

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – FEA
MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE
ENTEROCINA UTILIZANDO *Enterococcus* spp.

LUCIELEN OLIVEIRA DOS SANTOS

Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. RANULFO MONTE ALEGRE

Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia de Alimentos

CAMPINAS

2004

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

Santos, Lucielen Oliveira dos

Sa59e Estudo da produção e purificação parcial de enterocina
utilizando *Enterococcus* spp. / Lucielen Oliveira dos Santos. –
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos.

1.Enterocinas. 2.Enterococos. 3.Bacteriocinas. I.Alegre, Ranulfo Monte.
II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador
FEA-UNICAMP

Dr^a. Marta C. T. Duarte
Membro
CPQBA-UNICAMP

Dr. Alexandre Ponezzi
Membro
CPQBA-UNICAMP

Dr. Victor Haber Pérez
Membro
FEA-UNICAMP

Dedico aos meus pais, Lucilia e Elmo, pelo amor, pelo carinho, pela compreensão, pelo incentivo e pela confiança e por jamais terem medido esforços para que eu chegasse até aqui.

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim."

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a vida e condições de subir mais um degrau em minha carreira profissional;

Ao Prof. Ranulfo Monte Alegre pela dedicação na orientação deste trabalho, compreensão, incentivo e companheirismo ;

Aos membros da Banca Examinadora que com sua experiência científica e conceituada qualificação enriqueceram as discussões deste trabalho;

A UNICAMP, uma instituição pública, gratuita e de qualidade, por ter me acolhido durante o curso de mestrado;

Ao CNPq e a CAPES pela bolsa de estudos;

A minha mãe Lucilia que por muito tempo foi pai e mãe me apoiando em tudo durante toda a minha vida pessoal e profissional. Ao meu pai Elmo que apesar de na maior parte da minha vida estar um pouco distante, me deu a força necessária para chegar até aqui. Enfim, aos meus pais que me apoiaram incondicionalmente em todas as etapas de minha vida. Obrigada por me acompanharem com carinho e estímulo, procurando amenizar minha ansiedade em cada telefonema, mantendo-me firme diante dos obstáculos. Obrigada por acreditarem e investirem em meu potencial, transmitindo-me assim a confiança e coragem, necessárias para que eu continuasse a caminhada;

A minha madrinha Beatriz pelo apoio, carinho e incentivo durante todas as etapas da minha vida;

As minhas amigas Jaqueline e Lucia que mesmo distantes, me deram a força necessária para continuar e concluir mais esta etapa, vocês são muito importantes;

Ao Machadinho e Otávio meus amigos e praticamente irmãos que me ajudaram e “incomodaram bastante” em todos os momentos;

A Márcia, Tati e Veri minhas amigas, minha família longe de casa, minhas colegas de faculdade e de convívio diário, obrigado por tudo;

A minha amiga e “sócia” Bia obrigado pelo carinho, amizade, paciência, dedicação e por compartilhar a sua família comigo, com certeza isto foi, é e será muito importante para mim;

A Camilinha, Christineide, Eli, Hélio, Lineu e Rode todos meus amigos cada um com seu jeito muito especial, que fizeram com que esta etapa fosse mais prazerosa, obrigado pelo carinho, amizade, companheirismo, conselhos, rodas de chimarrão, almoços de domingo, festas, churrascos, viagens, etc;

A Adri minha amiga que deu todo o apoio inicial nesta cidade e continua sendo uma pessoa muito especial em minha vida;

Ao meu ex-orientador e amigo Jorge A. V. Costa por ter me mostrado o mundo da pesquisa e, de certa forma, ser responsável por eu estar aqui hoje;

Ao Rafael Pimentel pela amizade, carinho, auxílio na execução deste trabalho e pela paciência durante todos os dias no laboratório;

Aos meus colegas de mestrado, Jaque, Olga, César e Chiquinho, que de uma maneira ou de outra ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, sorriram nos momentos de descontração e se preocuparam nas horas difíceis;

Aos colegas de laboratório Ana Cláudia, Jean e Mauricio pelo bom clima de trabalho;

