decresce significativamente (THOMAS, 2000).

Pectinatus frisingensis, um microrganismo deteriorante de cerveja, em fase exponencial de crescimento, ao ser exposto aos efeitos combinados de nisina e tratamento térmico brando (50°C por 10 minutos), apresentou perda de íons potássio para o meio externo evidenciando inativação celular por modificação da permeabilidade de membrana (CHIHIB *et al.*, 1999).

3.8 Método da Concentração Mínima Inibitória e Alternativas

Métodos que medem concentrações inibitórias por diâmetros ou áreas de discos de gradiente de concentração tem baixa repetibilidade e alto grau de erro, sendo os meios líquidos pouco influenciados pela difusão de nutrientes, e mais precisos nas quantificações.

O método de MIC é mais trabalhoso do que o realizado em meio sólido, mas é recomendável para a avaliação no processo da fermentação alcoólica; já o MBC (concentração bactericida mínima) revela resultados de concentração muito altos, diferentes das praticadas nas usinas, entretanto realistas para tratamentos de choque (STUPIELLO, 1993).

Este ensaio tem por objetivo determinar as concentrações efetivas mínimas dos bioprotetores para a inibição do crescimento das diferentes cepas.

Diferentemente, o método MIC por mudança de pH mostra a inibição do metabolismo de produção de ácidos. Segundo STROPPA (1998), na fermentação alcoólica o consumo de açúcares para a produção de ácidos orgânicos por bactérias é pouco relevante para o rendimento do processo, ao contrário do efeito do crescimento microbiano e conseqüente floculação do fermento.

ROGERS (1991) propôs uma modificação do método de difusão para detectar a atividade antimicrobiana de nisina substituindo o microrganismo alvo, que originalmente é *Micrococcus luteus* por *Lactobacillus sakei*, e melhorando significativamente a sensibilidade do método que se baseia na correlação entre o tamanho das zonas de inibição e dos teores de nisina aplicados.

Análises bastante precisas da ação de bacteriocinas podem ser obtidas pela aplicação de modelos de dose $\times$ resposta e determinação das doses inibitórias para 50% da população de microrganismos (ID 50) segundo diversos modelos (CABO *et al.*, 1999).

Citometria de fluxo foi comparada ao método tradicional de contagem de unidades formadoras de colônias (ufc), obtendo-se resultados melhores em termos de sensibilidade do método medindo-se o índice de fluxo, podendo-se utilizar para condições em que as concentrações de bacteriocinas são muito baixas. O método foi conduzido utilizando-se a

substância fluorescente diacetato de carboxifluorescina, para indicar o fluxo de conteúdo intracelular para o meio pela perturbação da membrana plasmática pelas bacteriocinas nisina, pediocina PA-1, E sakacina A sobre os microrganismos *Lactobacillus reuteri* DSM 12246, *Lactobacillus sakei* NCFB 2714 e *Lactobacillus sakei* DSM 20017 (BUDDE, 2001).

ESTUDO 1 - DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) E ESTUDO DE CINÉTICA FERMENTATIVA.

RESUMO

Foi testada a ação dos bioprotetores nisina (Novasin), lisozima (Novagard) e Microgard 400 (produto comercial obtido de fermentação de bactérias láticas) sobre culturas puras de bactérias contaminantes do processo de moagem de cana e fermentação alcoólica da indústria sucro-alcooleira e levedura *Saccharomyces cerevisiae*, presente na fermentação e contaminante da moenda. Utilizou-se o método de concentração mínima inibitória (MIC) em meio líquido. *Lactobacillus fermentum* foi a mais resistente à nisina: o valor da MIC foi de $9,0 \pm 1,7$ ppm. A adição de 1mM de EDTA por ppm de Novasin resultou na redução do valor de MIC para $3,6 \pm 0,6$ ppm. *Lactobacillus plantarum* foi mais resistente à combinação nisina e EDTA. Tween 20, adicionado ao meio na concentração de 0,1%, combinado à nisina, não provocou aumento significativo do efeito inibitório. A lisozima foi efetiva na inibição de *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus plantarum* em concentrações próximas a 1000 ppm, mas apresentou-se ineficaz contra *L. fermentum*. O *Leuconostoc mesenteroides* apresentou MIC de $83,3 \pm 5,8$ ppm para nisina, e a adição de EDTA ou Tween 20 não afetou significativamente os valores da MIC. O crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* não foi inibido pela adição de nisina à concentrações de até 90 ppm mesmo com adição de EDTA, lisozima ou Tween 20. A cinética de produção de álcool etílico por leveduras comerciais e cultura pura de *Saccharomyces cerevisiae* foi medida pela quantificação da perda de gás carbônico durante o processo. Pela construção de gráficos de produção de álcool, obteve-se o valor do ponto de máxima produção de álcool ($p_{\text{máx}}$). As médias dos valores de $p_{\text{máx}}$ para cada tratamento foram obtidas e testadas pelo teste de Tuckey, concluindo-se que não houve influência sobre as velocidades de produção de etanol quando da adição bioprotetores.

O emprego de bioprotetores no processo sucroalcooleiro para o controle de contaminações é potencialmente viável, já que nisina, lisozima e nisina-EDTA inibiram o crescimento de bactérias contaminantes sem afetar a cinética fermentativa.

Palavras chave: fermentação alcoólica, bactérias láticas, levedura, bioprotetores.

1 INTRODUÇÃO

Bactérias lácticas são importantes contaminantes dos processos de moagem e fermentação da indústria sucro-alcooleira, e são associadas a perdas de qualidade e rendimento do açúcar e álcool.

GALLO (1989) identificou bactérias contaminantes do processo sucroalcooleiro dentre as quais leuconostoc (*L. mesenteroides* e *L. dextranicum*), micrococos, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus lactis*, bacilos (*B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. coagulans*), e lactobacilos (*L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. confusus*, *L. fermentum*, *L. bulgaricus*).

Leveduras contaminantes naturais do caldo (leveduras selvagens) podem apresentar-se em concentrações de 10^4 ufc/mL. Quando dominantes do processo fermentativo chegam a concentrações de 10^6 ufc/mL (ANDRIETTA, 1995).

A contaminação por *L. fermentum* de linhagens floculantes (que causam floculação), tem grande influência sobre a viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* devido à toxidez dos produtos metabólicos (OLIVEIRA, 1998).

Saccharomyces cerevisiae com atividade “killer”, que são leveduras que produzem toxinas protéicas ativas contra outras cepas da mesma espécie ou não, tendo assim grande capacidade de dominar fermentações, foram identificadas constatando-se grande atividade sobre fermentos comerciais comumente empregados para formação de pé de cuba de fermentações alcoólicas.

A utilização de antibióticos para o controle de infecções no processo tem sido praticada há 50 anos no Brasil. Antibióticos de uso humano têm sido substituídos por promotores de crescimento veterinários (STROPPIA, 1999).

OLIVA NETO (2001) testou os antibióticos Penicilina V Ácida, clindamicina e cefamandol obtendo inibição do crescimento de bactérias contaminantes de caldo utilizando até 0,2; 0,40 e 1,45 µg/mL respectivamente. Testou também os produtos químicos: sulfito, nitrito, sulfato de cobre, etileno-bis-ditiocarbamato de zinco e manganês e

dimetilditilcarbamato, metilditiocarbamato, tiocianato, bromofenato, n-alquildimetilbenzil cloreto de amônio, lisozima e formaldeído.

O advento dos bioprotetores possibilita o controle da contaminação microbiológica de produtos e processos com grande segurança já que são aditivos classificados como GRASS (HOLZAPFEL-1995).

A nisina, uma bacteriocina polipeptídica produzida por *Lactococcus lactis*, a lisozima e ácidos fracos de bactérias lácticas são alguns dos bioprotetores amplamente utilizados na indústria de alimentos para o controle de contaminações microbiológicas.

Métodos que medem concentrações inibitórias por diâmetros ou áreas de discos de gradiente de concentração tem baixa repetibilidade e alto grau de erro, sendo os meios líquidos pouco influenciados pela difusão de nutrientes, e mais precisos nas quantificações (STUPPIELLO, 1993).

O método de MIC foi utilizado por MEGHROUS (1999) para medir a susceptibilidade de *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* e *Pediococcus*, e esporos de *Clostridium* e *Bacillus* às bacteriocinas: nisina A, nisina Z e pediocina. Pediocina se mostrou mais eficaz contra *Listeria monocitogenes*, mas nisina A e Z tiveram MIC de 23 a 69 µg/L contra o crescimento de esporos por 10 dias, enquanto que pediocina pode ter tido efeito germinativo de *B. subtilis*, conforme concluído pelo autor.

O método MIC também foi utilizado por BRADY (1992) para determinar o desenvolvimento de resistência à sete antibióticos e um antimicrobiano, e os valores de concentração inibitória mínima foram sempre crescentes para os organismos expostos aos resíduos destes compostos, sem no entanto apresentarem reações cruzadas à eles.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana (MIC) dos bioprotetores nisina, lisozima e MICROGARD 400 sobre os lactobacilos (*L. confusus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*), *Leuconostoc mesenteroides* e *Saccharomyces cerevisiae*.
- Avaliar a influência dos bioprotetores na cinética de fermentação alcoólica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Os microrganismos estudados são bactérias lácticas, Gram positivas, e constituem a flora usualmente contaminante do processo. *Lactobacillus confusus* foi cedido pelo banco de cepas da Cooperativa de Produtores de Açúcar e Álcool, Copersucar Piracicaba-SP, indicada como floculante isolada de fermentação alcoólica. *Lactobacillus fermentum* CCT-0663, *Lactobacillus plantarum* ATCC-8014 e *Leuconostoc mesenteroides* ATCC-9338 foram obtidos da Coleção de Culturas Tropical, Campinas-SP.

A bactéria isolada da moagem, *Leuconostoc mesenteroides* é produtora de gomas. Estes microrganismos são, segundo TROMBINI (1998), os mais resistentes ao tratamento térmico. Sua ativação foi realizada a partir de liófilos em caldo MRS (de Man Rogosa Sharpe), e armazenados a -18°C em meio Litmus Milk. Antes de cada experimento os tubos congelados foram incubados a 37°C até viragem do indicador ou coagulação do leite, e repicados em meio MRS a 1% para serem utilizados em um estado fisiológico de alta atividade nos testes (repiques de 15 h). Foram utilizados também um fermento comercial (Fleishmann) e uma levedura obtida de usina, predominantemente *S. cerevisiae* (CLE-álcool).

A Tabela 1 apresenta as bactérias utilizadas e mostra as características tecnológicas descritas pelas coleções às quais foram adquiridas.

Tabela 1: Linhagens testadas e suas características de floculação e produção de dextrana.

Linhagem	Floculante	Produtor de dextrana
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	não	sim
<i>Lactobacillus confusus</i>	sim	não
<i>Lactobacillus fermentum</i>	sim	não
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Não informado	não

3.2 Bioprotetores e Potencializadores

Nisina e lisozima foram obtidas junto à Rhodia S. A. S. como formulações comerciais dos bioprotetores NOVASIN (1.000.000 UI/g ou 2,5 g/100g) e NOVAGARD. Também foram adicionados aditivos com o objetivo de potencializar os efeitos dos bioprotetores. Os aditivos utilizados nos ensaios foram TWEEN 20 e EDTA sódico (Sigma PA.).

Todos os compostos foram pesados em balança analítica e adicionados de água estéril em balões volumétricos previamente expostos à luz ultravioleta por uma hora. As soluções foram ainda filtradas em filtro Millipore 22 µm.

Os bioprotetores em diversas concentrações foram então armazenados sob refrigeração. Sua adição foi realizada diretamente ao meio, na quantidade requerida para se obter a concentração desejada, por meio de pipeta automática de volume regulável (Finpipette – Labsystems A.G.).

As formulações comerciais dos bioprotetores testados estão relacionadas na Tabela 2.

Tabela 2: Bioprotetores testados, espectro de ação e princípios ativos.

Bioprotetor	Ação	Formulação comercial
Fermentado Láctico	BG+	Microgard 400
Lisozima	BG+, esporos, leveduras	Novagard
Nisina	BG+, esporulados	Novasin

3.3 Meios de Cultura

Foi utilizado caldo MRS (Difco) para todos os ensaios com as bactérias lácticas. Para a manutenção de culturas bacterianas foi utilizado o meio Litmus Milk – leite tornassolado (Difco).

Para o ensaio de cinética fermentativa foi utilizado meio sintético cuja composição está descrita na Tabela 3:

Tabela 3 - Composição do meio de fermentação (ANDRIETTA, 1995).

Componente do Meio	Concentração em g/L
Glicose	40,0 e 120,0*
KH ₂ PO ₄	5,0
NH ₄ Cl	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
KCl	1,0
Extrato de Levedura	6,0
pH = 5,0 após a esterilização	

* 40,0 g/L para repiques e teste de MIC e 120 g/L para cinética de fermentação.

3.4 Curva de cinética de crescimento das bactérias

A cinética de crescimento das bactérias foi estudada para que os inóculos fossem realizados na máxima atividade microbiana. Em cubetas de espectrofotômetro foi adicionado o meio MRS (5mL) e inoculados 15µL da cultura bacteriana (10^9 ufc/mL) de cada um dos

Estudo 1 – Determinação de Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Estudo de Cinética Fermentativa

microrganismos testados. Mediu-se a absorbância em espectrofotômetro a 500 nm periodicamente até que as leituras fossem maiores que 2 uAbs (limite de linearidade do aparelho). As curvas foram graficadas para análise do tempo ótimo de repique.

3.5 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Este ensaio objetivou determinar as concentrações efetivas mínimas dos bioprotetores para a inibição do crescimento das diferentes linhagens.

O método MIC por mudança de pH mostra a inibição do metabolismo de produção de ácidos e utiliza um indicador químico. Segundo STROPPA (1998), na fermentação alcoólica o consumo de açúcares para a produção de ácidos orgânicos por bactérias é pouco relevante para o rendimento do processo, ao contrário do efeito do crescimento microbiano e conseqüente floculação do fermento. Assim, o método de medida de MIC por turvação do meio foi utilizado neste trabalho para a avaliação de antimicrobianos na fermentação alcoólica.

A determinação da concentração inibitória mínima em meio líquido (MIC) consistiu na inoculação de 30 µL de cultura da bactéria láctica (10^9 ufc/mL), em tubos contendo 10 mL de caldo MRS, adicionados de bioprotetores em concentrações crescentes, reservando-se um tubo de cada cepa para controle de crescimento. Incubou-se a 37°C e realizaram-se leituras após 18 ± 1 horas. O valor da MIC referiu-se à concentração de bioprotetor do primeiro tubo de cultura que não apresentava turvação ou crescimento microbiano.

Os testes foram realizados em duas etapas distintas: um “screening” inicial em que os bioprotetores foram adicionados em concentrações diversas entre 1 mg/L e 1 g/L, e um refinamento em que as concentrações de bioprotetores eram dosadas em incrementos de 0,5 ppm de tubo para tubo. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.6 Medida de MIC dos Bioprotetores Sobre o Fermento (*S. cerevisiae*)

A inibição do crescimento do fermento frente aos bioprotetores foi medida pelo teste de MIC. Dez mililitros do meio de fermentação com 40 g/L de dextrose foram dispensados em tubos e esterilizados. Os tubos foram então adicionados assepticamente dos bioprotetores nas diferentes dosagens, para então serem inoculados de 0,1 mL cada um, de uma cultura de

fermento no mesmo meio. Os tubos foram incubados à 30°C até que se verificou visualmente a turvação no tubo controle.

3.7 Cinética Fermentativa Frente aos Bioprotetores

Este ensaio teve por objetivo determinar os efeitos dos bioprotetores sobre as velocidades de produção de álcool pelo fermento. Foi realizado utilizando-se bioprotetores nas concentrações mais altas de inibição obtidas no ensaio de MIC das bactérias.

3.7.1 Preparação da Fermentação

Frascos Erlenmeyer de 250 mL com tampões confeccionados em gaze, de maneira a permitir a troca de gases livremente, foram esterilizados.

Foram então adicionados os bioprotetores, nas concentrações de 90 ppm de nisina, seu dobro e a metade, para simular as dosagens da moagem e 10 ppm de nisina, 30 ppm de lisozima e 0,1% de Tween 20 para simular a dosagem na fermentação, de maneira asséptica reservando-se frascos sem bioprotetores para efeito de comparação.

3.7.2 Inoculação do Fermento

Foram utilizados dois tipos de fermento nos testes: fermento comercial prensado e cultura propagada no laboratório. O primeiro foi adicionado diretamente à fermentação, pesado em balança semi-analítica, enquanto que a cultura propagada foi produzida em meio líquido descrito na Tabela 3, e decantada.

O fermento foi adicionado diretamente ao meio de fermentação estéril no teor de 10% - ou 100g de fermento/kg de ART. A cada fermentação, após o inóculo, foram contadas as células de levedura por ml de meio em câmara de Neubauer em corante eritrosina B. Também foi determinada a viabilidade do fermento em porcentagem de células vivas.

O inóculo sólido foi colocado em todo o volume do meio de fermentação que foi distribuído em Erlenmeyers contendo as diferentes concentrações de bioprotetores. Este procedimento teve por objetivo minimizar erros de inoculação.

3.7.3 Condução da fermentação

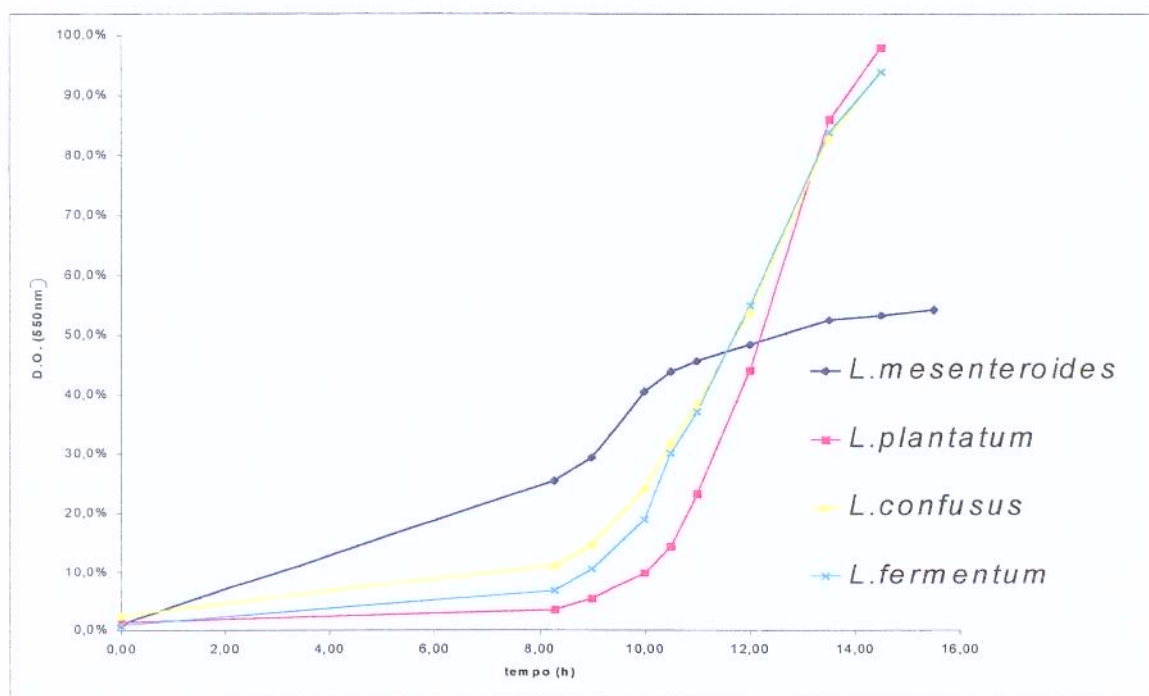
Após a inoculação, os frascos foram incubados a 32°C em “shaker” (Marconi) e pesados em balança semi-analítica periodicamente, anotados seus pesos, até que a não houvesse diferença significativa entre as pesagens indicando o fim da fermentação. Os frascos foram pesados sempre na mesma ordem de modo a diminuir o erro de cronometragem.

A evolução de CO₂ foi graficada por meio do software matemático Origin (Microcal) e adaptou-se uma função matemática (sigmoidal) a cada fermentação, que diferenciada em função do tempo resultou em um gráfico da derivada, cujo ponto de mínimo indicou o ponto de inflexão da função que corresponde ao ponto de máxima produção de CO₂ e, por correlação direta, ao ponto de máxima produção de etanol. O teste das médias de Tuckey foi utilizado para comparar os resultados de produção máxima de álcool dos ensaios adicionados dos bioprotetores e das testemunhas. Foi utilizado para tanto o programa de análise estatística (Statistica – StatiSoft Inc.)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cinética de Crescimento Bacteriano

A Figura 1 mostra o crescimento das quatro cepas testadas na ausência de



bioprotetores.

Figura 1: Curvas de crescimento bacteriano

A Figura 1 apresentada mostra que as bactérias do gênero lactobacilos têm um crescimento mais lento que o *Leuconostoc*. O tempo de 15 horas correspondente ao fim das medições foi padronizado para preparar inóculos para futuros experimentos com estes microrganismos, pois neste tempo de crescimento a cultura tem alta atividade e alta concentração de células. Os pontos referentes à densidade ótica para lactobacilos às 15 horas de crescimento não foram representadas no gráfico, pois os valores ultrapassaram a faixa de linearidade do equipamento.

4.2 Concentração Inibitória Mínima dos Bioprotetores Sobre as Bactérias Contaminantes

Uma varredura preliminar foi realizada para testar a susceptibilidade das cepas aos bioprotetores, utilizando-se a metodologia de MIC. A Tabela 4 mostra os resultados da varredura para determinar o efeito dos bioprotetores. As concentrações dos bioprotetores utilizadas foram 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 e 200 ppm. O sinal positivo indica susceptibilidade pela ocorrência de inibição total do crescimento ou detecção de um gradiente da intensidade de turvação da cultura, em alguma destas concentrações do respectivo bioprotetor.

Tabela 4: Susceptibilidade dos microrganismos aos bioprotetores.

Microrganismo	Nisina	Lisozima	Microgard
<i>Lc. mesenteroides</i>	+	+	-
<i>L. confusus</i>	+	-	-
<i>L. plantarum</i>	+	+	-
<i>L.fermentum</i>	+	-	-

(+) susceptível ao bioprotetor, (-) não susceptível ao bioprotetor.

Concentrações dos bioprotetores : 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 ppm.

Os resultados da Tabela acima mostram que Microgard foi ineficaz contra as bactérias testadas no pH do meio. Todas as bactérias estudadas mostraram-se sensíveis a nisina. A adição de lisozima não apresentou efeito sobre *L. confusus* e *L. fermentum*, sendo eficaz contra *Lc. mesenteroides* e *L. plantarum*. Foi realizada também uma avaliação do método MIC com relação ao inóculo inicial e tempos de leitura. Inóculos de 1% e 0,3% do total de meio de cultura geraram na varredura, valores de MIC para os microrganismos apresentados na Tabela 5.

Tabela 5a: MIC para inóculo 1%, leituras às 24 e 48 horas de incubação.

Microrganismo	Nisina 24 h (ppm)	Nisina 48 h (ppm)	Lisozima 24 e 48 h (ppm)	Microgard 24 e 48 h (ppm)
<i>Lc. mesenteroides</i>	20	100	>100*	>100*
<i>L. confusus</i>	4	5	>100*	>100*
<i>L. plantarum</i>	20	100	>100*	>100*
<i>L. fermentum</i>	5	10	>100*	>100*

* o microrganismo não foi inibido até a concentração indicada

Tabela 5b: MIC para inóculo 0,3%, 18 horas de incubação.

Microrganismo	Nisina (ppm)	Lisozima (ppm)	Microgard (ppm)
<i>Lc. mesenteroides</i>	90	∇ (50 a 100)**	>100*
<i>L. confusus</i>	2	>100*	>100*
<i>L. plantarum</i>	10	∇ (50 a 100)**	>100*
<i>L. fermentum</i>	10	>100*	>100*

* o microrganismo não foi inibido até a concentração indicada

**∇: gradiente de intensidade de turbidez na faixa de concentração indicada

Analisando os resultados obtidos observou-se que os valores de MIC foram altos e não se pôde observar alguns efeitos de inibição, que na realidade ocorreram com o inóculo de 0,3% para lisozima. Assim, e para haver possibilidade de comparações com a literatura, optou-se por realizar o teste de MIC conforme o método descrito por STUPIELLO (1993), o qual utiliza meio líquido e 0,3% de inóculo com leitura a 18 h de incubação. Os resultados de 24 e 48 horas mostraram aumento dos valores de MIC indicando que a inibição do crescimento foi dependente do tempo de incubação. Este resultado indicou uma necessidade de se estudar a cinética de inibição bacteriana pelos bioprotetores, já que os mecanismos de inibição produziram apenas retardamentos dos crescimentos e não inibição total dos microrganismos.

Os resultados também mostraram que o inóculo permaneceu viável nestas faixas de dosagens tornando inválida a realização de testes de concentração bactericida mínima.

A Tabela 6 apresenta os resultados de MIC expressos em ppm de Novasin:

Tabela 6: MIC para nisina (ppm de Novasin).

Microrganismo	MIC (ppm)	Média (ppm)	Desvio padrão
<i>Lc. mesenteroides</i>	90.0	83.3	5.8
	80.0		
	80.0		
<i>L. confusus</i>	3.0	3.3	1.5
	2.0		
	5.0		
<i>L. plantarum</i>	5.0	5.7	1.2
	5.0		
	7.0		
<i>L. fermentum</i>	7.0	9.0	1.7
	10.0		
	10.0		

L. confusus foi o microrganismo mais sensível a nisina enquanto que o *Leuconostoc mesenteroides* foi o mais resistente entre as bactérias testadas. O *L. fermentum* foi o mais resistente dentre os microrganismos contaminantes da fermentação (lactobacilos), exibindo valores de MIC de até 10 ppm de novasin, equivalente a cerca de 0,25 ppm de nisina pura.

L. plantarum (ATCC 8014) e *L. cremoris* (ATCC 9596) foram testados por MEGHROUS (1999) pelo método MIC, resultando em concentrações mínimas inibitórias de 0,15 µg/mL de nisina A (expressos em substância pura) para ambos os microrganismos, 0,34 e 0,15 µg/mL de nisina Z respectivamente e 22,1 µg/mL para pediocina sobre *L. plantarum*.

O *L. plantarum* teve MIC de 5,7 em média equivalente a cerca de 0,14 ppm de substância pura, resultado este condizente com os valores apresentados da literatura.

A Tabela 7 apresenta os resultados de MIC para nisina com adição de 1mMol de EDTA por ppm de nisina.

Tabela 7: MIC para nisina + EDTA (1ppm para 1mMol).

Microrganismo	Ensaio	MIC (ppm)	Média (ppm)	Desvio padrão
<i>L. confusus</i>	1	1,5	3,3	1,5
	2	2,0		
	3	3,0		
<i>L. plantarum</i>	1	4,0	4,0	0,0
	2	4,0		
	3	4,0		
<i>L. fermentum</i>	1	3,0	3,6	0,6
	2	3,0		
	3	4,0		

A adição de EDTA, na proporção preconizada por THOMAS (2000), mostrou-se favorável para a diminuição dos valores de MIC para as bactérias contaminantes da fermentação, causando reduções de até 60% em relação a nisina apenas.

Ensaio preliminares foram realizados para investigar a combinação de nisina com lisozima e nisina com EDTA. A proporção indicada da combinação nisina lisozima de 1 para 3 foi considerada melhor por CHUNG (2000), dado o custo quase 3 vezes maior da nisina em comparação com lisozima. A Tabela 8 mostra o teste de MIC para a proporção de 1 de nisina para 3 de lisozima.

Tabela 8 MIC para Nisina + Lisozima (1 para 3).

Microrganismo	MIC (ppm)
<i>Lc. mesenteroides</i>	90
<i>L. plantarum</i>	10

A adição de lisozima na proporção de 3 partes para 1 de nisina não reduziu o valor de MIC. Os valores exatos de MIC de *L. fermentum* e *L. confusus* não foram determinados, pois não foi observada ação inibitória de lisozima sobre estas bactérias. No entanto sinergismo foi descrito na literatura revisada que sugere a necessidade de se realizar testes para investigar estas interações. A Tabela 9 apresenta o MIC de nisina adicionada de Tween 20 a 0,1% no meio de cultura.

Tabela 9: Resultados de MIC para Nisina + Tween 20 (0,1%).

Microrganismo	MIC (ppm)
<i>Lc. mesenteroides</i>	90
<i>L. confusus</i>	5
<i>L. plantarum</i>	10
<i>L. fermentum</i>	15

A adição de TWEEN 20 a 0,1% no meio não afetou significativamente os valores de MIC. A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos para lisozima em altas dosagens (de 100 ppm a 1g/L).

Tabela 10: MIC para lisozima em altas concentrações.

Microrganismo	MIC (ppm)
<i>Lc. mesenteroides</i>	1000
<i>L. confusus</i>	>1000*
<i>L. plantarum</i>	700
<i>L. fermentum</i>	>1000*

* o microrganismo não foi inibido até a concentração indicada.

Os resultados mostram que a susceptibilidade a lisozima dos microrganismos ocorre em altas concentrações e que *L. confusus* e *L. fermentum* não se mostram susceptíveis a qualquer dosagem indicando resistência ao antimicrobiano. OLIVA NETO (2001) não observou ação inibitória de lisozima, até concentrações de 124 ppm do bioprotetor para *L. fermentum*, *Lc. mesenteroides* e *S. cerevisiae*.

4.3 Determinação de MIC de leveduras

Segundo OLIVA NETO (2001), agentes químicos e antibióticos tem efeito inibitório sobre as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, e que seu uso deve ser restrito ou realizado em condições especiais na fermentação alcoólica, preconizando-se o uso de antibióticos seletivos. Sendo assim o ensaio de MIC para as leveduras foi realizado utilizando-se as concentrações de MIC máximo obtido para as bactérias estudadas.

A Tabela 11 mostra os resultados de MIC para bioprotetores:

Tabela 11: Valores de MIC para bioprotetores contra levedura.

Bioprotetor	Proporção p/p	MIC (ppm)
Nisina	-	>90*
Lisozima	-	>1000*
Nisina + EDTA	1ppm: 1mMol/L	>90*
Nisina + lisozima + Tween 20	1ppm: 3ppm: 0,1%	>10*

* : o microrganismo não foi inibido até a concentração indicada

Os resultados mostram que não houve inibição do fermento aos níveis testados para os bioprotetores.

4.4 Cinética da Fermentação Alcoólica

Dados de produções específicas e de crescimento podem evidenciar problemas de fermentação associados à cepa ou matéria-prima do processo (ANDRIETTA, 1995). Assim, o estudo da velocidade de conversão e de níveis de produção de etanol são recomendados para caracterizar o estado do fermento frente à manipulação de parâmetros de processos.

Em testes de cinética é importante minimizar interferências de modo a não causar inibição ao desenvolvimento da fermentação. Um fator de inibição importante relaciona-se aos teores de açúcar no meio e álcool produzido, conforme observado por SALGUEIRO (1998) em seu trabalho utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces baianus*, em que concentrações de etanol superiores a 16% (v/v) geraram perda de aminoácidos intracelulares e indução da morte celular.

Observou-se boa correlação entre a produção de álcool e a de gás carbônico em uma relação de um para um em peso, já que estequiometricamente pode-se esperar que 100 kg de glicose fermentada produzam 51,1 kg de etanol e 48,9 kg de CO₂ (FINGERUT, s.d.).

Foram obtidos gráficos de evolução de produção de etanol, e o procedimento de obtenção das produtividades máximas $P_{\text{máx}}$ está exemplificado a seguir.

A Figura 2 mostra a evolução de etanol (calculado a partir da produção de CO_2) do ensaio sem adição de bioprotetores (controle) e com adição de 180 ppm de nisina.

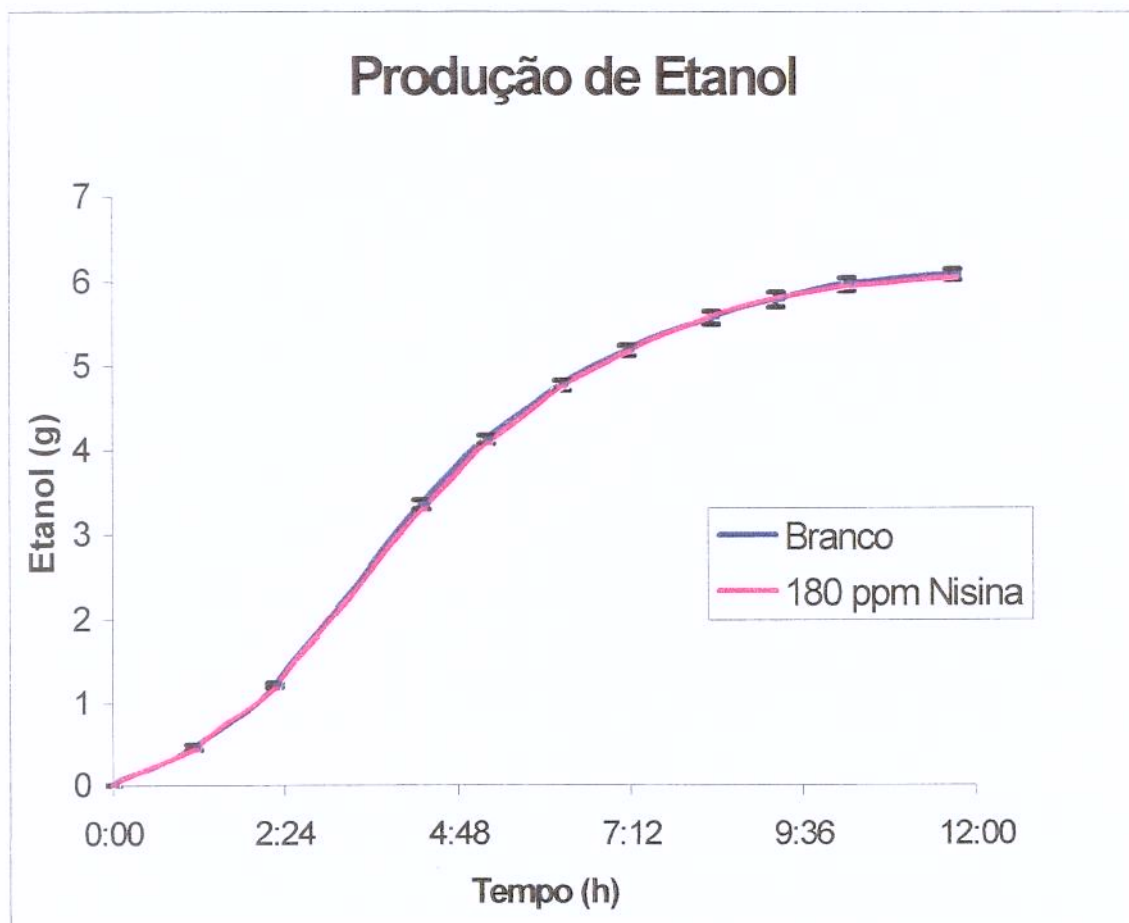


Figura 2: Produção de etanol com e sem adição de bioprotetores.

O gráfico apresentado mostra resultados médios de três experimentos de fermentação por ensaio. A curva do ensaio com 180 ppm de nisina acompanha a curva do controle, sobrepondo-se em grande parte dos pontos e internamente aos desvios padrões calculados para os pontos do branco.

A Figura 3 exemplifica os resultados de evolução de CO_2 e o ajuste da função sigmoideal.

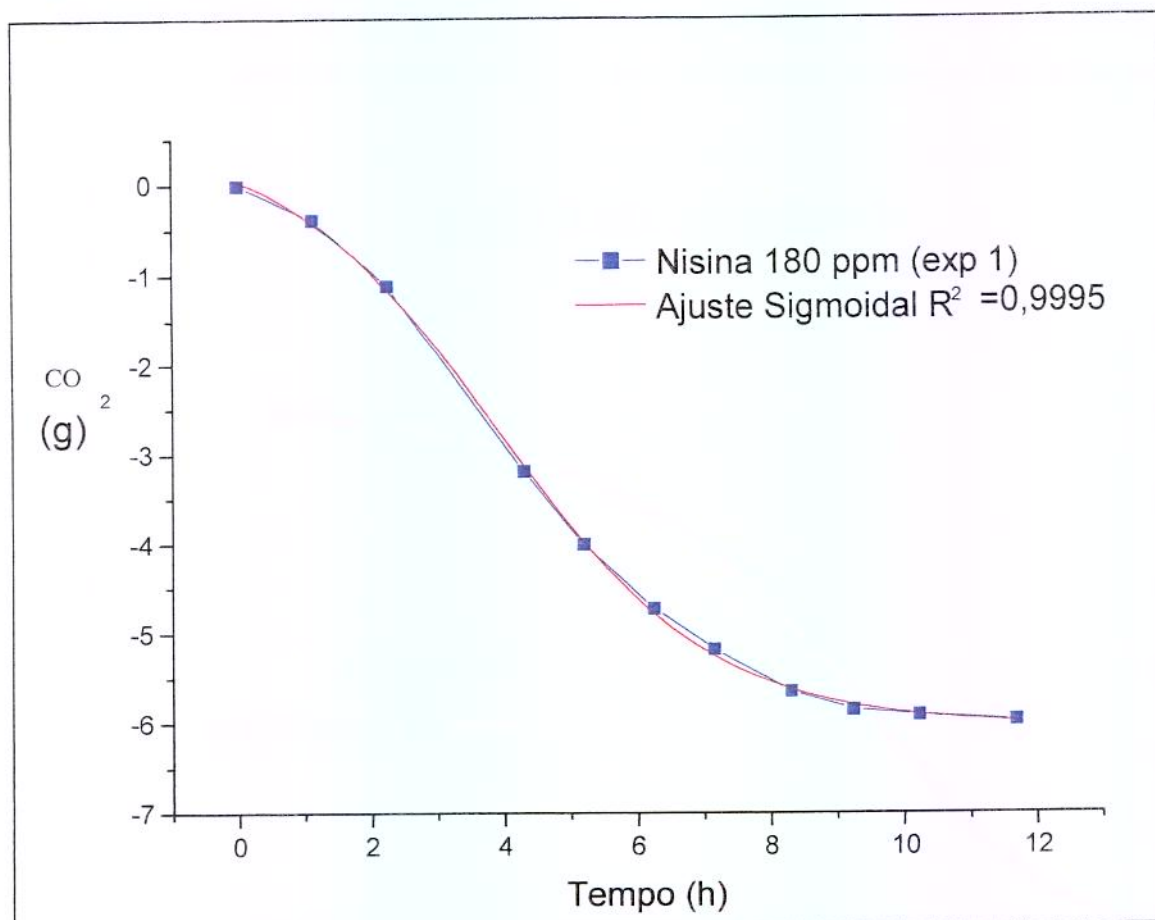


Figura 3: Evolução de CO₂ e ajuste de função sigmoide para exp. com 180 ppm de nisina.

O exemplo acima resulta na função ajustada abaixo:

$$CO_2 = 0,604 / (1 + e^{(t-3,923)/1,605}) - 6,033$$
, onde CO₂ é a evolução da perda de massa do gás em gramas e t é o tempo em horas.

A Figura 4 mostra o gráfico da função derivada.

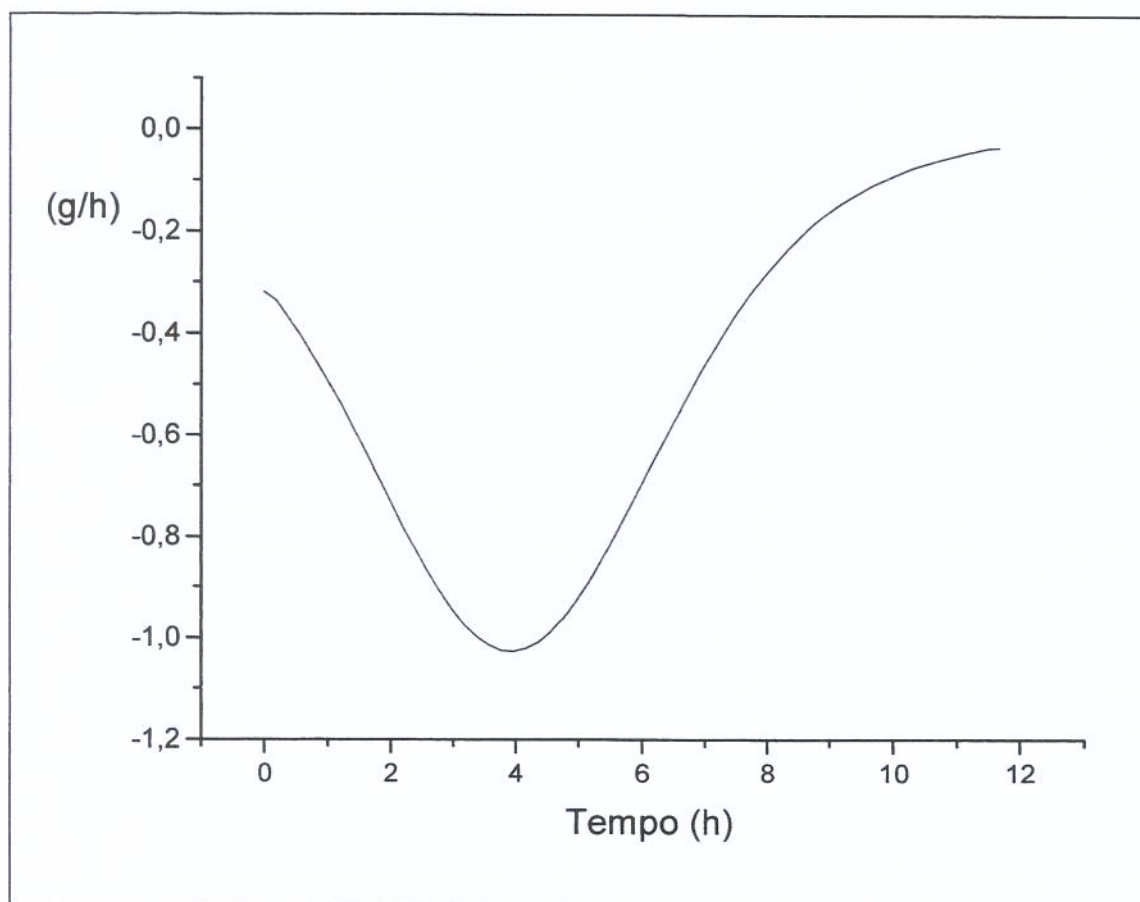


Figura 4: Gráfico da derivada e ponto de mínimo.

O ponto de mínimo foi obtido graficamente e corresponde ao valor de $-1,02 \text{ g.h}^{-1}$. Os resultados foram utilizados para compor as tabelas apresentadas para cada ensaio de cinética fermentativa, representando a evolução de etanol, que foi obtido da correlação direta com a evolução de CO_2 . O resultado de taxa máxima de produção de etanol para o exemplo foi de $1,02 \text{ g}$ de etanol produzidos/h.

A Tabela 12a mostra os valores de taxa máxima de produção de ensaios de fermentação desenvolvidos com inoculação de $3,56 \times 10^8$ células de levedura por mL de inóculo, e 2,2% de células mortas, de cultura de *S. cerevisiae* (Cle álcool), com adição de nisina aos níveis de inibição de *Leuconostoc mesenteroides*, 90 ppm, com o objetivo de simular as altas dosagens do bioprotetor na moenda que poderiam estar presentes na fermentação alcoólica.

Tabela 12a: Resultados de velocidade máxima de produção de etanol para levedura Cle álcool.