Enfim, a todos os amigos e aos que contribuíram, de alguma maneira, para a realização deste trabalho. Muito obrigado a vocês, não importa quantos e quais nomes vocês tenham.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
-------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS	xii
NOMENCLATURA	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. BACTERIOCINAS	4
3.2. ENTEROCOCOS	9
3.3. PRODUÇÃO DE ENTEROCINA	12
3.4. ATIVIDADE E MODO DE AÇÃO DAS ENTEROCINAS	15
3.5. PURIFICAÇÃO DAS ENTEROCINAS	20
3.6. ESTABILIDADE DAS ENTEROCINAS	22
3.7. APLICAÇÃO E USO	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. MICRORGANISMO	29
4.1.1. Cultura Estoque	29
4.1.2. Pré-inóculo	30
4.1.3. Inóculo	30
4.2. MICRORGANISMOS TESTE	30
4.2.1. Propagação e Manutenção	30
4.2.2. Cultivo	31
4.3. SUBSTRATO	31
4.4. PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM FRASCOS ERLLENMEYERS	31
4.4.1. Definição Preliminar das Condições de Cultivo para Produção de Enterocina	31
4.4.2. Produção de Enterocina em Frascos Erlenmeyers	34
4.5. PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM FERMENTADOR DE BANCADA	35

4.6.	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	36
4.6.1.	Determinação de Massa Celular Seca (MCS)	36
4.6.2.	Determinação de pH	36
4.6.3.	Determinação da Concentração de Açúcar (Consumo de Substrato).....	36
4.6.4.	Determinação da Atividade de Enterocina (UE)	37
4.6.5.	Determinação da Atividade de Enterocina (UE) com <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A como Microrganismo Teste.....	37
4.6.6.	Purificação Parcial da Enterocina.....	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1.	PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM FRASCOS ERLENMEYERS ...	40
5.1.1.	Definição Preliminar das Condições de Cultivo para Produção de Enterocina.....	40
5.1.2.	Produção de Enterocina em Frascos Erlenmeyers.....	45
5.2.	PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM FERMENTADOR DE BANCADA.....	52
5.3.	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE ENTEROCINA UTILIZANDO <i>Listeria monocytogenes</i> SCOTT A COMO MICRORGANISMO TESTE..	69
5.4.	PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS ENTEROCINAS.....	74
6.	CONCLUSÕES.....	76
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Exemplos de bacteriocinas produzidas por microrganismos.....	8
Tabela 3.2 - Atividade da enterocina EL1 encontrada no sobrenadante e nas células devido a variação de pH da solução tampão utilizada para a extração.....	22
Tabela 4.1 - Composição do Meio Basal Modificado por OGRODOWSKI (2001).....	29
Tabela 4.2 - Experimentos preliminares feitos para averiguar a produção de enterocina em frascos Erlenmeyers utilizando <i>Enterococcus faecium</i>	32
Tabela 4.3 - Experimentos preliminares feitos para averiguar a produção de enterocina em frascos Erlenmeyers utilizando <i>Enterococcus faecalis</i>	33
Tabela 4.4 - Produção de enterocina utilizando o <i>E. faecium</i> , em frascos Erlenmeyers.....	34
Tabela 4.5 - Produção de enterocina utilizando o <i>E. faecalis</i> , em frascos Erlenmeyers.....	35
Tabela 4.6 - Produção de enterocina utilizando o fermentador de bancada Bioflo III.....	36
Tabela 4.7 – Testes feitos para a determinação de atividade de enterocina utilizando <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A como microrganismo teste.....	38
Tabela 5.1 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e concentração de açúcar (g.L^{-1}) dos experimentos preliminares com <i>E. faecium</i> em frascos Erlenmeyers nos tempos de 0, 24 e 48h.....	41
Tabela 5.2 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e concentração de açúcar (g.L^{-1}) dos experimentos preliminares com <i>E. faecalis</i> em frascos Erlenmeyers nos tempos de 0, 24 e 48h.....	42
Tabela 5.3 – Consumo de açúcar (g.L^{-1} e %) verificado nos experimentos preliminares por <i>E. faecium</i> feitos em frascos Erlenmeyers entre o tempo inicial e final de fermentação (0 e 48h).....	43
Tabela 5.4 – Consumo de açúcar (g.L^{-1} e %) verificado nos experimentos preliminares por <i>E. faecalis</i> feitos em frascos Erlenmeyers entre o tempo inicial e final de fermentação (0 e 48h).....	44
Tabela 5.5 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e concentração de açúcar (g.L^{-1}) durante a produção de enterocina em frascos Erlenmeyers por <i>E. faecium</i> nos tempos de 0 e 24h.....	46
Tabela 5.6 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e concentração de açúcar (g.L^{-1}) durante a produção de enterocina em frascos Erlenmeyers por <i>E. faecalis</i> nos tempos de 0 e 24h.....	48