Nisina (ppm Novasin)	Ensaio	P _{máx} gh ⁻¹	MÉDIA gh ⁻¹	Desvio Padrão	CV (%)
0	1	0,350	0,380	0,028	7,41
	2	0,406			
	3	0,383			
45	4	0,352	0,358	0,035	9,75
	5	0,396			
	6	0,327			
90	7	0,368	0,375	0,013	3,55
	8	0,366			
	9	0,390			
180	10	0,373	0,359	0,012	3,32
	11	0,351			
	12	0,354			

A Tabela 12b mostra o teste de médias (Tuckey) referente aos resultados da Tabela 12a.

Tabela 12b: Teste de Tuckey ($p < 0,05$) para médias de $p_{máx}$ de etanol para Cle álcool.

Nisina (ppm de Novasin)	0	45	90	180
Médias	0,379	0,358	0,374	0,359
0		0,709	0,993	0,737
45	0,709		0,839	0,999
90	0,993	0,839		0,862
180	0,737	0,999	0,862	

Em negrito: valores não significativos.

O teste de Tuckey revelou que as médias não foram significativamente diferentes entre si confirmando que não houve influência da nisina sobre a velocidade máxima de produção de etanol. A Tabela 13 apresenta os resultados de taxa máxima de produção de etanol sobre fermentações conduzidas com inóculos de 10% do teor total de dextrose no meio, perfazendo 12 g/L de levedura prensada comercial, com adição de nisina. A contagem de leveduras no inóculo foi de $7,12 \times 10^9$ células/mL e 3,9% de células mortas.

Tabela 13a: Resultados de $p_{\text{máx}}$ de etanol por levedura comercial.

Nisina (ppm Novasin)	Ensaio	$P_{\text{máx}}$ gh^{-1}	MÉDIA gh^{-1}	Desvio Padrão	Desvio (%)
0	1	0,987	0,988	0,016	1,62
	2	1,005			
	3	0,973			
45	4	1,002	0,999	0,003	0,30
	5	0,996			
	6	0,999			
90	7	0,993	1,005	0,013	1,25
	8	1,003			
	9	1,018			
180	10	1,027	0,995	0,028	2,82
	11	0,980			
	12	0,977			

O inóculo da levedura prensada foi preparado em frasco contendo meio e a seguir distribuído para os frascos de fermentação, o que reduziu significativamente os erros de inoculação como pode ser observado na Tabela acima. Comparativamente, os desvios obtidos na Tabela 12a foram resultantes do método de inoculação, uma vez que o fermento foi dosado em meio líquido para cada um dos frascos de fermentação.

Os resultados obtidos para a cultura pura de *S. cerevisiae* foram ratificados neste teste para a levedura comercial, indicando que os altos níveis de dosagem de nisina não afetam a

Estudo 1 – Determinação de Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Estudo de Cinética Fermentativa
 taxa de produção de etanol de modo significativo. A Tabela 13b demonstra a observação pelo teste de médias.

Tabela 13b: Teste de Tuckey ($p < 0,05$) para médias de $p_{\text{máx}}$ de etanol por CLE álcool.

Nisina (ppm)	0	45	90	180
Médias	0,988	0,999	1,004	0,994
0		0,873	0,671	0,968
45	0,873		0,977	0,989
90	0,671	0,977		0,892
180	0,968	0,989	0,892	

Em negrito: valores não significativos.

A Tabela 14 mostra resultados de uma combinação de bioprotetores otimizada para bactérias contaminantes da fermentação sobre a levedura comercial. O inóculo foi procedido de modo semelhante com cerca de 10^{10} células/mL. Como se tratou de uma combinação fixa de bioprotetores não se realizou o teste em dosagens duplas ou à metade.

Tabela 14a: Resultados de velocidade máxima de produção de etanol por levedura comercial sob efeito de combinação de bioprotetores.

Nisina, Lisozima e Tween (10 ppm, 30 ppm e 0,1%)	Ensaio	$P_{\text{máx}}$ gh^{-1}	MÉDIA gh^{-1}	Desvio Padrão	Desvio (%)
Branco	1	0,987			
	2	1,005	0,988	0,016	1,62
	3	0,973			
Bioprotetores	4	1,002			
	5	0,996	0,999	0,003	0,30
	6	0,999			

A Tabela 14b apresenta os testes de média para os resultados obtidos na Tabela 14a.

Tabela 14b: Teste de Tuckey ($p < 0,05$) para médias de produção máxima de etanol por levedura comercial sob efeito da combinação de bioprotetores.

Booleano	0	1
Bioprotetores		
Médias	1,060	1,044
0		0,132
1	0,132	

Em negrito: valores não significativos.

O teste de média mostrou que os valores das médias das taxas de produção de etanol entre controle e ensaio adicionado de bioprotetores, não são diferentes à significância de 95%.

5 CONCLUSÕES

- A nisina se mostrou um bioprotetor potencialmente eficaz no controle de bactérias lácticas contaminantes da fermentação alcoólica (*Lactobacillus*). Seu uso combinado com EDTA pode reduzir os valores de MIC de nisina de 9,0 ppm para 3,6 ppm para *L. fermentum*.
- Concentrações altas de nisina, de cerca de 90 ppm são necessárias na moenda para inibir o *Leuconostoc mesenteroides*. Os bioprotetores foram pouco eficazes para inibir contaminações por leveduras nesta etapa do processo.
- Por não agirem contra leveduras, os bioprotetores provaram ser seguros para o processo de fermentação.
- Os testes de cinética fermentativa ratificaram a conclusão acima, indicando que o parâmetro cinético - taxa máxima de produção de etanol, não foi afetado pelos bioprotetores quando dosados na moenda ou na fermentação em combinações sinérgicas. As taxas máximas de produção de etanol são muito influenciadas pelo teor do inóculo, e erros devem ser minimizados nesta fase dos ensaios.

6 BIBLIOGRAFIA

1. ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUEZ, M.I.. Método de Caracterização de Leveduras de processo Utilizando Parâmetros Cinéticos e Produção Específica. **STAB**. V. 13 (4), 22-25, 1995.
2. Apostila COPERUCAR **Caderno COPERUCAR** – Série Industrial, no 020, 1ª Edição, Fevereiro, 1988.
3. BRADY M.S.; KATZ S.E.. Invitro effect of multiple antibiotic antimicrobial residues on the selection for resistance in bacteria. **Journal of AOAC International**. 75: (4) 738-742, 1992.
4. CABO, M.L.; MURADO, M.A.; GONZALES, M.P.; PASTORIZA, L. A Method for Bacteriocin Quantification. **Journal of Applied Microbiology**. 87:2 907-914, 1999.
5. CHUNG, WILFRED; HANCOCK, ROBERT E.W. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. Volume: 60(1) 25-32, 2000.
6. FINGUERUT, J.; LUCREDI, H.A.; LEIMER, K.H. ; ROSSELL, E.D.V. Estequiometria da Fermentação Alcoólica a Partir do Caldo de Cana. **Revista Copersucar**. [s.n.t].
7. GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas na fermentação alcoólica**. Campinas 1989. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
8. HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U.. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**. 24: (3) 343-362 JAN 1995.
9. HYNES, -S.H.; KJARSGAARD, -D.M.; THOMAS, -K.C.; INGLEDEW, -W.M. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation.

- Journal-of-Industrial-Microbiology-and-Biotechnology (USA).** (Apr 1997). v. 18(4) p. 284-291, 1997.
10. MEGHROUS, J., LACROIX, C., SIMARD, R. E. The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. **Food Microbiology**. Vol. 16, 2 105-114, 1999.
 11. OLIVA NETO, P. **Estudo de diferentes Fatores que Influenciam o Crescimento da População Bacteriana Contaminante da Fermentação Alcoólica por Leveduras.** Campinas 1995. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP).
 12. OLIVA NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces Cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria from the Alcohol Industry to Several Antimicrobial Compounds. **Braz. J. Microbiol.** V.32 (1)10-14, 2001.
 13. OLIVEIRA, R.M.; HORII, J. Viabilidade Celular De *Saccharomyces Cerevisiae* Em Cultura Mista Com *Lactobacillus Fermentum*. **Scientia Agricola**. 55-3, 1998.
 14. SALGUEIRO, S.P.; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J.M. Ethanol-induces leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to Yeast Ethanol Tolerance and Alcohol Fermentation Productivity. **Applied and Environmental Microbiology**. 1998, 54(4) 903, 909.
 15. STROPPA, C.T.; SERRA, G.; ANDRIETTA, M.G.S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S.R.. Consumo de Açúcar por Bactérias Contaminantes da Fermentação Alcoólica Associado ao Uso de Antibióticos. **STAB**. 1998, 16(3), 35-38.
 16. STROPPA, C.T.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; SERRA, G.E.. Use of penicillin and monensin to control bacterial contamination of Brazilian alcohol fermentations. **International Sugar Journal**. 102(1214)78-79, 81-82.1999.

17. STUPIELLO, M.G.S.. **Avaliação de Metodologia para Estudo da Ação de Alguns Antimicrobianos frente a Bactérias Gram + Isoladas da Fermentação.** Tese de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, 1993.
18. THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.; DELVES-BROUGHTON. **J. Natural Food and Antimicrobial Systems.** [s.n.t.] Ed. CRC press, Boca Raton, 2000.
19. TROMBINI, M.A.M.; ROVANHOL, A.A.; VITTI, L.S.S.; BEDA,D.F.; PORTO, R.C.B.; SÁ, J.S.. Causas da Contaminação e Suas Consequências em Usinas de Açúcar e Álcool. **STAB.V.16 (6)**18, 1998.

ESTUDO 2 - OTIMIZAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE BIOPROTETORES SOBRE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.

RESUMO

Um planejamento fatorial completo 2^4 foi utilizado para otimizar as concentrações de dosagem dos bioprotetores: nisina (2 a 10 ppm de Novasin) e lisozima (6 a 30 ppm de Novagard); e potencializadores: EDTA (0 a 0,22%) e Tween 20 (0 a 0,1%) contra bactérias lácticas contaminantes da fermentação alcoólica. As variáveis dependentes foram o tempo de fase lag e taxa máxima de crescimento das bactérias *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*. O MIC foi determinado para balizar as faixas do planejamento.

Modelos matemáticos foram obtidos para o tempo de fase lag para ambos os microrganismos. Não houve diminuição das taxas máximas de crescimento pelos bioprotetores exceto pequeno efeito de nisina sobre *L. fermentum*.

Nisina foi eficaz para prolongar a fase lag de ambos os microrganismos e observou-se sinergismo com lisozima para *L. plantarum* e com Tween 20 para *L. fermentum*. EDTA foi antagônico à nisina. As concentrações de uso para a fermentação alcoólica foram determinadas em 10 ppm de nisina, 30 ppm de lisozima e 0,1% de Tween 20.

Palavras Chave: bioprotetores, bactérias lácticas, nisina, lisozima, fermentação alcoólica.

1 INTRODUÇÃO

As contaminações microbianas da indústria sucro-alcooleira têm sido controladas pela adição de antibióticos e pela acidificação do leite de levedura (fermento centrifugado). O uso de antibióticos na fermentação induz o fenômeno de resistência microbiana gerando perdas de eficiência do antimicrobiano, com necessidade de aumentar as doses ou substituir princípios ativos. Para tanto, a indústria de álcool tem testado continuamente novos antibacterianos.

O tempo de fermentação ou ciclo fermentativo influi no desenvolvimento da população bacteriana em fermentações alcoólicas: ciclos prolongados favorecem o crescimento bacteriano e competição com a levedura (OLIVA NETO, 1995). Ciclos fermentativos de 10 a 12 horas são comuns em usinas e destilarias.

KAJI (1989) não pôde recuperar bactérias do gênero *Leuconostoc* presentes no início das fermentações ao final dos ciclos, o que indicou uma baixa tolerância ao etanol dos microrganismos – concentrações de 3% de etanol no vinho são capazes de reduzir em mais de 50% a velocidade específica de crescimento. Estas observações restringem a importância do gênero *Leuconostoc* na fermentação.

Bioprotetores são substâncias com atividade antimicrobiana, provenientes de alimentos ou obtidas de microrganismos de grau alimentício utilizadas para aumentar a segurança de alimentos e proteger processos de produção.

O método de MIC foi utilizado para medir a susceptibilidade de *Listeria*, *Clostrídios*, *Staphylococos*, *Lactococos*, *Lactobacilos*, *Micrococos* e *Pediococos*, e esporos de *Clostrídios* e *Bacilos* às bacteriocinas: nisina A, nisina Z e pediocina. Pediocina se mostrou mais eficaz contra *Listeria monocitogenes*, mas nisina A e Z tiveram MIC de 23 a 69 µg/L contra o crescimento de esporos por 10 dias, enquanto que pediocina pode ter tido efeito germinativo de *B.subtilis*. *L. plantarum* (ATCC 8014) e *L. cremoris* (ATCC 9596) foram testados pelo método MIC, resultando em concentrações mínimas inibitórias de 0,15µg/mL de nisina A (expressos em substância pura) para ambos os microrganismos, 0,34 e 0,15 µg/mL de nisina Z respectivamente e 22,1 µg/ml para pediocina sobre *L. plantarum* (MEGHROUS, 1999).

A interação dos cátions cálcio, magnésio, ferro e dos anions citrato com lisozima foi estudada, não podendo ser observada qualquer afinidade entre Ca^{++} e Mg^{++} e lisozima nos pHs de 6 e 9, enquanto que Fe^{3+} apresentou afinidade com a enzima causando coordenação e diminuição da carga positiva, indicando a perda de um próton de um grupamento amônio da molécula. O anion citrato interagiu com a lisozima por ligações eletrostáticas dependentes da carga da proteína (CROGUENEC, 2000).

A adição de 0,32 AU/mL de bacteriocina acidocina a 50 mg/L de lisozima inibiu em 82,4% (redução percentual do valor da absorbância em relação ao controle) o crescimento da cultura do microrganismo indicador *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *lactis* LTI 30, contra apenas 58,5% de inibição por lisozima apenas, tendo sido indicado sinergismo entre os antimicrobianos (CHUMCHALOVÁ, 1998).

CATTE (1999) utilizou um planejamento fatorial 2^3 completo para investigar o efeito de cloreto de sódio e fumaça líquida (substâncias potencialmente inibidoras de crescimento microbiano) e condições de atividade de água no crescimento de *L. plantarum* em meio MRS, medido por densidade ótica à 600 nm. Foram medidas as respostas: tempo de fase lag, tempo de crescimento e acidificação do meio. O tratamento dos dados indicou que a atividade de água e teor de sal influenciaram o crescimento sem interações significativas, mas a fumaça líquida não influenciou nem o crescimento nem a acidificação.

2 OBJETIVO

- Estudar os efeitos da combinação dos bioprotetores através de planejamento fatorial completo 2^4 , na cinética de crescimento (tempo de fase lag e taxa máxima de crescimento) dos contaminantes da fermentação alcoólica *L. fermentum* e *L. plantarum*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Os microrganismos estudados são bactérias lácticas, Gram positivas, e constituem a flora usualmente contaminante do processo de fermentação alcoólica. *Lactobacillus*

fermentum CCT-0663 e *Lactobacillus plantarum* ATCC-8014 foram obtidos da Coleção de Culturas Tropical, Campinas-SP.

Sua ativação foi realizada a partir de líofilos em caldo MRS (de Man Rogosa Sharpe) e armazenados a -18°C em meio Litmus Milk. Antes de cada experimento os tubos congelados foram incubados a 37°C até viragem do indicador ou coagulação do leite e repicados em meio MRS a 1% para serem utilizados em um estado fisiológico de alta atividade nos testes: repiques de 15 h.

3.2 Bioprotetores

Nisina e lisozima foram obtidas junto à Rhodia S.A.S. como formulações comerciais dos bioprotetores NOVASIN (1.000.000 UI/g) e NOVAGARD. Também foram adicionados aditivos com o objetivo de potenciar os efeitos dos bioprotetores. Os aditivos utilizados nos ensaios foram TWEEN 20 e EDTA sódico (Sigma PA.). As concentrações dos bioprotetores foram expressas em ppm de formulação.

Todos os compostos foram pesados em balança analítica e adicionados de água estéril em balões volumétricos previamente expostos à luz ultravioleta por uma hora. As soluções foram ainda filtradas em filtro Millipore 22 μm .

Os bioprotetores em diversas concentrações foram então armazenados sob refrigeração. Sua adição foi realizada diretamente ao meio, na quantidade requerida para se obter a concentração desejada, por meio de pipeta automática de volume regulável (Finpipette – Labsystems A.G.).

3.3 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Este ensaio teve por objetivo determinar as concentrações efetivas mínimas dos bioprotetores para a inibição do crescimento das diferentes linhagens.

3.3.1 Medida da Ação dos Bioprotetores Sobre Bactérias

O método de concentração inibitória mínima em meio líquido consiste na inoculação de 30 μL de cultura (10^9 ufc/mL), em tubos contendo 10 mL de caldo MRS, adicionados de

bioprotetores em diversas concentrações, reservando-se um tubo de cada cepa para controle de crescimento. Os tubos foram incubados a 37°C e foram realizadas leituras às 18, 24 e 48 horas ou quando houvesse crescimento do controle observando-se a turvação do meio. O resultado anotado foi à concentração referente ao tubo com menor teor de bioprotetores adicionados, em que houve inibição.

Os testes foram realizados em duas etapas distintas: uma varredura inicial em que os bioprotetores foram adicionados em concentrações diversas entre 1 mg/L e 1 g/L, e um refinamento em que as concentrações de bioprotetores foram dosadas em incrementos de 1 ppm de tubo para tubo. Foram realizadas triplicatas dos testes.

3.4 Estudo da Cinética de Crescimento das Bactérias Frente aos Bioprotetores

Os microrganismos *L. fermentum* e *L. plantarum*, foram utilizados como alvos para se estudar uma composição otimizada das associações possíveis entre bioprotetores que se mostraram eficazes e aditivos.

Foi utilizado um planejamento experimental para este fim e realizou-se cada um dos experimentos como segue:

Em cubetas de espectrofotômetro estéreis adicionou-se 5ml de caldo MRS esterilizado previamente adicionado dos bioprotetores nas concentrações previstas para o ensaio. Inoculou-se 0,15 µL de uma cultura de 15±2 h do microrganismo testado (10^9 ufc/mL), para se obter uma densidade óptica de 0,030 a 550 nm em cada cubeta. Preparou-se também um ensaio sem bioprotetores como prova pela adição de meio estéril e inóculo. O tempo foi anotado e cada cubeta foi incubada a 37°C. Foram tomadas leituras de densidade óptica periodicamente, durante o crescimento do microrganismo, em comprimento de onda de 550 nm em espectrofotômetro (Spectronic 21 D – Milton Roy). Um branco contendo caldo MRS estéril do mesmo lote foi utilizado para zerar o aparelho.

3.4.1 Correlação entre densidade ótica e contagens de unidades formadoras colônias

Uma correlação entre densidade ótica e concentração celular foi obtida pelo plaqueamento de culturas em diferentes estágios de crescimento, medidas as respectivas densidades óticas em espectrofotômetro (B 495 - Micronal).

As culturas em caldo MRS foram inoculadas com 0,3% de inóculo (10^9 ufc/mL) de 15 horas de incubação, incubadas a 37°C e suas densidades óticas foram medidas periodicamente. A cada medida tomou-se uma amostra que foi diluída sucessivamente em água peptonada e então plaqueada em duplicata em meio MRS agar em profundidade. As placas foram incubadas em estufa por 48 horas e o número de colônias foi contado.

3.4.2 Planejamento Experimental

Um planejamento experimental fatorial completo foi realizado a fim de estudar os efeitos dos bioprotetores, cujos valores de MIC foram obtidos anteriormente. Foram realizados os experimentos apenas para bioprotetores que tiverem alguma atividade antimicrobiana, e o número de bioprotetores adicionado do número de aditivos foi a ordem do planejamento. Assim realizou-se um planejamento completo 2^4 .

As faixas escolhidas foram as concentrações de bioprotetores e aditivos no valor de MIC para o microrganismo alvo (+1), e concentração mínima em que houve aumento da fase lag do microrganismo alvo (observado para os bioprotetores no teste de MIC) ou zero ppm, quando não houve inibição ou para aditivos (-1). O experimento de ponto central foi realizado em triplicata.

A Tabela 1 mostra os níveis escolhidos para a realização do planejamento.

Tabela 1: Níveis das variáveis independentes

Bioprotetor/ Pontencializador	nível -1	ponto central	nível +1
nisina	2 ppm	6 ppm	10 ppm
lisozima	6 ppm	18 ppm	30 ppm
EDTA	0	0,11%	0,22%
Tween 20	0	0,5%	0,1%

As variáveis de resposta analisadas foram tempo de fase lag e velocidade específica de crescimento, obtidas pela construção de gráficos de cinética de crescimento microbiano. O tempo de fase lag foi obtido pela medida do tempo (horas) na curva de crescimento em que o acréscimo da absorbância da cultura era de 0,1 uAbs e corresponde à fase de adaptação do microorganismo ao meio, antes de um crescimento exponencial da cultura.

A taxa de crescimento máxima foi obtida da diferenciação gráfica da curva, obtendo-se a curva das derivadas, cujo ponto de máximo corresponde à taxa de crescimento máximo, $\mu_{\text{máx}}$ (uAbs.h⁻¹). Este parâmetro corresponde à máxima velocidade de multiplicação da cultura microbiana e indica a inclinação máxima da curva de crescimento.

Os efeitos sinérgicos e antagônicos entre os bioprotetores foram observados por meio do estudo da Tabela de efeitos e interações gerada pelo programa STATISTICA (StatSoft, Inc.). Para os dados que forneceram um modelo validado por análise de variância (ANOVA), foi obtida uma equação matemática do fenômeno.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 e 2 estão apresentadas a correlações entre a absorbância e o log da contagem de viáveis em ufc/ml de *L. fermentum*.

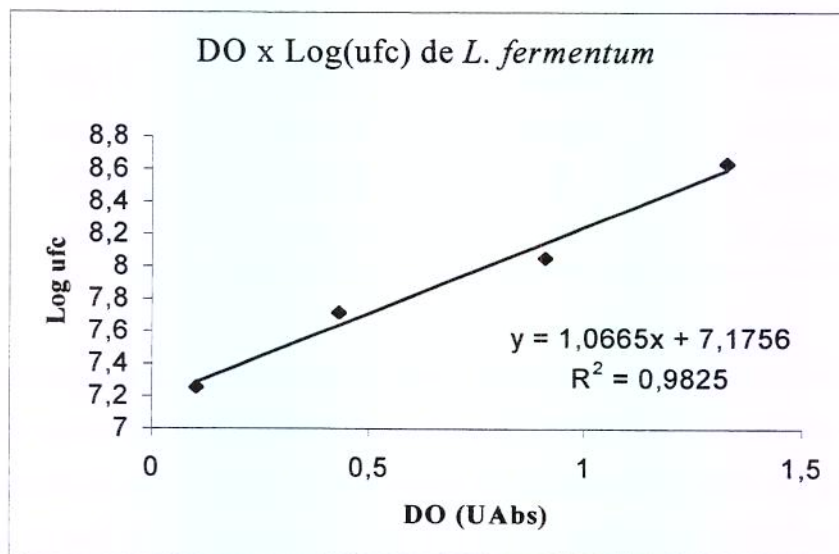


Figura 1: Valores de contagem de ufc do *L. fermentum* em função da densidade ótica

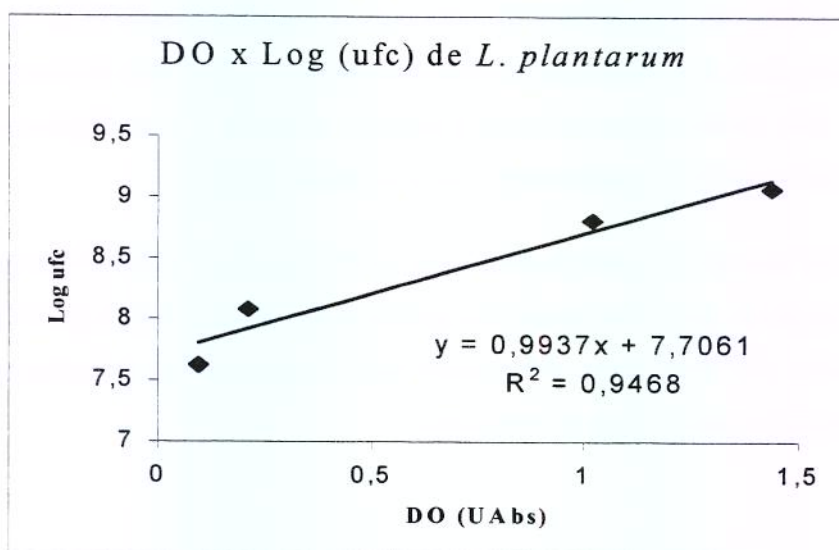


Figura 2: Valores de contagem de ufc do *L. plantarum* em função da densidade ótica da cultura

A correlação indica que o incremento de 0,1 unidades de absorbância da cultura de ambos os microrganismos inoculados a 0,03 UAbs, resulta em culturas com número de

microrganismos da ordem de 10^7 ufc/mL, em concordância com a literatura; KAJI (1989) relatou que fermentações só seriam afetadas por contaminantes que estivessem em concentrações celulares altas, da ordem de 10^7 ufc/mL.

A Tabela 2 mostra os resultados do teste de MIC para a nisina

Tabela 2: Resultados de MIC para nisina expressos em ppm de Novasin.

Microrganismo	Ensaio	MIC (ppm)	Média (ppm)	Desvio padrão (ppm)
<i>L. plantarum</i>	1	5.0	5.7	1.2
	2	5.0		
	3	7.0		
<i>L. fermentum</i>	1	7.0	9.0	1.7
	2	10.0		
	3	10.0		

Foram obtidos os valores de MIC para a nisina e para a lisozima contra os microrganismos *L. plantarum* e *L. fermentum*. A Tabela 2 mostra que o microrganismo mais resistente a nisina foi o *L. fermentum*, exibindo valores de até 10 ppm de Novagard para inibição do crescimento até 18 horas após a inoculação.

Os valores de MIC para *L. plantarum* foram menores, mas observou-se que a inibição para este microrganismo foi transitória e crescimento foi observado para *L. plantarum* após 48 horas em todas as concentrações testadas até 50 ppm (resultados do Estudo 1 para leitura a 48 h de incubação).

A Tabela 3 mostra os resultados de MIC para lisozima.

Tabela 3: Resultados de MIC para lisozima

Microrganismo	MIC (ppm)
<i>L. plantarum</i>	700
<i>L. fermentum</i>	>1000

L. fermentum não foi inibido por lisozima até concentrações de 1g/L, enquanto que *L. plantarum* sofreu inibição com 700 ppm de nisina. Porém, no ensaio *L. plantarum* não cresceu em todos os tubos de ensaio com a mesma velocidade a partir de 300 ppm de lisozima adicionada, indicando influência do bioprotetor sobre o seu crescimento.

Tais observações sugeriram que nisina tem uma ação inibitória tal que ocorre um aumento do tempo da fase lag do *L. plantarum* e que um estudo deste parâmetro e da cinética de crescimento frente a nisina se fez necessária para caracterizar o efeito dos bioprotetores. O objetivo de se obter concentrações de uso na fermentação da combinação de bioprotetores incutiu na necessidade de se testar várias variáveis sobre a cinética, e para tanto foi utilizada a ferramenta estatística do planejamento fatorial.

Foram definidos os valores das faixas de estudo das variáveis independentes do planejamento. Lisozima, que apresentou valores de MIC altos foi utilizada no planejamento como bioprotetor adicionado à nisina.

O efeito sinérgico entre nisina e lisozima foi observado por CHUNG (2000) sobre bactérias lácticas deteriorantes, quando adicionados ao meio MRS e MRS modificado acrescido de 2 e 4% de cloreto de sódio; as proporções de 37,5 ppm de nisina para 112,5 ppm de lisozima provocaram a redução de 4 ciclos logarítmicos da população de *L. curvatus* em uma hora e 8 ciclos em duas horas, contra 4 ciclos em duas horas para nisina apenas. Proporções de um terço de nisina para lisozima reduziram o valor de MIC de bactérias lácticas em até 16 vezes. Assim, a proporção da adição dos bioprotetores foi estabelecida em 1 para 3.

GÄNZLE (1998) usou concentrações de 1 a 20 mMol/L de EDTA em combinação com nisina resulta em sinergismo e eficácia contra bactérias Gram positivas e Gram negativas pela ação sobre a funcionalidade de membranas bacterianas (STEVENS, 1992).

Foi observada a interação sinérgica entre alguns surfactantes e nisina. 0,1% de Tween 20 presente no meio de cultura aumentou a atividade antimicrobiana de nisina sobre o microrganismo alvo.

Os experimentos foram realizados segundo o planejamento fatorial completo.

O cálculo dos parâmetros cinéticos está exemplificado para o experimento 2 de *L. fermentum* da Tabela 9. Foi obtida a curva de crescimento da tomada da densidade ótica da cultura representada na Figura 3.

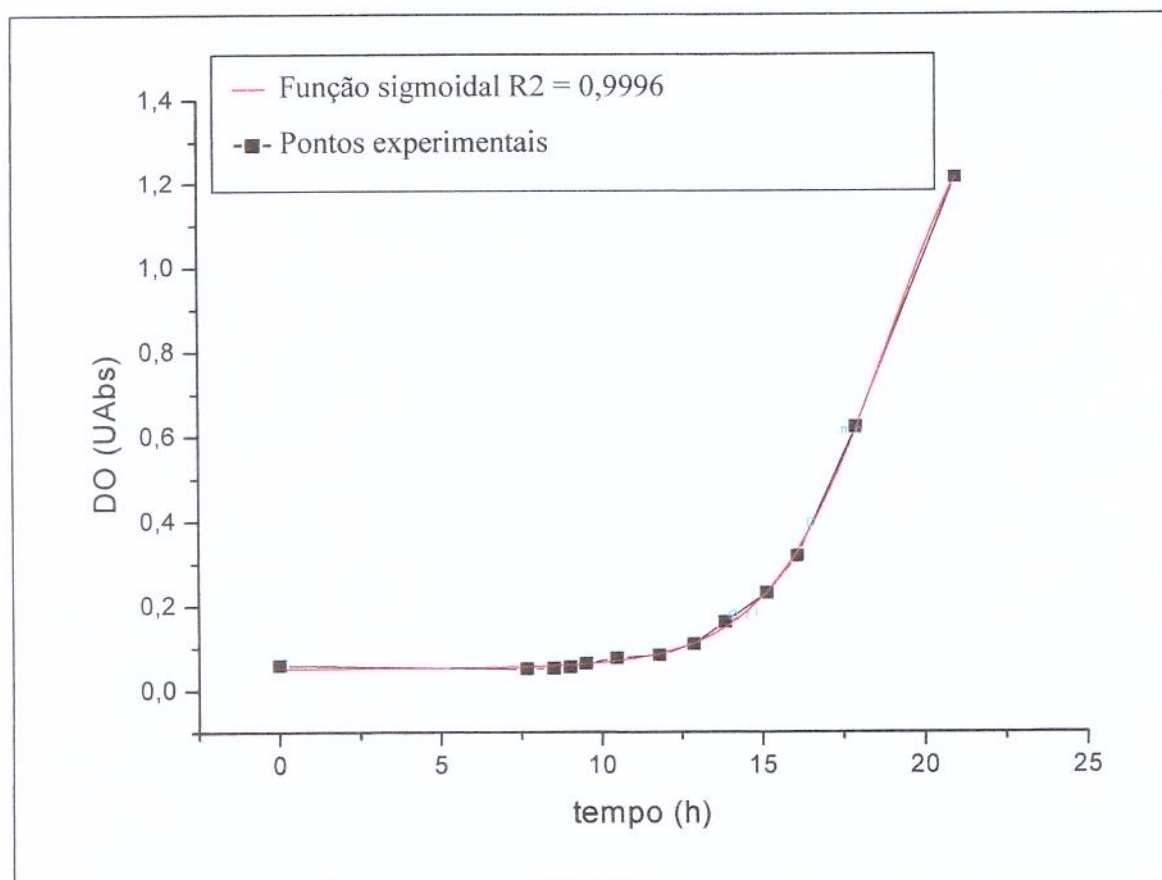


Figura 3: Curva de crescimento de *L. fermentum* em presença de 10 ppm de nisina

Uma curva sigmoidal foi adaptada aos pontos experimentais com coeficiente de correlação de 0,9996. Na curva foi encontrado o ponto referente ao incremento de 0,1 uAbs sobre a absorbância inicial (0,151 uAbs) e por interpolação obteve-se o tempo de fase lag de 13,9 horas.

A Figura 4 mostra a curva sigmoidal que foi diferenciada graficamente.

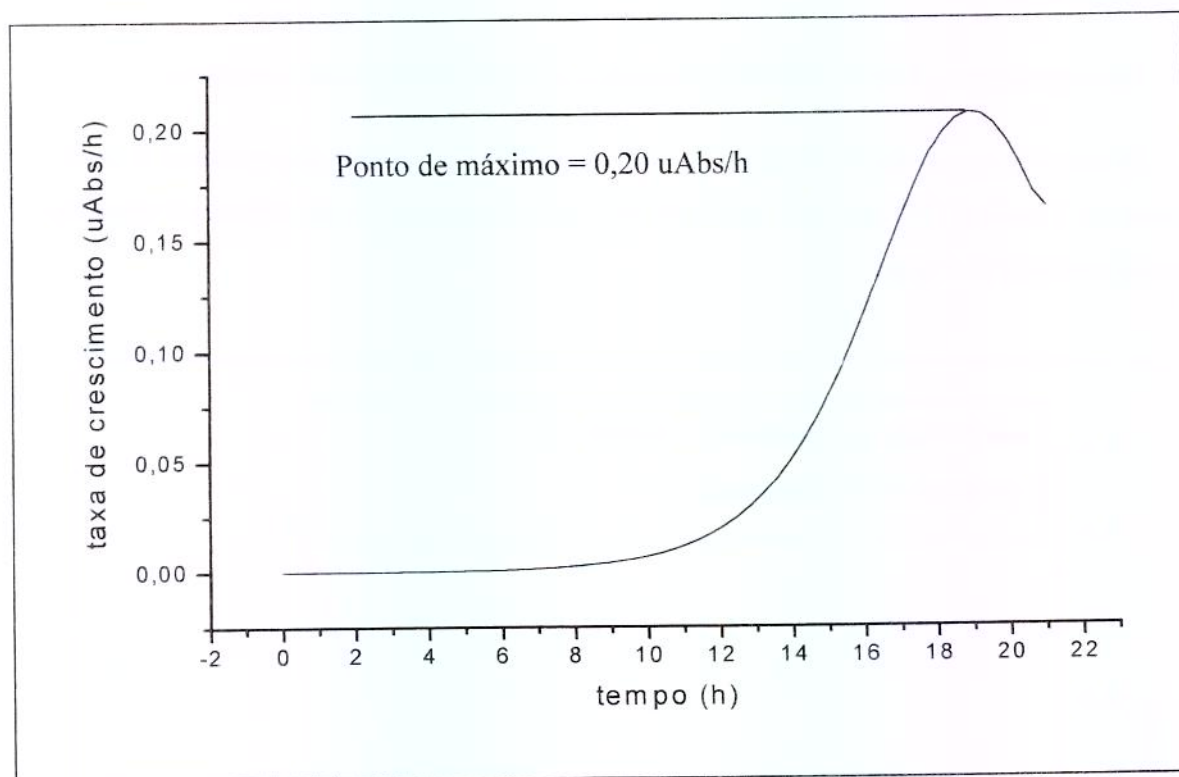


Figura 4: Derivada da função sigmoidal adaptada e ponto de máximo

O ajuste da curva sigmoidal (curva de Boltzman) resultou na equação abaixo:

$DO = -1,558 (1 + e^{(t + 18,965) / 1,880}) + 1,6099$, onde DO é a densidade ótica em uAbs e t é o tempo em horas.

O ponto de máximo da curva derivada corresponde a taxa máxima de crescimento obtido por interpolação dos pontos do gráfico. O resultado obtido foi de 0,20 uAbs/h.

Este método de obtenção dos parâmetros cinéticos do crescimento microbiano foi realizado para cada um dos experimentos do planejamento e para o controle.

4.1 Análise dos resultados de *L. plantarum*.

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados obtidos do tempo de fase lag e taxa máxima de crescimento de *L. plantarum*.

Tabela 4: Resultados de tempo de fase lag e taxa máxima de crescimento de *L. plantarum*

Bioprotetores e Potenciadores					<i>L. plantarum</i>	
Ensa io	Nisina	Lisozima	EDTA	Tween20	λ (h)	μ máx (uAbs/h)
1	-1	-1	-1	-1	16,07	0,20
2	1	-1	-1	-1	23,76	0,20
3	-1	1	-1	-1	17,68	0,19
4	1	1	-1	-1	24,06	0,18
5	-1	-1	1	-1	15,36	0,22
6	1	-1	1	-1	23,62	0,20
7	-1	1	1	-1	16,3	0,21
8	1	1	1	-1	24,02	0,28
9	-1	-1	-1	1	16,23	0,22
10	1	-1	-1	1	24,12	0,24
11	-1	1	-1	1	17,64	0,18
12	1	1	-1	1	24,16	0,24
13	-1	-1	1	1	16,06	0,21
14	1	-1	1	1	24,32	0,25
15	-1	1	1	1	17,65	0,27
16	1	1	1	1	24,06	0,23
17	0	0	0	0	20,99	0,18
18	0	0	0	0	20,93	0,16
19	0	0	0	0	21,57	0,17
20	Controle				9,64	0,23

As Tabelas 5 e 6 mostram os efeitos lineares para tempo de lag e taxa máxima de crescimento e interações de duas vias descritos. Em negrito os valores significativos a 10%.

Tabela 5: Análise dos efeitos dos bioprotetores sobre tempo de fase lag do *L. plantarum*.

Tempo de Lag (h)– <i>L.plantarum</i>					Limite de Confiança	
	EFEITO	Erro Puro	t(2)	p	-90, %	+90, %
Média	20,45	0,081	252,22	1,57E-05	20,216	20,689
(1)NISINA	7,39		41,82	5,71E-04	6,875	7,907
(2)LISOZIMA	0,75		4,26	5,08E-02	0,238	1,270
(3)EDTA	-0,291		-1,64	2,41E-01	-0,807	0,225
(4)TWEEN 20	0,421		2,38	1,40E-01	-0,095	0,937
1 por 2	-0,63		-2,58	6,97E-02	-1,150	-0,118

Em negrito os valores significativos (nível de significância de 10%).

A nisina foi o bioprotetor mais ativo no aumento da fase lag e a lisozima exibiu efeito dez vezes menor. Os efeitos do EDTA e Tween não foram significativos a 10%, mas o Tween 20 foi efetivo a 80% de significância.

Tabela 6: Análise dos efeitos dos bioprotetores sobre tempo da taxa máxima de crescimento de *L. plantarum*.

Taxa máxima de crescimento (uAbs/h) – <i>L. plantarum</i>					Limite de Confiança	
	EFEITO	Erro puro	t(2)	p	-90, %	+90, %
MÉDIA	0,216	0,002	98,08	1,04E-04	0,209	0,222
(1)NISINA	0,016		3,24	8,34E-02	0,002	0,030
(2)LISOZIMA	0,004		0,85	4,82E-01	-0,010	0,018
(3)EDTA	0,028		5,86	2,78E-02	0,014	0,042
(4)TWEEN20	0,020		4,07	5,53E-02	0,006	0,034
1 por 2	0,006		1,19	3,55E-01	-0,008	0,020
1 por 3	-0,002		-0,48	6,75E-01	-0,016	0,012
1 por 4	0,005		0,96	4,37E-01	-0,009	0,019
2 por 3	0,022		4,62	4,38E-02	0,008	0,036
2 por 4	-0,006		-1,31	3,20E-01	-0,020	0,008
3 por 4	-0,008		-1,64	2,41E-01	-0,022	0,006

Em negrito os valores significativos (nível de significância de 10%).

Para a diminuição da taxa máxima de crescimento de *L. plantarum* nenhum dos bioprotetores teve efeito. A Tabela 7 indica os valores da análise de variância para tempo de fase lag.

Tabela 7: ANOVA *L. plantarum* - tempo de lag

Fontes de Variação	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	F _{Tabelado}
Regressão	222,18	3	74,06	263,87	5,2
Resíduo	4,21	15	0,28		
Falta de Ajuste	3,96	13			
Erro puro	0,25	2			
Total	226,39	18			
F/Ftab = 50,74					

R² = 0,98918; R = 0,97565

O modelo codificado do tempo de fase lag para *L. plantarum* apresentou explicação de 98,91 % e valor de F muito maior que o F Tabelado, indicando que o modelo é válido na faixa estudada. Modelo codificado para tempo de fase lag de *L. plantarum*:

$$\lambda = 20.45 + 3,69.Ni + 0,37.Li - 0,31.Ni.Li$$

Onde: λ = tempo de fase lag

Ni = parâmetro codificado referente à concentração de nisina

Li = parâmetro codificado referente à concentração de lisozima

A Tabela 8 mostra os valores obtidos pelo modelo e os pontos experimentais com o cálculo dos desvios. A Figura 5 exibe o gráfico correspondente.

Tabela 8: Desvios entre tempos de lag estimados e medidos para *L. plantarum*.

Ensaio	λ (h)	λ calculado (h)	Desvio (%)
1	16,07	16,08	-0,06
2	23,76	24,08	-1,34
3	17,68	17,44	1,35
4	24,06	24,2	-0,58
5	15,36	16,08	-4,68
6	23,62	24,08	-1,94
7	16,3	17,44	-6,99
8	24,02	24,2	-0,74
9	16,23	16,08	0,92
10	24,12	24,08	0,16
11	17,64	17,44	1,13
12	24,16	24,2	-0,16
13	16,06	16,08	-0,12
14	24,32	24,08	0,98
15	17,65	17,44	1,18
16	24,06	24,2	-0,58
17	20,99	20,45	2,57
18	20,93	20,45	2,29
19	21,57	20,45	5,19

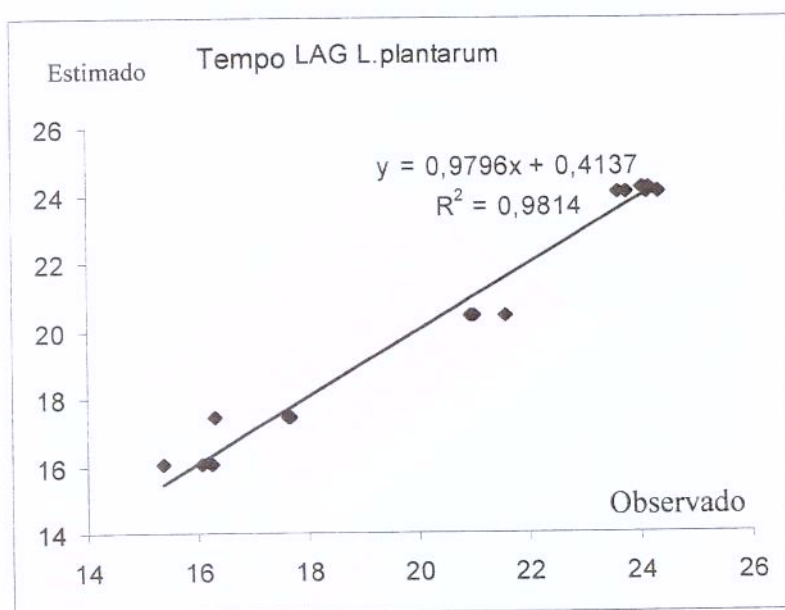


Figura 5: Valores estimados pelo modelo e observados para tempo de fase lag de *L. plantarum*.

Os desvios observados são pequenos (até 6,99 %) e a correlação entre estimado e medido é de 98,14% validando o modelo. A inclinação da reta é próxima de 1 indicando que os valores obtidos pelo modelo são bastante próximos dos valores medidos.

As Figuras 6 e 7 apresentam a superfície de resposta e as curvas de nível para o *L. plantarum*, para as variáveis referentes às concentrações de nisina e lisozima, fixando-se as variáveis de concentração de EDTA no nível mínimo (-1 ou 0%) uma vez que seu efeito foi negativo e do Tween 20 no nível máximo (+1 ou 0,1%) uma vez que seu efeito foi positivo e significativo a 20%.

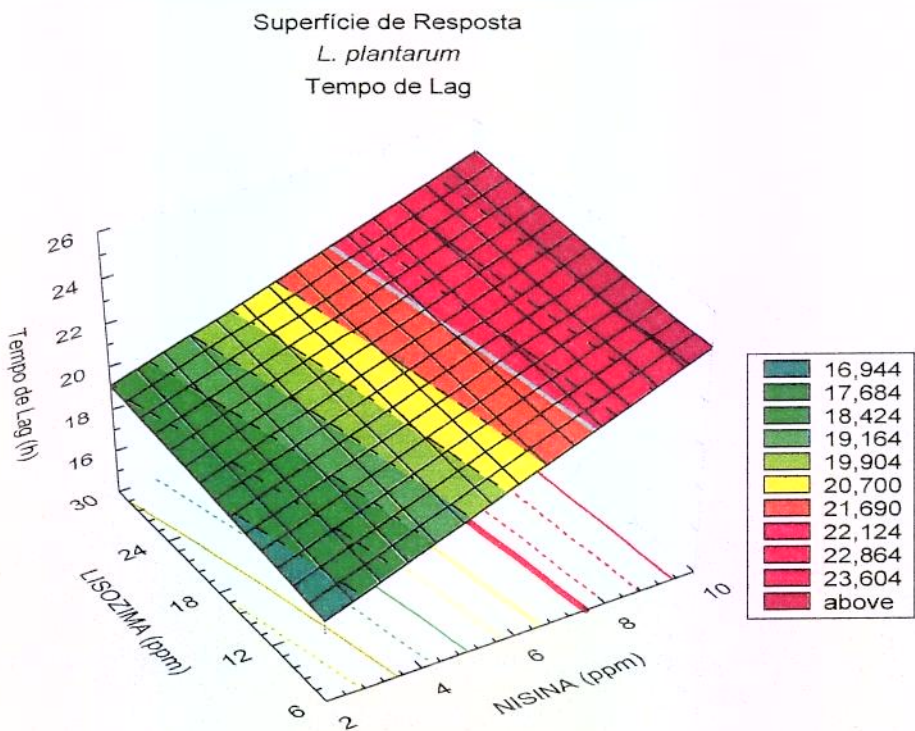


Figura 6: Superfície de resposta para tempo da fase lag de *L. plantarum* em função das concentrações de nisina e lisozima (0,1% de Tween 20).

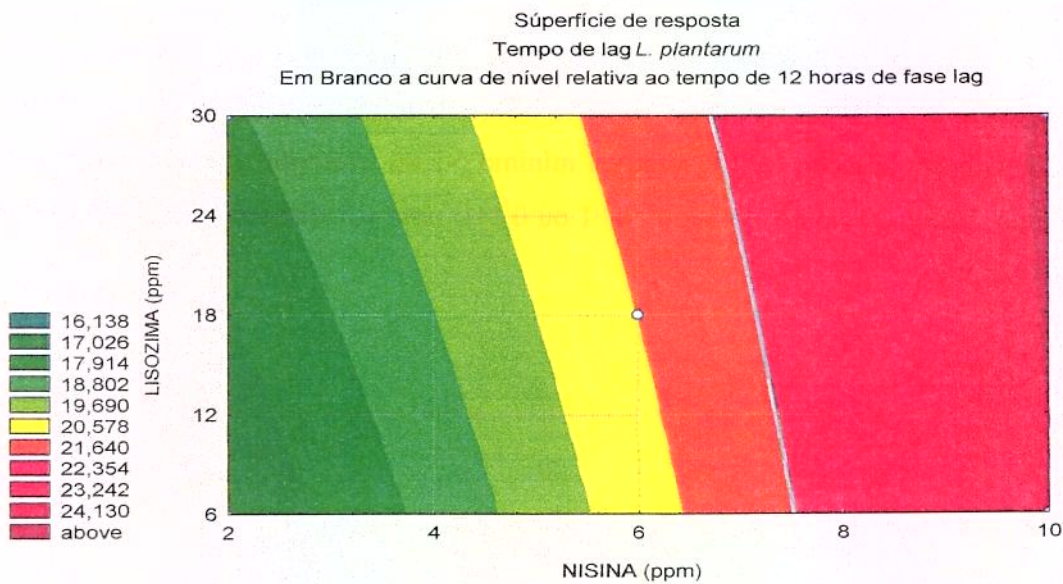


Figura 7: Curvas de nível para tempo da fase lag de *L. plantarum* em função das concentrações de nisina e lisozima (0,1% de Tween 20).

A linha em branco na Figura 7 indica a curva para o atraso de 12 horas (ciclo de fermentação) no tempo de lag. Considerando que os custos de mercado de nisina são cerca do dobro da lisozima, a otimização da dosagem foi realizada para o mínimo teor de nisina, resultando em cerca de 30 ppm de lisozima para 7 ppm de nisina, e 0,1% de Tween 20.

4.2 Análise dos resultados de *L. fermentum*.

A Tabela 9 mostra os resultados de λ e μ máx de *L. fermentum*.

Tabela 9: Resultados de tempo de fase lag e taxa máxima de crescimento de *L. fermentum*.

Ensaio	Bioprotetores e Potenciadores				<i>L.fermentum</i>	
	Nisina	Lisozima	EDTA	Tween20	λ (h)	μ máx (uAbs/h)
1	-1	-1	-1	-1	4,49	0,28
2	1	-1	-1	-1	13,90	0,20
3	-1	1	-1	-1	4,59	0,34
4	1	1	-1	-1	16,15	0,20
5	-1	-1	1	-1	4,19	0,33
6	1	-1	1	-1	11,50	0,27
7	-1	1	1	-1	4,19	0,32
8	1	1	1	-1	13,50	0,28
9	-1	-1	-1	1	4,80	0,25
10	1	-1	-1	1	19,10	0,18
11	-1	1	-1	1	4,30	0,27
12	1	1	-1	1	17,90	0,11
13	-1	-1	1	1	4,90	0,39
14	1	-1	1	1	14,40	0,29
15	-1	1	1	1	4,35	0,29
16	1	1	1	1	13,00	0,28
17	0	0	0	0	8,00	0,23
18	0	0	0	0	8,50	0,23
19	0	0	0	0	8,25	0,28
20	Controle				4,40	0,27

As Tabelas 10 e 11 apresentam os efeitos lineares e interações para tempo de fase lag e taxa máxima de crescimento, respectivamente, de ensaios com *L. fermentum*.

Tabela 10: Análise dos efeitos dos bioprotetores sobre tempo de fase lag de *L. fermentum*.

Tempo de Lag (h) - <i>L. fermentum</i>					Limite de confiança	
	EFEITO	Erro puro	t(2)	p	-90,%	+90,%
Média	9,47	0,057	165,18	3,66E-05	9,31	9,64
(1)NISINA	10,46		83,64	1,43E-04	10,09	10,82
(2)LISOZIMA	0,09		0,07	5,56E-01	-0,28	0,45
(3)EDTA	-1,90		-15,20	4,30E-03	-2,26	-1,54
(4)TWEEN20	1,28		10,24	9,40E-03	0,92	1,64
1 por 2	0,33		2,60	1,22E-01	-0,04	0,69
1 por 3	-1,76		-14,10	4,99E-03	-2,13	-1,40
1 por 4	1,06		8,46	1,37E-02	0,69	1,42
2 por 3	-0,07		-0,60	6,09E-01	-0,44	0,29
2 por 4	-1,00		-8,00	1,53E-02	-1,36	-0,64
3 por 4	-0,46		-3,70	6,59E-02	-0,83	-0,10

Em negrito os valores significativos (nível de significância de 10%).

O tempo médio de fase lag de *L. fermentum* de 9,47 horas foi menor que às 20,45 horas de *L. plantarum* (Tabela 5), que teve crescimento mais lento. O estado fisiológico da linhagem pode ter influenciado nos resultados, mas os resultados das regressões matemáticas devem ser analisados em relação ao tempo de crescimento sem a adição de bioprotetores (Tabela 4, experimento 20).

Os resultados apresentados revelaram que nisina foi o bioprotetor que apresentou maior efeito sobre o tempo de fase lag de *L. fermentum*. O efeito de lisozima não foi significativo a 10% de significância. Os potencializadores tiveram efeitos significativos a 10%, mas EDTA teve efeito negativo, indicando que seu uso reduz o tempo de fase lag e conseqüentemente o crescimento bacteriano foi antecipado. A interação entre Tween 20 e nisina foi significativa, indicando sinergismo. A interação entre nisina e EDTA foi negativa

significando antagonismo, assim como as interações entre Tween 20 e lisozima, cujos efeitos foram muito pequenos.

A proteção de alimentos contra bactérias Gram negativas pela combinação de nisina com ácidos orgânicos e EDTA foi investigada por HELANDER (2000), que realizou tratamentos com o bioprotetor em *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. marginalis*, e *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. A subsequente adição de 1 mmol de EDTA aumentou a penetração de substância fluorescente (1-N-fenilnaftilamina) indicadora de formação de poros na membrana citoplasmática, mas 0,1 mmol de EDTA e ácidos orgânicos não tiveram efeito, havendo ao contrário, estabilização da parede lipopolissacarídica pela nisina.

Tabela 11: Análise dos efeitos dos bioprotetores sobre a taxa máxima de crescimento de *L. fermentum*.

Taxa máx de crescimento (uAbs/h)– <i>L.fermentum</i>					Limite de confiança	
	EFEITO	Erro puro	t(2)	p	-90, %	+90, %
Média	0,27	0,006	42,58	5,55E-04	0,25	0,29
(1)NISINA	-0,09		-6,37	2,27E-02	-0,13	-0,05
(2)LISOZIMA	-0,01		-0,88	5,39E-01	-0,05	0,03
(3)EDTA	0,08		5,67	2,83E-02	0,04	0,12
(4)TWEEN 20	-0,02		-1,42	3,32E-01	-0,06	0,02
1 por 2	0,00		-0,22	9,49E-01	-0,04	0,04
1 por 3	0,03		2,23	1,40E-01	-0,01	0,07
1 por 4	0,00		-0,26	9,20E-01	-0,04	0,04
2 por 3	-0,02		-1,00	3,68E-01	-0,06	0,02
2 por 4	-0,03		-2,04	1,59E-01	-0,07	0,01
3 por 4	0,03		-2,20	1,77E-01	-0,01	0,07

Em negrito os valores significativos (nível de significância de 10%).

A Tabela 11 mostra o efeito de nisina sobre a velocidade de crescimento de *L. fermentum*, e indica um efeito de diminuição da taxa para o aumento da concentração de nisina a 1/3 do valor médio. O efeito do EDTA é similar ao da nisina, mas de sinal contrário, que indica favorecimento da velocidade do crescimento do microrganismo.

As Tabelas 12 e 13 mostram a análise de variância para tempo de fase lag e taxa máxima de crescimento de *L. fermentum*, respectivamente.

Tabela 12: ANOVA para *L. fermentum* – tempo de lag.

Fontes de Variação	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	F _{Tabelado}
Regressão	485,69	3	161,90	594,47	5,2
Resíduo	4,09	15	0,27		
Falta de Ajuste	3,96	13			
Erro puro	0,13	2			
Total	489,77	18			
F/Ftab = 114,32		R = 0,9571	R ² = 0,9809		

Foi obtida explicação de 98,09% para o modelo matemático obtido, e F muito maior que o F Tabelado, indicando a validade do modelo.

Modelo codificado para tempo de fase lag de *L. fermentum* –

$$\lambda = 9,47 + 5,22.Ni - 0,95.EDTA + 0,64.Tw - 0,88.Ni.EDTA, \text{ onde}$$

Ni = parâmetro codificado referente à concentração de nisina.

Tw = parâmetro codificado referente à concentração de Tween 20.

EDTA = parâmetro codificado referente à concentração de EDTA.

Tabela 13: ANOVA para *L. fermentum* – taxa máxima de crescimento.

Fontes de Variação	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	F _{Tabelado}
Regressão	0,0053	2	0,00	3,00	9,28
Resíduo	0,0142	16	0,00		
Falta de Ajuste	0,0140	14			
Erro puro	0,0002	2			
Total	0,0195	18			
F/F _{tab} =	0,32				
$R^2 = 0,9066$; $R = 0,78984$					

Já para a taxa de crescimento o F Tabelado foi maior que o F encontrado, indicando que não se pode obter um modelo válido para a variável dependente μ máx. A Tabela 14 e a Figura 8 mostram os desvios calculados de resultados do modelo e dos ensaios.

Tabela 14: Desvios entre tempos de lag estimados e medidos para *L. fermentum*.

Ensaio	λ (h)	λ calculado (h)	Desvio (%)
1	4,49	3,48	22,49
2	13,9	14,62	-5,17
3	4,59	4,48	2,39
4	16,15	15,62	3,28
5	4,19	3,8	9,30
6	11,5	11,42	0,69
7	4,19	4,8	-14,55
8	13,5	12,42	8,00
9	4,8	5,16	-7,50
10	19,1	18,42	3,56
11	4,3	4,16	3,25
12	17,9	17,42	2,68
13	4,9	4,56	6,93
14	14,4	14,3	0,69
15	4,35	3,56	18,16
16	13	13,3	-2,30
17	8	9,47	-18,37
18	8,5	9,47	-11,41
19	8,25	9,47	-14,78

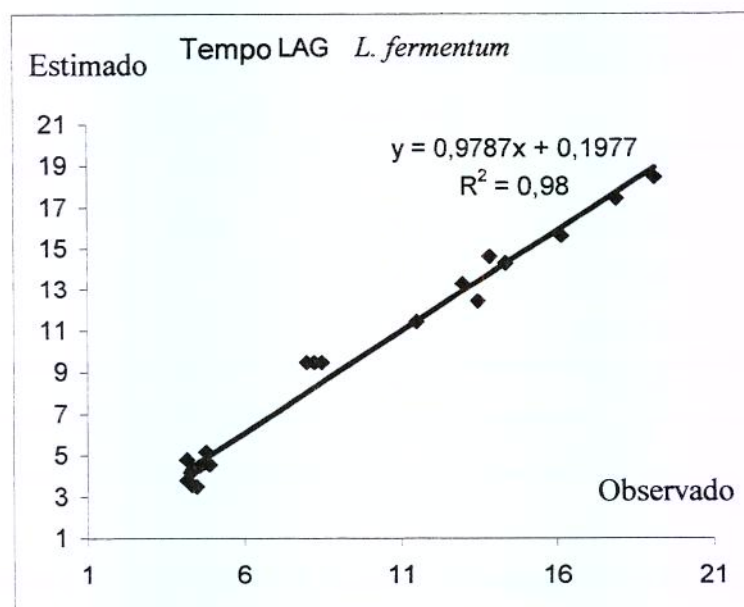


Figura 8: Valores estimados pelo modelo e medidos para tempo de fase lag de *L. fermentum*.

Uma boa correlação (0,98) foi obtida para o modelo, mas alguns pontos apresentaram desvios importantes. Ainda assim o modelo apresentou boa explicação do fenômeno, já que a inclinação de 0,9787 é próxima de 1, o que torna possível analisar superfícies de resposta. As superfícies de resposta e curvas de contorno estão apresentadas nas Figuras 9 e 10 respectivamente.

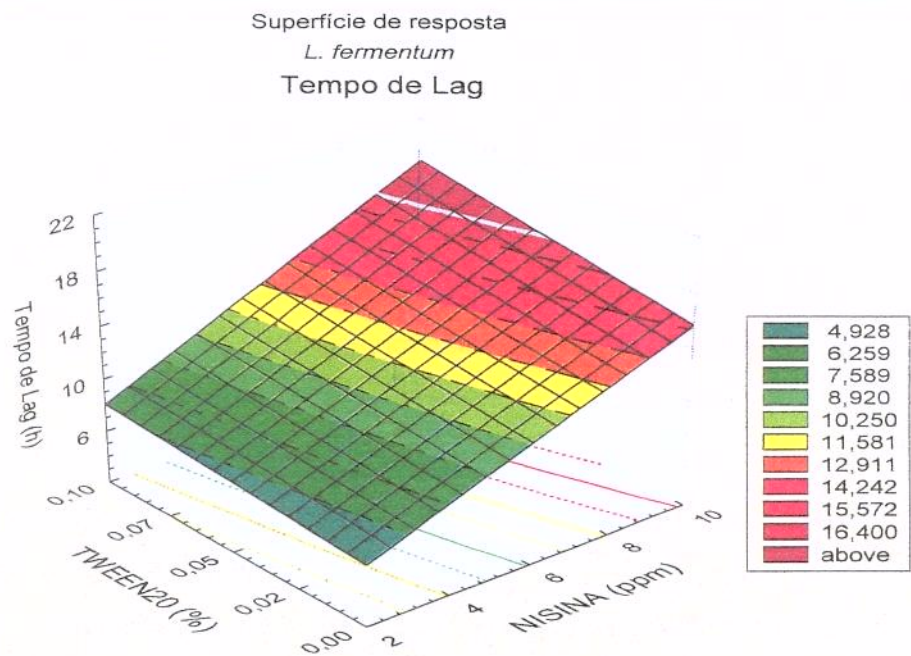


Figura 9: Superfície de resposta para tempo da fase lag de *L. fermentum* em função das concentrações de nisina e Tween 20.

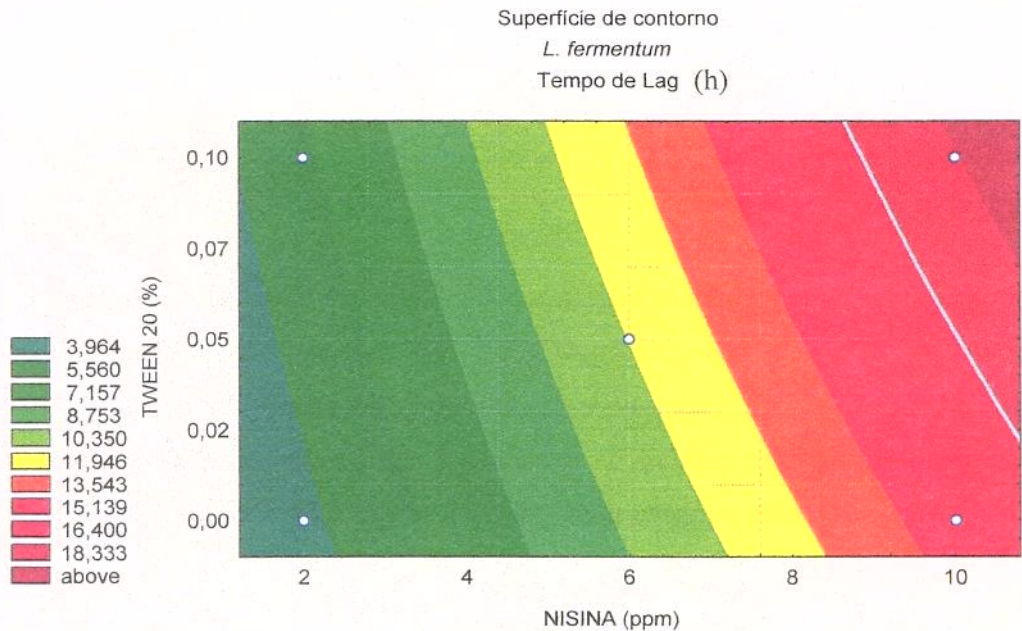


Figura 10: Curvas de contorno para tempo da fase lag de *L. fermentum* em função das concentrações de nisina e Tween 20.

A superfície de resposta exhibe tendência positiva de inibição do crescimento do microrganismo com o aumento das concentrações dos bioprotetores nas faixas de estudo. Planejamentos em faixas de concentrações superiores podem revelar região de ótimo para dosagem, mas tornam-se importantes os parâmetros de ordem econômica na otimização.

As curvas de contorno em branco na Figura 10 mostram o atraso de 12 horas para o crescimento de *L. fermentum*, indicando valores de 8,6 ppm de nisina (Novasin) para 0,1% de Tween 20 como dosagens otimizadas para o microrganismo.

4.3 Validação dos modelos

Os modelos foram validados pela realização de um experimento para cada um dos microrganismos utilizando-se os seguintes níveis das variáveis: 10 ppm de nisina, 30 ppm de lisozima e 0,1% de Tween 20. Estes níveis correspondem a uma combinação dos valores de máxima eficiência para *L. plantarum* (10ppm nisina e 30ppm lisozima) e para *L. fermentum* (10ppm nisina e 0,1% Tween 20).

Para o *L. plantarum* observou-se um tempo de 26,15 horas de duração da fase lag no experimento. O valor calculado pelo modelo foi de 24,20 horas, resultando num desvio de - 7,46%. Para o *L. fermentum* obteve-se 16,00 horas de tempo de fase lag no experimento e um valor calculado pelo modelo de 17,42 horas, resultando num desvio de 8,88%.

5 CONCLUSÕES

- Foram obtidos modelos matemáticos que descrevem a cinética de crescimento bacteriano, especificamente da fase lag dos microrganismos sob inibição de concentrações de bioprotetores e potencializadores. Assim, pode-se obter dosagens otimizadas dos bioprotetores para cada microrganismo. A taxa máxima de crescimento não foi afetada pelos bioprotetores, exceto para nisina que apresentou pequeno efeito de inibição sobre *Lactobacillus fermentum*.
- Verificou-se o sinergismo entre lisozima e nisina, conforme a literatura citada, para o *L. plantarum* e entre nisina e Tween 20 para ambos os microrganismos testados. Assim, dosagens de 10 ppm de nisina para 30 ppm de lisozima são sinérgicas e podem ser preconizadas para a bioproteção da fermentação alcoólica. A adição de Tween 20 a 0,1%

mostrou-se benéfico para o processo de bioproteção. Estas dosagens garantem que os microrganismos terão fases lag aumentadas em mais de 12 horas, que equivale a um ciclo de fermentação.

- EDTA foi antagônico com nisina para as bactérias testadas, para aumento do tempo da fase lag.
- O método de MIC provou ser eficiente para balizar as dosagens de antimicrobianos no processo, mas estudos de cinética são necessários para se obter dados complementares do comportamento dos contaminantes frente aos bioprotetores. Consegue-se assim otimizar doses de aplicação e coletar dados de comportamento dos microrganismos em função do tempo de processo, de maneira a assegurar sua inibição.

6 BIBLIOGRAFIA

1. CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**. 50 (1-2) 131-149, 1999.
2. CATTE, M.; GANCEL, F; DZIERSZINSKI, F.; TAILLIEZ, R. Effects of water activity, NaCl and smoke concentrations on the growth of *Lactobacillus plantarum* ATCC 12315. **International Journal of Food Microbiology**. 52 (1999) 105–108, 1999.
3. CHAN, W.C.; DODD, H.M.; HORN, N.; MACLEAN, K.; LIAN, L.Y.; BYCROFT, B.W.; GASSON, M.J.; ROBERTS, G.C.K. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. **Applied-and-environmental-microbiology (USA)**. v. 62(8) 2966-2969, 1996.
4. CHUMCHALOVA, J; JOSEPHSEN, J; PLOCKOVA, M. The antimicrobial activity of acidocin CH5 in MRS broth and milk with added NaCl, NaNO and lysozyme. **International Journal of Food Microbiology**. 43 (1998) 33–38, 1998.

5. CHUNG, WILFRED; HANCOCK, ROBERT E.W. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria **International Journal of Food Microbiology**. Volume: 60(1) 25-32, 2000.
6. COPERSUCAR, **Caderno COPERSUCAR** – Série Industrial, no 020, 1ª Edição, Fevereiro, 1988.
7. CROGUENNEC, T; NAU, F.; MOLLE, D.; LE GRAET, Y.; BRULE, G. Iron and citrate interactions with hen egg white lysozyme. **Food Chemistry**, Volume: 68, (1) 29-35, 2000.
8. GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas na fermentação alcoólica**. Campinas 1989. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
9. GÄNZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, 46: 3 207-217, 1999.
10. HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Permeability barrier of the Gram-Negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **International Journal of Food Microbiology** . V. 60 (2000) 153–161, 2000. Disponível em <[www.elsevier.nl / locate / ijfoodmicro](http://www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro)>, Acesso em 13/10/01.
11. HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, 24(3) 343-362, 1995.
12. KAJI, D.A. **Influência da Temperatura e Infecção láctica na Fermentação Alcoólica**. Campinas, 1989. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
13. KIM W.J. Bacteriocins Of Lactic-Acid Bacteria - Their Potentials As Food Biopreservative. **Food Reviews International**, 9: (2) 299-313, 1993.

14. MEGHROUS, J., LACROIX, C., SIMARD, R. E. The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria **Food Microbiology**, Vol. 16, 2 105-114, 1999.
15. OLIVA NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica por batelada alimentada**. Campinas 1990. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP).
16. RAZAVI-ROHANI,-S.M.; GRIFFITHS,-M.W. Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria associated with foods by combinations of antimicrobial agents. **Journal-of-food-safety (USA)**. v. 16(2) p. 87-104, 1996.
17. TROMBINI, M.A.M.; ROVANHOL, A.A.; VITTI, L.S.S.; BEDA,D.F.; PORTO, R.C.B.; SÁ, J.S. Causas da Contaminação e Suas Conseqüências em Usinas de Açúcar e Álcool. **STAB**, 16(6), 18, 1998.

ESTUDO 3 - DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DESTRUIÇÃO TÉRMICA DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DO PROCESSO SUCRO-ALCOOLEIRO E INFLUÊNCIA DO USO DE BIOPROTETORES NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO.

RESUMO

O parâmetro de destruição térmica $D_{60^{\circ}\text{C}}$ (tempo de morte térmica), das bactérias contaminantes dos processos de moagem de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica foi determinado a 60°C , em caldo de cana clarificado obtendo-se os seguintes resultados: *Lactobacillus fermentum* (0,75 min), *Lactobacillus plantarum* (0,29 min), *Leuconostoc mesenteroides* (1,57 min). Não foi possível medir o parâmetro D para *L. confusus*, que se apresentou demasiadamente sensível ao tratamento. A bactéria *L. fermentum* foi escolhida como alvo dos estudos de morte térmica dentre os microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica. O parâmetro Z (parâmetro de temperatura) foi determinado obtendo-se o valor de $7,7^{\circ}\text{C}$. A adição de uma combinação de 10 ppm de Novasin (1000000 UI/g de nisina), 30 ppm de Novagard (lisozima) e Tween 20 (0,1%) ao caldo clarificado resultou na redução de $D_{60^{\circ}\text{C}}$ em 16,7%. Verificou-se assim a ação sinérgica do tratamento térmico combinado à ação dos bioprotetores sobre a contaminação bacteriana da fermentação alcoólica.

Palavras Chave: tratamento térmico, bioprotetores, bactérias lácticas, nisina, lisozima, fermentação alcoólica.

1 INTRODUÇÃO

O processo de preparação de caldo de cana-de-açúcar para a produção de etanol ou açúcar é realizado comumente nas usinas canavieiras pela combinação de separações físicas (filtros e hidrociclones), tratamentos com produtos químicos (calagem, sulfitação e aditivos) e tratamento térmico (em sistemas abertos ou “flash”).

O caldo obtido da moagem é uma solução impura de açúcares, dos quais a sacarose predomina constituindo em média 14%. Para uma boa evolução do processo fermentativo algumas impurezas devem ser eliminadas sem que ocorra a depleção de nutrientes:

- Partículas coloidais – que causam entupimentos em filtros, formação de espuma e prejudicam a centrifugação.
- Impurezas grosseiras – areia e fibra.
- Contaminantes microbianos

A temperatura de tratamento pode variar de 95°C em tanque aberto, a 105°C em sistema fechado.

O tratamento térmico do processo de clarificação do caldo, aplicado em conjunto com a calagem e a sulfitação, gera reduções na população bacteriana da ordem de 10^3 ufc/mL, podendo algumas cepas – notadamente do gênero *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, produtoras de dextrana – tolerar os efeitos da temperatura e dos produtos químicos (TROMBINI, 1998).

GALLO (1989) identificou bactérias contaminantes do processo sucroalcooleiro dentre as quais leuconostoc (*L. mesenteroides* e *L. dextranicum*, micrococos, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus lactis*, bacilos (*B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. coagulans*), e lactobacilos (*L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. confusus*, *L. fermentum*, *L. bulgaricus*).

A contaminação por *L. fermentum* de linhagens floculantes tem grande influência sobre a viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* devido à toxidez dos produtos metabólicos (OLIVEIRA, 1998).

OLIVA NETO (1990) encontrou no leite de levedura uma proporção de 62% de *L. fermentum* e 2% de *L. plantarum*, contaminando dornas em seu trabalho com usinas de álcool.

STUPIELLO (1993), determinou o valor de MIC de bactérias contaminantes da indústria suco-alcooleira e obteve que o microrganismo mais resistente era *L. plantarum*, enquanto que os microrganismos do gênero *Bacillus* apresentaram baixa resistência aos antimicrobianos testados.

1.1 Bioprotetores

A bioproteção do processo fermentativo é uma tecnologia potencial e aliada ao tratamento térmico do caldo pode surtir alguns efeitos desejáveis conforme o ponto de dosagem dos bioprotetores:

- Bioproteção de etapas anteriores ao tratamento do caldo (moagem) diminuindo carga microbiana inicial.
- Sinergismo durante o processo de tratamento térmico pelo aumento da permeabilidade celular.
- Bioproteção do caldo tratado nas linhas que conduzem ao resfriamento e à fermentação.
- Bioproteção do processo de fermentação.

Bioproteção de alimentos é definida como a utilização de bactérias lácticas (probióticos), seus metabólitos ou ambos para melhorar ou assegurar a qualidade e a segurança de alimentos que não são necessariamente fermentados (MONTVILLE, 1998). Bioprotetores são substâncias com ação antimicrobiana, produzidas por fermentações por

microrganismos de grau alimentício, ou obtidas de alimentos, com objetivo de agregar qualidade ao produto (HOLZAPFEL, 1995).

Nisina é uma bacteriocina obtida por fermentação, na fase de crescimento exponencial, de *Lactococcus lactis*, não tóxica, termoestável, eficiente contra bactérias Gram positivas, e quando associada ao EDTA, eficiente contra bactérias Gram negativas (CHANG, 2000; HELANDER, 2000).

Tratamentos térmicos subletais induzem a sensibilidade de esporos a nisina, sendo especialmente sensíveis os endósporos de Clostrídios e Bacilos, com efeitos esporostáticos e até esporocidas, evitando crescimento de células de esporos germinados (KIM, 1993).

Observou-se sinergismo no uso de nisina combinada com tratamento térmico brando (48 e 56°C) na destruição de bactérias gram positivas, em particular *Lactobacillus plantarum*, devido ao aumento da formação de poros e da permeabilidade de membrana medida (UECKERT, 1998).

Pectinatus frisingensis, ao ser exposto aos efeitos combinados de nisina e tratamento térmico brando (50°C por 10 minutos), em sua fase exponencial de crescimento, apresentou perda de íons potássio para o meio externo evidenciando inativação celular por modificação da permeabilidade de membrana (CHIHIB, 1999).

O valor de tempo de destruição térmica (D) foi determinado para o tratamento térmico à 90°C de esporos ativados de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em bebidas ácidas de frutas. O D_{90°C} na bebida de maçã foi de 20,8; 19,3; 15,5 e 14,8 minutos para zero (controle), 50, 100 e 200 UI/ml de nisina, respectivamente; e o D_{90°C} para a bebida de laranja foi de 23,1; 20,4; 20,6 e 17,6 minutos para 0, 50, 100, 200 UI/mL de nisina, respectivamente. A redução de D entre a concentração de 200 UI/mL de nisina, equivalente a 5 ppm de nisina ativa, e o controle foi de 71% e 76% para bebidas de maçã e laranja, respectivamente, sendo a nisina tão ou mais ativa que a lisozima na inibição de esporos de *A. acidoterrestris* (YAMAZAKI, 2000).

Foi observado que a adição de nisina em concentrações de até 200 UI/ml, tratamento térmico brando (50°C por até 60 minutos) e resfriamento rápido, causou a perda de potássio intracelular de bactérias de *Clostridium perfringens* para o meio, composto por solução tampão (pH 7,2). O aumento da fase lag do microrganismo e o aumento da perda de viabilidade foram associados com aos aumentos de concentração de nisina, e o extravasamento dos íons potássio associado a esta perda de viabilidade. O crescimento subsequente foi associado à multiplicação de indivíduos resistentes (GUERLAVA, 1998).

Lisozima parcialmente desnaturada apresenta uma alta atividade antibacteriana tanto contra bactérias Gram negativas e positivas, por um mecanismo de ruptura de membranas independente de sua atividade como muramidase. Íons divalentes como cálcio e magnésio tendem a estabilizar as paredes bacterianas diminuindo significativamente a atividade da lisozima, e a associação de quelantes (EDTA) reverte tal processo, pois o mecanismo de ação da lisozima consiste na retirada de íons divalentes, pela inserção de seu grupo hidrofóbico exposto, da estrutura polissacarídica externa à membrana plasmática, desestabilizando-na e causando a lise celular (IBRAHIM, 1997).

Também se constatou a eficácia da associação de lisozima e EDTA utilizados com outros agentes de preservação de alimentos em variáveis teores de cloreto de sódio e pH (RAZAVI-ROHANI, 1996).

2 OBJETIVOS

Determinar os parâmetros de cinética de destruição térmica dos lactobacilos: *L. confusus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e do *Leuconostoc mesenteroides*. Avaliar a influência dos bioprotetores sobre a destruição térmica da bactéria contaminante mais resistente da fermentação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Os microrganismos estudados são bactérias lácticas, Gram positivas, e constituem a flora usualmente contaminante do processo. *Lactobacillus confusus* foi cedido pelo banco de cepas da Cooperativa de Produtores de Açúcar e Alcool, Copersucar Piracicaba-SP, indicada como floculante isolada de fermentação alcoólica. *Lactobacillus fermentum* CCT-0663 e *Lactobacillus plantarum* ATCC-8014 e *Leuconostoc mesenteroides* ATCC-9338 foram obtidos da coleção de culturas da Fundação Tropical André Tosello, Campinas-SP.

Sua ativação foi realizada a partir de liófilos em caldo MRS (de Man Rogosa Sharpe), e armazenados a -18°C em meio Litmus Milk. Antes de cada experimento os tubos congelados foram incubados a 37°C até viragem do indicador ou coagulação do leite, e repicados em meio MRS a 1% para serem utilizados em um estado fisiológico de alta atividade nos testes: repiques de 15 h.

3.2 Bioprotetores

Nisina e lisozima foram obtidas junto à Rhodia S. A. S. como formulações comerciais dos bioprotetores NOVASIN (1000000 UI/g) e NOVAGARD. Também foram adicionados aditivos com o objetivo de potenciar os efeitos dos bioprotetores. Os aditivos utilizados nos ensaios foram TWEEN 20 e EDTA sódico (Sigma PA.). As concentrações dos bioprotetores foram expressas em ppm de formulação.

Todos os compostos foram pesados em balança analítica e adicionados de água estéril em balões volumétricos previamente expostos à luz ultravioleta por uma hora. As soluções foram ainda filtradas em filtro Millipore 22 μm .

Os bioprotetores em diversas concentrações foram então armazenados sob refrigeração. Sua adição foi realizada diretamente ao meio, na quantidade requerida para se obter a concentração desejada, por meio de pipeta automática de volume regulável (Finpipette – Labsystems A.G.).

3.3 Tratamento Térmico

Este ensaio objetivou determinar os parâmetros de destruição térmica dos microrganismos em caldo de cana clarificado pelo processo de caliação.

Foi realizado em três etapas: seleção do microrganismo alvo do processo, pela determinação do parâmetro de tempo de morte térmica D (min) de todas as linhagens, determinação do parâmetro de temperatura Z (°C) do lactobacilo mais resistente, determinação do parâmetro de tempo de morte térmica D com e sem adição de uma combinação de bioprotetores.

3.4 Clarificação do Caldo de Cana

Foram utilizados colmos maduros de cana-de-açúcar não queimada, limpos com escova metálica, com a finalidade de se eliminar sujidades, ceras e pigmentos da casca. O caldo foi extraído em um único terno de moenda, sem embebição. O Brix foi corrigido para 14°B e o pH ajustado para 6,5 (pH final) por adição de leite de cal 5° Bé; o caldo clarificado por ebulição mantida por 5 minutos, seguida pela decantação por 2 horas; o sobrenadante foi filtrado em algodão, acondicionado em frascos e esterilizado conforme descrito anteriormente e assim armazenado congelado, conforme RIBEIRO (1998). Os microrganismos estudados foram pré-cultivados em caldo MRS conforme descrito anteriormente, fazendo com que a carga microbiana para o inóculo resultasse em uma contagem inicial de 10^8 ufc/mL.

3.5 Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Destruição dos Contaminantes

A escolha do microrganismo mais resistente ao calor foi feita pela comparação entre os valores de D (expressa em minutos) obtidos para cada microrganismo. Testes preliminares apontaram que a temperatura mais alta em que podia se obter boa correlação nos pontos medidos pela aplicação do método seria próxima a 65°C. Esta temperatura é usada como referência para cálculo de pasteurização de bebidas (NARZISS, 1987). Os frascos de três bocas contendo 400 mL de caldo tratado e estéril foram colocados em banho termostaticado (Polystat – Cole Parmer), munido de controle de temperatura (frio e calor)

com precisão de $0,01^{\circ}\text{C}$ e aquecidos às temperaturas constantes de 50, 55, 60, e 65°C , no termômetro de referência acoplado ao frasco. A agitação do caldo foi promovida por um agitador de hélice cuja velocidade foi ajustada para 180 rpm, de maneira a se obter uma boa homogeneização sem que houvesse turbulência e respingos no frasco. Foi então inoculado o microrganismo pela adição da cultura por meio de pipeta a 1% do volume de caldo. Imediatamente foram tomadas amostras em intervalos de tempo pré definidos, que foram transferidas assepticamente para tubos de diluições sucessivas. As três últimas diluições de cada tempo foram plaqueadas em duplicata em MRS agar.

As placas foram incubadas a 37°C e contadas após 48 ± 2 h, ou tempo suficiente para o desenvolvimento dos microrganismos injuriados.

3.6 Influência dos Bioprotetores na Resistência Térmica

O frasco de três bocas contendo caldo tratado e estéril foi colocado no banho termostático e aquecido até a temperatura constante de 60°C . Os bioprotetores foram dosados ao frasco momentos antes da inoculação com o microrganismo alvo. O procedimento foi idêntico ao descrito anteriormente.

A dosagem dos bioprotetores foi estabelecida em 10 ppm de nisina, 30 ppm de lisozima e 0,1 % de Tween 20, otimizada para os microrganismos mais resistentes contaminantes da fermentação (o Estudo 2 mostra o método de obtenção da combinação otimizada dos bioprotetores).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do parâmetro de morte térmica D e escolha do microrganismo alvo.

As Figuras 1 a 3 mostram as curvas de sobreviventes dos microrganismos estudados, e as equações do modelo de primeira ordem.

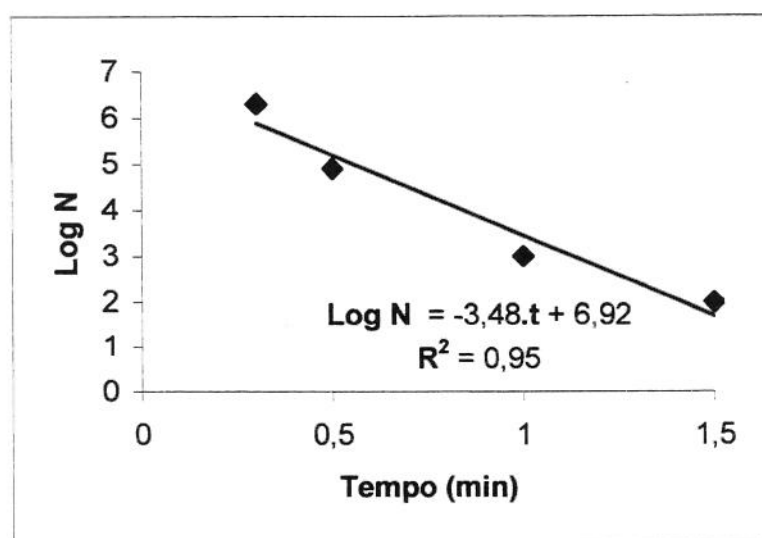


Figura 1- Curva de sobreviventes *L. plantarum* a 60°C

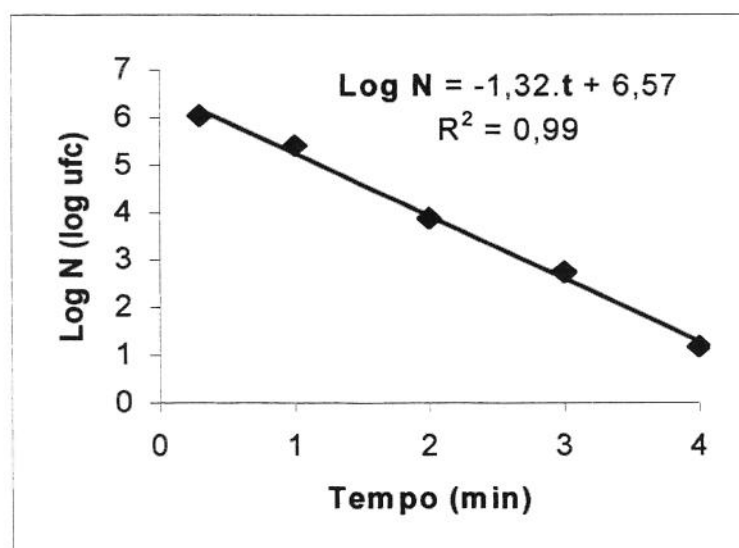


Figura 2- Curva de sobreviventes *L. fermentum* a 60°C em caldo de cana-de-açúcar clarificado

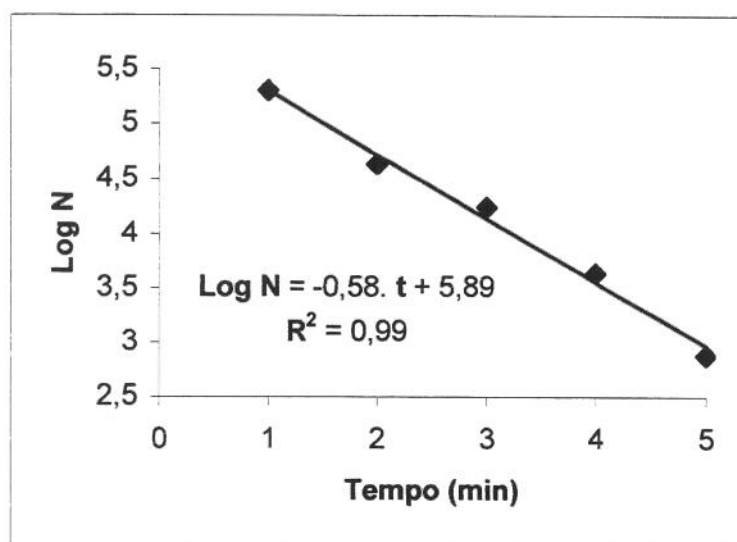


Figura 3- Curva de sobreviventes *Lc. mesenteroides* a 60°C em caldo de cana-de-açúcar clarificado

Os resultados indicam que os coeficientes de correlação são altos possibilitando o cálculo do parâmetro $D_{60^{\circ}\text{C}}$ a partir dos coeficientes das retas obtidas. *L. plantarum* apresentou coeficiente de correlação mais baixo devido a sensibilidade apresentada à temperatura e exigiu tomadas de amostras em intervalos curtos de tempo, diminuindo a precisão da cronometragem. Os valores de $D_{60^{\circ}\text{C}}$ estão apresentados na Tabela 1, calculados pelas regressões matemáticas e referem-se ao coeficiente angular das curvas.

Tabela 1- Valores de D a 60°C para bactérias contaminantes em caldo clarificado.

Microrganismo	$D_{60^{\circ}\text{C}}$ (min)
<i>L. plantarum</i>	0,29
<i>L. fermentum</i>	0,75
<i>L. confusus</i>	nd
<i>Lc. mesenteroides</i>	1,57
nd: não disponível	

FRANZ (2001) determinou os valores de D de bactérias lácticas contaminantes de embutidos e encontrou os valores de D a 57, 60 e 63°C que foram: 52,9; 39,3; 32,5 s para *Lactobacillus sakei*, 34,9; 31,3; 20,2 s para *Leuconostoc mesenteroides* e 22,5; 15,6; 14,4 s para *Lactobacillus curvatus* respectivamente.

A bactéria da moagem, *Leuconostoc mesenteroides* é produtora de gomas. Estes microrganismos são, segundo TROMBINI (1998), os mais resistentes ao tratamento térmico, o que é confirmado pelos resultados da Tabela 1.

CASADEI (2001) estudou tratamentos térmicos em temperaturas de 44 a 60°C para *L. delbrueckii*, em diferentes valores de pH (3, 5 e 7) e concentrações de etanol (0; 2,5; 5; 7,5 e 10%). Ambos os fatores foram muito influentes nos valores de D do processo de destruição térmica. O valor de D_{60°C} para o lactobacilo foi de 2,4 minutos em pH 7, sem adição de etanol, e o valor de Z nestas condições foi de 6,3°C.

Os valores de D_{60°C} obtidos para as bactérias contaminantes foram semelhantes aos da literatura.

L.confusus, um microrganismo reconhecidamente sensível à temperaturas elevadas não apresentou resultados a 60°C, e o valor de D_{60°C} não pode ser obtido.

As reduções das populações das bactérias utilizadas, nas temperaturas de clarificação de caldo (até 105°C), não puderam ser detectadas pelo método empregado, indicando que a ordem de grandeza dos parâmetros é pequena nesta faixa de temperatura. Tal observação é corroborada pela literatura citada (FRANZ, 1996; CASADEI, 2001; REICHART, 2001) que atribui baixa resistência térmica aos lactobacilos e leuconostoc das espécies estudadas, esperando-se a redução destes microrganismos no processo até contagens seguras para as etapas subseqüentes, da ordem de 10⁷ ufc/mL.

KAJI (1989) não pôde recuperar bactérias do gênero *Leuconostoc* presentes no início das fermentações ao final dos ciclos, o que indicou uma baixa tolerância ao etanol pelos microrganismos – concentrações de 3% de etanol no vinho são capazes de reduzir em mais de 50% a velocidade específica de crescimento. Estas observações restringem a

importância do gênero *Leuconostoc* na fermentação. Também indica que o processo de clarificação, conduzido a temperaturas mais altas que a estudada e por tempos da ordem de horas, é suficiente para eliminar o *Leuconostoc*. O ensaio, no entanto, não pôde detectar se o microrganismo poderia desenvolver formas de resistência à temperatura como formação de biofilme. A recontaminação do caldo é o mecanismo mais provável para a deterioração e produção de dextranas após o tratamento térmico. Em tanques de clarificação (sedimentadores) a diminuição da filtrabilidade de açúcar observada quando há paradas prolongadas do processo (atribuída a produção de dextranas por *leuconostoc* resistente ao tratamento térmico) pode ser causada por recontaminações pela formação de biofilmes, ou pela hidrólise química de hemicelulose do caldo e suspensão de resíduos de dextranas pela convexão no interior do tanque.

O microrganismo alvo selecionado foi o *L. fermentum*, como o mais resistente contaminante da fermentação, e portanto foi determinado o valor de Z para o referido microrganismo.

4.2 Determinação do parâmetro de temperatura Z do *Lactobacillus fermentum*

A Figura 4 mostra a curva fantasma de destruição térmica de *L. fermentum* e a equação da regressão linear obtida.

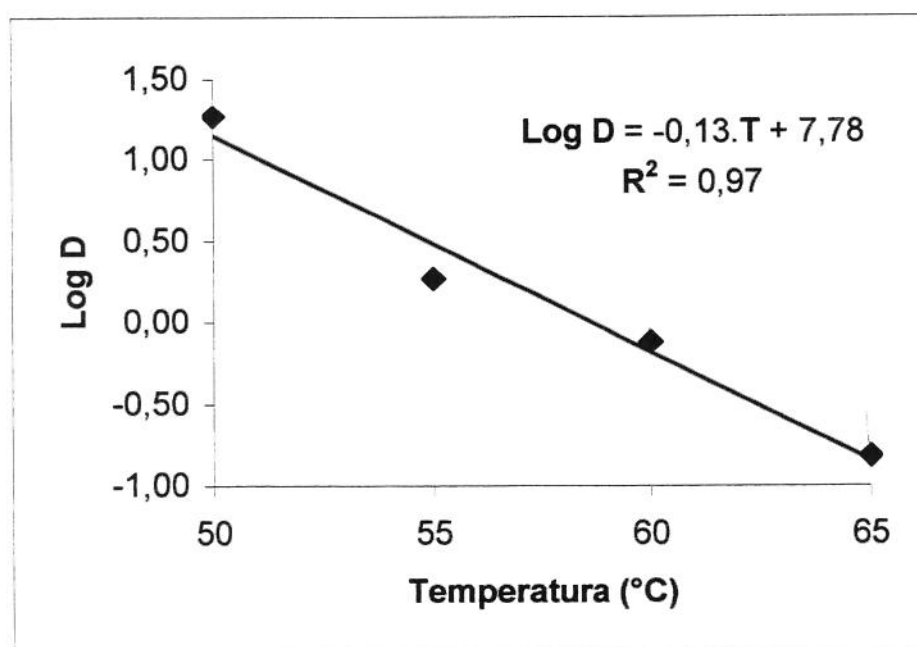


Figura 4 – Curva fantasma de Destruição térmica de *L. fermentum* em caldo de cana-de-açúcar clarificado

Da equação obtida pela regressão foi calculado o coeficiente angular que se refere ao parâmetro Z do processo: 7,7°C, condizente com o valor de 6,3°C obtido por CASADEI (2001) supracitado.

4.3 Estudo do parâmetro de destruição térmica D na presença de bioprotetores.

A Figura 5 mostra a curva de sobreviventes e a equação de regressão para o cálculo de D para *L. fermentum* a 60°C em caldo clarificado adicionado de Novasin (10 ppm), Novagard (30 ppm) e Tween 20 (0,1%).

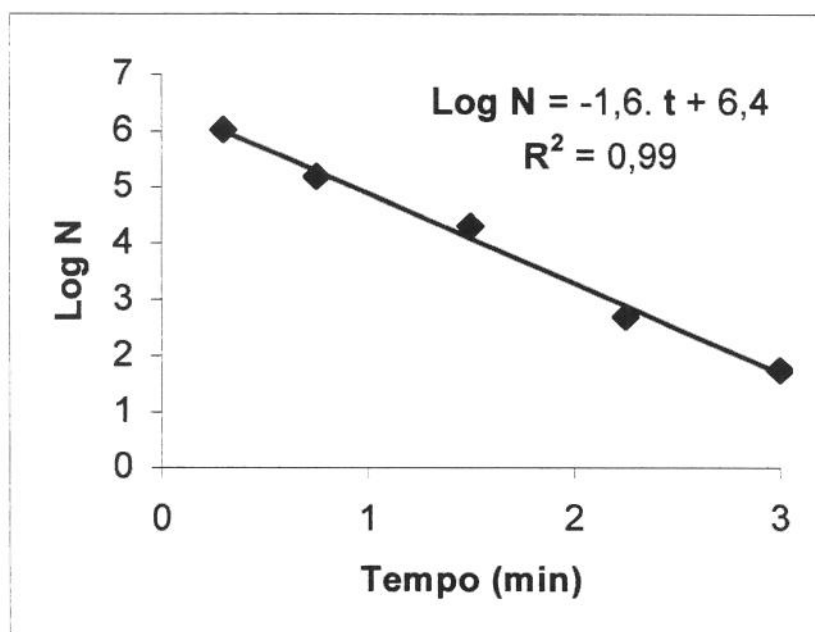


Figura 5- Curva dos sobreviventes de *L. fermentum* a 60°C em presença de bioprotetores.

Obteve-se uma boa correlação na adaptação da reta que possibilitou a obtenção do valor de $D_{60^\circ\text{C}}$. A redução observada do valor de $D_{60^\circ\text{C}}$ (para 0,63 min) com a adição dos bioprotetores foi de 16,7%, indicando efeito sinérgico entre a ação dos bioprotetores e o tratamento térmico na destruição do microrganismo alvo. UECKERT (1998) obteve redução de 1,9 log de ufc/mL de *L. plantarum*, quando associou nisina (0,5 ppm) ao tratamento térmico (54°C por 5 minutos), e eliminação total do microrganismo (inoculado a 10^8 ufc/mL) com o aumento da temperatura para 56°C. Estes valores de redução de microrganismos viáveis, também do gênero lactobacilos, são bastante próximos aos obtidos na Figura 5.

Um menor efeito sinérgico é normalmente esperado em tratamentos térmicos severos devido à desestabilização térmica da nisina em altas temperaturas, que perde cerca de 5% de sua atividade em tratamentos a 115°C por 20 minutos em pH 3,0. Em pHs próximos à neutralidade a estabilidade da nisina decresce significativamente (THOMAS, 2000).

Um estudo de inativação térmica de lisozima em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5, a 72°C revelou que o comportamento da cinética nestas concentrações foi de primeira ordem e a constante de inativação medida foi $0,9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ sem agitação e $3,6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ sob agitação de 700 rpm (COLOMBIÉ, 2001).

Nas condições brandas de tratamento é improvável que haja redução significativa do sinergismo dos bioprotetores. Lisozima que não se mostrou ativa contra *L. fermentum* (OLIVA-NETO, 2001) foi adicionada ao meio na proporção descrita, pois a combinação resultante de estudo anterior visa a bioproteção do processo a outros contaminantes (o Estudo 2 mostrou sinergismo entre nisina e lisozima para inibição do crescimento de *L. plantarum*).

5 CONCLUSÕES

- Em conformidade com a literatura apresentada observou-se sinergismo entre o tratamento térmico a 60°C e a adição de nisina, lisozima e Tween 20 ao caldo de cana clarificado na destruição do *Lactobacillus fermentum*, microrganismo contaminante do processo de fermentação mais resistente ao tratamento térmico. *Lactobacillus confusus* foi a bactéria contaminante da fermentação mais susceptível ao tratamento térmico.
- *Leuconostoc mesenteroides* foi o microrganismo mais resistente testado; no entanto, o valor de D do microrganismo sugere que o tratamento térmico de caldo é suficiente para eliminá-lo.

6 BIBLIOGRAFIA

1. ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUEZ, M.I. Método de Caracterização de Leveduras de processo Utilizando Parâmetros Cinéticos e Produção Específica. **STAB**, V. 13 (4), 22-25, 1995.
2. **BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology**. 8ed Baltimore: Waverly Press, INC. Cap 15-16, p. 529-598, 1974.
3. CALDAS, C.; SILVA, J.F.; CARVALHO T.D.A. Dextrana na Produção de Açúcar Demerara. **STAB**, 17(1) 24, 1998.
4. CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**. 50 (1-2) 131-149, 1999.
5. CARMELO, V.; SANTOS, R.; VIEGAS, C. A.; SÁ-CORREIA, I. Modification of *Saccharomyces cerevisiae* thermotolerance following rapid exposure to acid stress. **International Journal of Food Microbiology**, Volume: 42(3) 225-230, 1998.
6. CASADEI, M.A.; INGRAM, R.; HITCHINGS, E.; ARCHER, J.; GAZE J.E. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. **International Journal of Food Microbiology**. V.63, 125-134. Disponível em <[www.elsevier.nl / locate / ijfoodmicro](http://www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro)>, acesso em 01/nov/01. 2001.
7. CHAN, W.C.; DODD, H.M.; HORN, N.; MACLEAN, K.; LIAN, L.Y.; BYCROFT, B.W.; GASSON, M.J.; ROBERTS, G.C.K. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. **Applied-and-environmental-microbiology (USA)**. v. 62(8) 2966-2969, 1996.
8. CHIHIB, N.E.; MONNERAT, L.; MEMBRE. J.M.; THOLOZAN, J.L. Nisin, temperature and pH effects on growth and viability of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. **Journal of Applied Microbiology**. 87(3) 438-446, 1999.

9. CHUNG, WILFRED; HANCOCK, ROBERT E.W. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. Volume: 60(1) 25-32, 2000.
10. COLOMBIÉ, S.; GAUNAND, A.; LINDET, B. Lysozyme inactivation and aggregation in stirred-reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. Volume: 11(4-6) 559-565, 2001.
11. COPERSUCAR, **Caderno COPERSUCAR** – Série Industrial, no 020, 1ª Edição, Fevereiro, 1988.
12. CROGUENNEC, T; NAU, F.; MOLLE, D.; LE GRAET, Y.; BRULE, G. Iron and citrate interactions with hen egg white lysozyme. **Food Chemistry**, Volume: 68, (1) 29-35, 2000.
13. FRANZ, C.M.A.P.; VON HOLY, A. Thermotolerance of meat spoilage lactic acid bacteria and their inactivation in Vacuum-Packaged Vienna Sausages. **International Journal of Food Microbiology**. V.29, 59–63. Disponível em <[www.elsevier.nl / locate / ijfoodmicro](http://www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro)>, acesso em 01/nov/01. 1996.
14. GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas na fermentação alcoólica**. Campinas 1989. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
15. GÄNZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, 46: 3 207-217, 1999.
16. HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, 24(3) 343-362, 1995.

17. IBRAHIM, H.R.; HIGASHIGUCHI, S.; SUGIMOTO, Y.; AOKI, T. Role of divalent cations in the novel bactericidal activity of the partially unfolded lysozyme. **Journal-of-agricultural-and-food-chemistry (USA)**. 45(1) 89-94, 1997.
18. KAJI, D.A. **Influência da Temperatura e Infecção láctica na Fermentação Alcoólica**. Campinas, 1989. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
19. KIM W.J. Bacteriocins Of Lactic-Acid Bacteria - Their Potentials As Food Biopreservative. **Food Reviews International**, 9: (2) 299-313, 1993.
20. LIMA, T.C.S.; GRISI, B.M.; BONATO, M.C.M. Bacteria isolated from a sugarcane agroecosystem: their potential production of polihidroxyalcanoates and resistance to antibiotics. **Revista de Microbiologia**, 30-3, 1999.
21. LORCA G.L., FONT DE VALDEZ, G. The Effect of Suboptimal Growth Temperature and Growth Phase on Resistance of *Lactobacillus acidophilus* to Environmental Stress. **Cryobiology**, Vol. 39, No. 2, 144-149, 1999.
22. MEGHROUS, J.; LACROIX, C.; SIMARD, R. E. The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria **Food Microbiology**, Vol. 16, 2 105-114, 1999.
23. OLIVA NETO, P. **Estudo de diferentes Fatores que Influenciam o Crescimento da População Bacteriana Contaminante da Fermentação Alcoólica por Leveduras**. Campinas 1995. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP).
24. OLIVEIRA-FREGUGLIA, R.M.; HORII, J. Viabilidade Celular De *Saccharomyces Cerevisiae* Em Cultura Mista Com *Lactobacillus Fermentum*. **Scientia AgricolaPrint**, 55-3, 1998.

25. RAZAVI-ROHANI,-S.M.; GRIFFITHS,-M.W. Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria associated with foods by combinations of antimicrobial agents. **Journal-of-food-safety (USA)**. v. 16(2) p. 87-104, 1996.
26. REICHART, O. Reaction kinetic interpretation of heat destruction influenced by environmental factors. **International Journal of Food Microbiology**. V. 64, 289–294. Disponível em <[www.elsevier.nl / locate / ijfoodmicro](http://www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro)>, acesso em 01/nov/01. 2001.
27. RODRIGO, M.; MARTINEZ, A.; CARBALLO, B.M. Medida de la Termorresistência de los Microorganismos. I. Termobacteriologia. **Rev. Agroquim. Tecnol. Alimentos** , 30:2 175-188, 1990.
28. TROMBINI, M.A.M.; ROVANHOL, A.A.; VITTI, L.S.S.; BEDA,D.F.; PORTO, R.C.B.; SÁ, J.S. Causas da Contaminação e Suas Conseqüências em Usinas de Açúcar e Álcool. **STAB**, 16(6), 18, 1998.
29. UECKERT, J. E.; STEEG, P. F.; COOTE, P.J. Synergistic antibacterial action of heat in combination with nisin and magainin II amide. **Journal of Applied Microbiology**, 85,487-494, 1998.

7 CONCLUSÕES GERAIS

- A nisina se mostrou um bioprotetor potencialmente eficaz no controle de bactérias láticas contaminantes da fermentação alcoólica. Seu uso combinado com EDTA pode reduzir os valores de MIC para nisina.
- Concentrações altas de nisina, de cerca de 90 ppm são necessárias na moenda para inibir o *Leuconostoc mesenteroides*. Os bioprotetores foram pouco eficazes para inibir contaminações por leveduras nesta etapa do processo.
- Por não agirem contra leveduras os bioprotetores provaram ser seguros para o processo de fermentação alcoólica.
- Os testes de cinética fermentativa ratificaram a conclusão acima, indicando que o parâmetro cinético - taxa máxima de produção de etanol, não foi afetado pelos bioprotetores quando dosados na moenda ou na fermentação em combinações sinérgicas. As taxas máximas de produção de etanol são muito influenciadas pelo teor do inóculo, e erros devem ser minimizados nesta fase dos ensaios.
- Foram obtidos modelos matemáticos que descrevem a cinética de crescimento bacteriano, especificamente da fase lag dos microrganismos sob inibição de concentrações de bioprotetores e potencializadores. Assim, puderam-se obter dosagens otimizadas dos bioprotetores para cada microrganismo. A taxa máxima de crescimento não foi afetada pelos bioprotetores exceto para nisina que teve pequeno efeito de inibição para *Lactobacillus fermentum*.
- Verificou-se o sinergismo entre lisozima e nisina, conforme a literatura citada, para o *L. plantarum* e entre nisina e Tween 20 para ambos os microrganismos testados. Assim, dosagens de 10 ppm de nisina para 30 ppm de lisozima são sinérgicas e podem ser preconizadas para a bioproteção da fermentação alcoólica. A adição de Tween 20 a 0,1% na dosagem mostrou-se benéfica para o processo de bioproteção. Estas dosagens garantem que os microrganismos terão fases lag aumentadas em mais de 12 horas, que equivale a um ciclo de fermentação.

- EDTA foi antagônico com nisina para as bactérias testadas, para aumento do tempo da fase lag.
- O método de MIC provou ser eficiente para balizar as dosagens de antimicrobianos no processo, mas estudos de cinética são necessários para se obter dados complementares do comportamento dos contaminantes frente aos bioprotetores. Consegue-se assim otimizar doses de aplicação e coletar dados de comportamento dos microrganismos em função do tempo de processo, de maneira a assegurar sua inibição.
- Em conformidade com a literatura apresentada observou-se sinergismo entre o tratamento térmico a 60°C e a adição de nisina, lisozima e Tween 20 ao caldo de cana clarificado na destruição do *Lactobacillus fermentum*, microrganismo contaminante do processo fermentação mais resistente ao tratamento térmico. *Lactobacillus confusus* foi a bactéria contaminante da fermentação mais susceptível ao tratamento térmico.
- *Leuconostoc mesenteroides* foi o microrganismo mais resistente testado; no entanto, o valor de D do microrganismo sugere que o tratamento térmico de caldo é suficiente para eliminar o contaminante. Conclui-se portanto que contaminações que aparecem após o tratamento térmico do caldo são na realidade recontaminações.

8 BIBLIOGRAFIA

ABBE, T; KROCKEL, L; HILL, C. Bacteriocins: mode of action and potencial in food preservation and control of food poisoning. **Intl. J. Food Microbiology**. 25 (1995)169-185. 1995.

ALLIGNET J, LONCLE V, ELSOLH N. Sequence Of A Staphylococcal Plasmid Gene, Vga, Encoding A Putative ATP-Binding Protein Involved In Resistance To Virginiamycin A-Like Antibiotics. **Gene** 117: (1) 45-51 AUG 1 ,1992.

ANDRIETTA, M.G.S.; OLIVEIRA, A.J.; STUPIELO, J.P.. Determinação de M.I.C. (Concentração Inibitória Mínima) para Cinco Antimicrobianos Sobre Bactérias Gram Positivas Isoladas da Indústria Brasileira de Fermentação Alcoólica. **STAB**, 13(6), 42-44, 1993.

ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUEZ, M.I. Método de Caracterização de Leveduras de processo Utilizando Parâmetros Cinéticos e Produção Específica. **STAB**, V. 13 (4), 22-25, 1995.

BEDOUT, C.; GÓMEZ, B.L.; RESTREPO, A. In vitro susceptibility testing of *Fonsecaea pedrosoi* to antifungals. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 39 (3), 1997.

BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. 8ed Baltimore: Waverly Press, INC. Cap 15-16, p. 529-598, 1974.

BOONMAR, S.; BANGTRAKULNONT, A.; PORNRUANGWONG, S.; SAMOSORNSUK, S.; KANEKO, K.; et. al. Significant increase in antibiotic resistance of *Salmonella* isolates from human beings and chicken meat in Thailand. **Veterinary Microbiology**, Volume: 62(1) 73-80 30, 1998.

BOOPATHY, R.; BEARY, T.; TEMPLET, P. J. Microbial decomposition of post-harvest sugarcane residue. **Bioresource Technology**, Volume: 79, (1) 29-33, 2001.

Bibliografia

BORZANI, W.; JURKIEWICZ, C.H. Variation Of The Ethanol Yield During Very Rapid Batch Fermentation Of Sugar-Cane Blackstrap Molasses. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. V.15(3), 1998.

BOVI, R; SERRA, G.E. Impurezas fibrosas da cana-de-açúcar e parâmetros tecnológicos do caldo extraído. **Scientia Agrícola**. V.56(4), 1999.

BOWER, C.K; DAESCHEL, M.A. Resistance responses of microorganisms in food environments. **International Journal of Food Microbiology**, Volume: 50, (1-2) 33-44, 1999.

BRADY M.S.; KATZ S.E. In vitro effect of multiple antibiotic antimicrobial residues on the selection for resistance in bacteria. **Journal of AOAC International**, 75 (4) 738-742, 1992.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in food. Mode of action and resistance mechanisms. **Intl. J. Food Microb.** 50(1999) 1-17, 1999.

BUDDE, B.B.; RASCH, M. A comparative study on the use of flow cytometry and colonyforming units for assessment of the antibacterial effect of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**. 63 (2001) 65-72

CABO, M.L.; MURADO, M.A.; GONZALES, M.P.; PASTORIZA, L. A Method for Bacteriocin Quantification. **Journal of Applied Microbiology**, 87:2 907-914, 1999.

CABRINI, K.T; GALLO, C.R. Identificação De Leveduras No Processo De Fermentação Alcoólica Em Usina Do Estado De São Paulo, Brasil. **Scientia Agrícola**, 56-1, 1998.

CALDAS, C.; SILVA, J.F.; CARVALHO T.D.A. Dextrana na Produção de Açúcar Demerara. **STAB**, 17(1) 24, 1998.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**. 50 (1-2) 131-149, 1999.

CARMELO, V.; SANTOS, R.; VIEGAS, C. A.; SÁ-CORREIA, I. Modification of *Saccharomyces cerevisiae* thermotolerance following rapid exposure to acid stress. **International Journal of Food Microbiology**, Volume: 42(3) 225-230, 1998.

CASADEI, M.A.; INGRAM, R.; HITCHINGS, E.; ARCHER, J.; GAZE J.E. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. **International Journal of Food Microbiology**. V.63, 125–134. Disponível em <[www.elsevier.nl / locate / ijfoodmicro](http://www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro)>, acesso em 01/nov/01. 2001.

CATTE, M.; GANCEL, F; DZIERZINSKI, F.; TAILLIEZ, R. Effects of water activity, NaCl and smoke concentrations on the growth of *Lactobacillus plantarum* ATCC 12315. **International Journal of Food Microbiology**. 52 (1999) 105–108, 1999.

CHAN, W.C.; DODD, H.M.; HORN, N.; MACLEAN, K.; LIAN, L.Y.; BYCROFT, B.W.; GASSON, M.J.; ROBERTS, G.C.K. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. **Applied-and-environmental-microbiology** (USA). v. 62(8) 2966-2969, 1996.

CHANDRAPATI, S.; SULLIVAN, D.J. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* **Journal of Biotechnology**. 63 (1998) 229–233, 1998.

CHEE-SANFORD, J.C. et al. Antibiotic resistance genes back in food chain. **Appl. Env. Microbiol.** 67, 1494–1592, 2001.

CHIHIB, N. E.; MONNERAT, L.; MEMBRE, J. M.; THOLZAN, J.L.. Nisin, temperature and pH effects on Growth and Viability of *Pectinatus frisingensis*, a Gram Negative, Strictly Anaerobic beer – Spoilage bacterium. **Journal of Applied Microbiology**, 87(3) 438-446, 1999.

CHIN, P.M.; INGLEDEW, W.M. Effect Of Lactic-Acid Bacteria On Wheat Mash Fermentations Prepared With Laboratory Backset Enzyme. **Microbial Technology**, 16(4) 311 – 317, 1999.

Bibliografia

CHUMCHALOVA, J; JOSEPHSEN, J; PLOCKOVA, M. The antimicrobial activity of acidocin CH5 in MRS broth and milk with added NaCl, NaNO and lysozyme. **International Journal of Food Microbiology**. 43 (1998) 33–38, 1998.

CHUNG, WILFRED; HANCOCK, ROBERT E.W. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. Volume: 60(1) 25-32, 2000.

COLLINS, C.H.; LYNE, P.M. **Microbiological Methods**. Ed Butterworths, 5 Ed. Londres, 1985.

COLOMBIÉ, S.; GAUNAND, A.; LINDET, B. Lysozyme inactivation and aggregation in stirred-reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. Volume: 11(4-6) 559-565, 2001.

COPERSUCAR, **Caderno COPERSUCAR – Série Industrial**, no 020, 1a Edição, Fevereiro, 1988.

CROGUENNEC, T; NAU, F.; MOLLE, D.; LE GRAET, Y.; BRULE, G. Iron and citrate interactions with hen egg white lysozyme. **Food Chemistry**, Volume: 68, (1) 29-35, 2000.

DAVIES, MARTIN J. Resistance is useless. **Trends in Biotechnology** .Volume: 19 (3) 88, 2001.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications. 1 Ed. Blackie Academic & Professional. Londres 1994.

DENGIS, P.B.; NELISSEN, -L.R.; ROUXHET,-P.G. Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top- and bottom-fermenting strains. **Applied-and-environmental-microbiology** (USA). 61(2) 718-728, 1995.

DUTREUX, N ; NOTERMANS, S.; GONGORA-NIETO, M.M.; BARBOSA-CANOVAS, G.V.; SWANSON B.G. Effects of combined exposure of *Micrococcus luteus* to nisin and pulsed electric fields. **International Journal of Food Microbiology**. 60 (2000) 147–152, 2000.

Bibliografia

DYKES, G.A.; HANCOCK, R.E.W.; HASTINGS, J.W. Structural Variations in Nisin Associated with Different Membrane Mimicking and pH Environments. **Biochemical And Biophysical Research Communications**. 247, 723–727 , 1998.

FINGUERUT, J.; LUCREDI, H.A.; LEIMER, K.H. ; ROSSELL, E.D.V. Estequiometria da Fermentação Alcoólica a Partir do Caldo de Cana. **Revista Copersucar**. [s.n.t.]

FRANZ, C.M.A.P.; VON HOLY, A. Thermotolerance of meat spoilage lactic acid bacteria and their inactivation in Vacuum-Packaged Vienna Sausages. **International Journal of Food Microbiology**. V.29, 59–63. Disponível em <[www.elsevier.nl / locate / ijfoodmicro](http://www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro)>, acesso em 01/nov/01. 1996.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas na fermentação alcoólica**. Campinas 1989. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

GÄNZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, 46: 3 207-217, 1999.

GARY A. D.; ROBERT E. W.; HANCOCK; J. HASTINGS W. Structural Variations in Nisin Associated with Different Membrane Mimicking and pH Environments. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Vol. 247: 3 723-727, 1998.

GILL, A.O.; RICHARD, A.H. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme. **Food Research Intl**. 33, 83-90, 2000.

GUERLAVA, P; NOLF, S. Rapid cooling, moderate heat treatment, and nisin addition influence on *Clostridium perfringens* type A. **International Journal of Food Microbiology**, 39: 98 195-293, 1999.

HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Permeability barrier of the Gram-Negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **International Journal of Food Microbiology** . V. 60 (2000) 153–161, 2000. Disponível em <[www.elsevier.nl / locate / ijfoodmicro](http://www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro)>, Acesso em 13/10/01.

Bibliografia

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**. 24(3) 343-362, 1995.

HYNES, S.H.; KJARSGAARD, D.M.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **Journal-of-Industrial-Microbiology-and-Biotechnology (USA)**. 18(4) 284-291, 1997.

IBRAHIM, H.R.; HIGASHIGUCHI, S.; SUGIMOTO, Y.; AOKI, T. Role of divalent cations in the novel bactericidal activity of the partially unfolded lysozyme. **Journal-of-agricultural-and-food-chemistry (USA)**. 45(1) 89-94, 1997.

JAKUBOWSKI, W.; BILINSKI, T.; BARTOSZ, G. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radical Biology and Medicine**. Volume: 28, 5 659-664, 2000.

JIN, Y.; SPEERS, R. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**. Volume: 31, 6-7, 421-440, 1998.

KAJI, D.A. **Influência da Temperatura e Infecção láctica na Fermentação Alcoólica**. Campinas, 1989. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

KIM W.J. Bacteriocins Of Lactic-Acid Bacteria - Their Potentials As Food Biopreservative. **Food Reviews International**. 9: (2) 299-313, 1993.

KIRAN SREE, N.; SRIDHAR M.; SURESH, K.; BANAT I.M.; RAO L.V. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. **Bioresource Technology** 72 (2000) 43-46, 2000.

KIRAN SREE, N.; SRIDHAR, M.; SURESH, K.; BANAT, I.M.; VENKATESWAR RAO, L. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. **Bioresource Technology**. 72:1 43-46, 2000.

LIGOXYGAKIS, P. Antibiotic resistance genes back in the food chain. **Trends in Genetics**. 17: 7 381, 2001.

LIMA, T.C.S.; GRISI, B.M.; BONATO, M.C.M. Bacteria isolated from a sugarcane agroecosystem: their potential production of polihidroxyalcanoates and resistance to antibiotics. **Revista de Microbiologia**. 30-3, 1999.

LOPEZ, Z.O.; MORENO, I.E.; FOGLIATA, F.A.; AYALA, H.G. Microbial population of sugar juice that is neither affected nor deteriorated by frost. Its relation to alcohol fermentation. **Sugar-y-Azucar**. 83 (9) 21, 24, 26, 27, 30, 31, 34, 1988.

LORCA G.L., FONT DE VALDEZ, G. The Effect of Suboptimal Growth Temperature and Growth Phase on Resistance of *Lactobacillus acidophilus* to Environmental Stress. **Cryobiology**. Vol. 39, No. 2, 144-149, 1999.

LOSSO, J.N.; NAKAI, S.; CHARTER, E.A.. Lysozyme. Naidu, A. S.. **Natural Food Antimicrobial Systems**. Primeira edição., Boca Raton: CRC press, 2000, Capítulo 6, 185-210.

LUCK, E.; JAGER, M. **Antimicrobial Food Additives. Characteristics, Uses and Effects**. Ed. Springer, 2a. Ed., Berlim, 1997.

LUDWIG, KM; OLIVA NETO, P; DE ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias da fermentação alcoólica. **Ciência e tecnologia de alimentos**. Vol. 21(1) [s.n.t.], 2001.

MCAULIFE, O; ROSS, R.P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**. 25 (2001) 285-308, 2001. Disponível em < www.fems-microbiology.org>. Acesso em 20 nov. 01.

MEGHROUS, J., LACROIX, C., SIMARD, R. E. The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. **Food Microbiology**. Vol. 16, 2 105-114, 1999.

MEHTA, M.D.; GAIR, J.J. Social, political, legal and ethical areas of inquiry in biotechnology and genetic engineering. **Technology in Society**. 23: 2, 241-264, 2001.

Bibliografia

MIRANDA, C.D.; CASTILLO, G. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonas from Chilean freshwater. **The Science of the Total Environment**. 224: 1-3 167-176, 1998.

MONTVILLE, T.J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Applied microbiology and biotechnology** (1998) 50, 511-519, 1998.

MORENO, I; LERAYER, A.L.S.; BALDINI, V.L.S.; LEITÃO M.F.F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. **Revista de Microbiologia**. 30-2, 1999.

MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A; CASAGRANDE, A.A. Ethanolic Yields at Liquid and Semisolid- Phase in Sugarcane Varieties With and Without Topping. **STAB**. 13 (6), 1995.

NANDAKUMAR, R.; NANDAKUMAR, M.P.; MATTIASSON, B. Quantification of nisin in flow-injection immunoassay systems. **Biosensors & Bioelectronics**. 15 (1999) 241-247, 1999.

NEGRO, M.R.G.O.C. **Caracterização da canjica- polímero coletado em usinas de açúcar e álcool- e fatores relacionados a sua formação a partir de gomas produzidas por lactobacilos isolados de caldo de cana-de-açúcar**. Campinas 1999. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP).

OLIVA NETO, P. **Estudo de diferentes Fatores que Influenciam o Crescimento da População Bacteriana Contaminante da Fermentação Alcoólica por Leveduras**. Campinas 1995. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP).

OLIVA NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica por batelada alimentada**. Campinas 1990. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP).

OLIVA NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces Cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria from the Alcohol Industry to Several Antimicrobial Compounds. **Braz. J. Microbiol.** V.32 (1) 10 – 14, 2001.

Bibliografia

OLIVEIRA-FREGUGLIA, R.M.; HORII, J. Viabilidade Celular De *Saccharomyces Cerevisiae* Em Cultura Mista Com *Lactobacillus Fermentum*. **Scientia Agricola Print**. 55-3, 1998.

PANRAY BEEHARRY, R. Carbon balance of sugarcane bioenergy systems. **Biomass and Bioenergy**. 20: 5, pp. 361-370, 2001.

PARENTE, E; GIGLIO, M.A; RICCIARDI, A.; CLEMENTI, F. The combined effect of nisin, leucocin f10, pH, NaCl and EDTA on the survival of *L. monocytogenes* in broth. **Intl. J. Food Microbiology**. 40(98)65-75, 1998.

PERIAGO, P.M.; MOEZELAAR, R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**.v 68 141-148, 2001

PRADO-FILHO, L.G.; DOMINGOS, R.N.; SILVA, S.M.G.. Acúmulo De Cádmio Por *Saccharomyces Cerevisiae* Fermentando Mosto De Melaço. **Scientia Agricola**. 55-1, 1998.

RAZAVI-ROHANI, -S.M.; GRIFFITHS, -M.W. Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria associated with foods by combinations of antimicrobial agents. **Journal-of-food-safety (USA)**. v. 16(2) p. 87-104, 1996.

RIBEIRO C.A.F. Potencialidades de Linhagens de Levedura *Saccharomices cereviviae* para fermentação do Caldo de Cana. **Scientia Agricola Print**. 56-2, 1998.

RODRIGO, M.; MARTINEZ, A.; CARBALLO, B.M. Medida de la Termorresistência de los Microorganismos. I. Termobacteriologia. **Rev. Agroquim. Tecnol. Alimentos** . 30:2 175-188, 1990.

ROGERS, A.M.; MONTVILLE, T.J. Improved agar diffusion assay for nisin quantification. **Food biotechnology**.5(2), 161-168, 1991.

ROUKAS, T. Ethanol Production from Non-sterilized Beet Molasses by Free and Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells Using Fed-batch Culture. **Journal of Food Engineering**. 27: 1 87-96, 1996.

Bibliografia

SALGUEIRO, S.P.; CORREIA, I; NOVAIS, J.M. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. **Applied-and-Environmental-Microbiology**. 54 (4) 903-909, 1988.

SANDERS, M.E. Probiotics. **Food Technology**. V. 53(11)67-77, 1999.

SOARES, G.A.M.; SATO, H.H. Killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L active against Fleischmann and Itaiquara commercial brands of yeast. **Rev. Microbiol.** Vol.30 n.3, São Paulo, 1999.

SREE, N. K.; SRIDHAR, M.; SURESH, K.; BANAT, I.M.; VENKATESWAR RAO, L. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. **Bioresource Technology**. 72 (2000) 43±46, 2000.

STAN, S.; DESPA, F. On the doublet formation in the flocculation process of the yeast cells. **Biosystems**. 57: 3 139 - 145, 2000.

STILES, M.E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology**. 70 (2-4) 331-345, 1996.

STRATFORD, M. Yeast flocculation: restructuring the theories in line with recent research. **Cerevisia (Belgium)**. **Belgian Journal of Brewing and Biotechnology**. 21(1) p. 38-45, 1996.

STROPPIA C.T. **Avaliação da Ação de Antibióticos Utilizados na Fermentação Alcoólica Através do Consumo de Açúcar por Bactérias Contaminantes**. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1998.

STROPPIA C.T.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; SERRA, G.E. Use of penicillin and monensin to control bacterial contamination of Brazilian alcohol fermentations. **International Sugar Journal**. 102 (1214) 78-79, 81-82, 2000.

STROPPIA, C.T.; SERRA, G.; ANDRIETTA, M.G.S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S.R. Consumo de Açúcar por Bactérias Contaminantes da Fermentação Alcoólica Associado ao Uso de Antibióticos. **STAB**. 16(3), 35-38, 1998.

Bibliografia

SUMBO, C.R. **Thermobacteriology in Food Processing**. Academic press, 2 Ed.. Nova Iorque, 1973. 329 pp.

STUPIELLO, M.G.S. **Avaliação de Metodologia para Estudo da Ação de Alguns Antimicrobianos frente a Bactérias Gram + Isoladas da Fermentação**. Tese de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, 1993.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Practical and Theoretical Considerations in the Production of High Concentrations of Alcohol by Fermentation. **Process Biochemistry**. 31: 4 321-331, 1996.

THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.; DELVES, J. Nisin. Naidu, A. S.. **Natural Food Antimicrobial Systems**. Primeira edição., Boca Raton: CRC press, 2000, Capítulo 18, 463-524.

TROMBINI, M.A.M.; ROVANHOL, A.A.; VITTI, L.S.S.; BEDA,D.F.; PORTO, R.C.B.; SÁ, J.S. Causas da Contaminação e Suas Consequências em Usinas de Açúcar e Alcool. **STAB**. 16(6), 18, 1998.

UECKERT, J. E.; STEEG, P. F.; COOTE, P.J. Synergistic antibacterial action of heat in combination with nisin and magainin II amide. **Journal of Applied Microbiology**. 85,487-494, 1998.

WELTEN, H.G.J. Measuring of Yeast Growth and Use of Mass Balance During Fermentation and Lagering. **Heineken Technical Services B.V.** [s.n.t.] Zoterwoode, 1994.

VIEGAS, C.; SÁ-CORREIA, I. Effect of low temperature (9-33°C) and pH (3,3-5.7) in the loss of *Saccharomyces cerevisiae* viability by combining lethal concentrations of ethanol with octanois and decanoic acids. **Intl. J. Food Microbiology**. V.34 (1997)267-277, 1997.

YAMAZAKI, K.; MURAKAMI, M.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; MATSUDA, T. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. **Food Microbiology**, Vol. 17, No. 3, Jun pp. 315-320, 2000.

Bibliografia

ZAPICO, P.; PAZ, M.; MEDINA, M; NUNEZ, M. The effect of homogenization of whole milk, skim milk and milk fat on nisin activity against *Listeria innocua*. **International Journal of Food Microbiology** 46 (1999) 151–157, 1999.

ANEXO 1

MATERIAL E MÉTODOS COMPLEMENTARES

PREPARO DO MATERIAL ESTÉRIL

Todo o material estéril, meios de cultura, água, meios de fermentação, tubos de diluição, estojo de ponteiras, foi esterilizado em autoclave à 121°C por 15 minutos. Meio Litmus Milk (leite tornassolado), foi esterilizado a 115°C por 10 minutos. Cubetas de espectrofotômetro, termômetros de faixa abaixo de 121°C, plásticos não autoclaváveis foram imersos em álcool 70% por duas horas e secos em capela de fluxo laminar. Pipetas de Pasteur e graduadas, e placas de petri foram esterilizadas em estufa por calor seco à 170°C por 2 horas, acondicionados em estojos ou embaladas adequadamente.

MANUTENÇÃO DE CULTURAS

Os liófilos foram ativados inoculando-se o conteúdo em 10 ml de caldo MRS e incubados em estufa a 37°C, por 48±2 h. Uma alíquota de 0,5 ml de cada cultura ativada foi transferida para tubos do tipo penicilina com 5 ml de meio Litmus Milk sendo lacrados e imediatamente congelados à -18°C.

Um número suficiente de tubos foi produzido de modo que todos os ensaios foram realizados a partir de um mesmo liófilo. Assim, a cada experimento que foi realizado, os tubos congelados foram transferidos para uma estufa e incubados 37°C, por 48±2 h.

Ao final da incubação, uma alíquota de 0,1 ml foi pipetada para cada tubo contendo 10 ml de caldo MRS, incubando-se por 24±2 h à 37°C. Para se obter culturas com altas atividade e concentrações celulares foi padronizado um repique com inóculo de 10% em volume e crescimento à 37°C por apenas 15±2 horas; baseando-se no estudo da cinética de crescimento dos microrganismos.

IDENTIFICAÇÃO DE *Lactobacillus confusus*

Lactobacillus confusus foi identificado pela sequência de testes proposta pelo Manual Bergey's de bacteriologia. Foi realizada coloração de Gram e teste de catalase, além de teste de crescimento a 15°C e 45°C.

Um teste bioquímico de crescimento em meio Hugh-Leifson adicionado de 1% de extrato de levedura foi realizado com os açúcares Arabinose e Celobiose para diferenciação entre espécies. A tabela 1 mostra o meio proposto para o teste.

Tabela 1 - Meio OF (Hugh – Leifson)

Substância	Concentração para 1 L de meio
Peptona (caseína de digestão pancreática)	2,0 g
NaCl	5,0g
K ₂ HPO ₄	0,3g
Indicador pH (Verde Bromotimol)	0,03g
Extrato de levedura	1%