Tabela 5.7 – Consumo de açúcar (g.L^{-1} e %) verificado nos experimentos para produção de enterocina em frascos Erlenmeyers por <i>E. faecium</i> (ensaios 1 a 16) e <i>E. faecalis</i> (ensaios 17 a 32) entre o tempo inicial e final de fermentação (0 e 24h).....	51
Tabela 5.8 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), concentração de açúcar (g.L^{-1}) e atividade de enterocina (UE) e durante a produção de enterocina por <i>E. faecium</i> em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando sacarose e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 (Ensaio 1).....	53
Tabela 5.9 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), concentração de açúcar (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) durante a produção de enterocina por <i>E. faecium</i> em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando açúcar mascavo e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 (Ensaio 2).....	56
Tabela 5.10 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), concentração de açúcar (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) durante a produção de enterocina por <i>E. faecalis</i> em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando sacarose e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 6,0 (Ensaio 3).....	58
Tabela 5.11 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), concentração de açúcar (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) durante a produção de enterocina por <i>E. faecium</i> em fermentador de bancada sem agitação, utilizando sacarose e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 (Ensaio 4).....	60
Tabela 5.12 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), concentração de açúcar (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) durante a produção de enterocina por <i>E. faecium</i> em fermentador de bancada sem agitação, utilizando açúcar mascavo e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 (Ensaio 5).....	62
Tabela 5.13 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), concentração de açúcar (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) durante a produção de enterocina por <i>E. faecalis</i> em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando açúcar mascavo e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 (Ensaio 6).....	64
Tabela 5.14 – Consumo de açúcar (g.L^{-1} e %) verificado nos ensaios para produção de enterocina em fermentador de bancada entre o tempo inicial e final de fermentação (0 e 24h).....	66

Tabela 5.15 – Valores de atividade de enterocina de <i>E. faecium</i> (UE) dos testes I, II e III usando como microrganismo teste <i>L. monocytogenes</i> Scott A, com e sem pasteurização do sobrenadante, durante tempo total de 6h de incubação.....	70
Tabela 5.16 – Valores de atividade de enterocina de <i>E. faecalis</i> (UE) dos testes I, II e III usando como microrganismo teste <i>L. monocytogenes</i> Scott A, com e sem pasteurização do sobrenadante, durante tempo total de 6h de incubação.....	72
Tabela 5.17 – Valores de atividade de enterocina (UE) dos sobrenadantes obtidos durante as etapas de purificação parcial das enterocinas produzidas por <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> em fermentador de bancada nos ensaios 4 e 3, respectivamente.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Crescimento em caldo BHI de (a) culturas puras e (b) cultura mista de <i>Enterococcus faecium</i> NCIB 2702 (o) e <i>Listeria innocua</i> SL (●).....	17
---	----

Figura 3.2 - Contagem de <i>Listeria innocua</i> LIN11 em meio TSBYE (pH 7,0) a 30°C, após adição de enterocina EFS2 (▲), nisina (●) e amostra controle sem bacteriocinas (■).....	19
Figura 5.1 - Valores de atividade de enterocina (UE) e pH _{final} de fermentação em frascos Erlenmeyers por <i>E. faecium</i> com 24h de incubação dos ensaios 1 a 16.....	47
Figura 5.2 - Valores de atividade de enterocina (UE) e pH _{final} de fermentação em frascos Erlenmeyers por <i>E. faecalis</i> com 24h de incubação.....	49
Figura 5.3 - Valores de pH (■), massa celular seca (●), concentração de sacarose (×) e atividade de enterocina (▲) por <i>E. faecium</i> em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando sacarose e pH _{inicial} 10,0 (Ensaio 1).....	54
Figura 5.4 - Valores de pH (■), massa celular seca (●), concentração de açúcar mascavo (×) e atividade de enterocina (▲) por <i>E. faecium</i> em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando açúcar mascavo e pH _{inicial} 10,0 (Ensaio 2).....	57
Figura 5.5 - Valores de pH (■), massa celular seca (●), concentração de sacarose (×) e atividade de enterocina (▲) por <i>E. faecalis</i> em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando sacarose e pH _{inicial} 6,0 (Ensaio 3).....	59
Figura 5.6 - Valores de pH (■), massa celular seca (●), concentração de sacarose (×) e atividade de enterocina (▲) por <i>E. faecium</i> em fermentador de bancada sem agitação, utilizando sacarose e pH _{inicial} 10,0 (Ensaio 4).....	61
Figura 5.7 - Valores de pH (■), massa celular seca (●), concentração de açúcar mascavo (×) e atividade de enterocina (▲) por <i>E. faecium</i> em fermentador de bancada sem agitação, utilizando açúcar mascavo e pH _{inicial} 10,0 (Ensaio 5).....	63
Figura 5.8 - Valores de pH (■), massa celular seca (●), concentração de açúcar mascavo (×) e atividade de enterocina (▲) por <i>E. faecalis</i> em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando açúcar mascavo e pH _{inicial} 10,0 (Ensaio 6).....	65
Figura 5.9 – Atividade de enterocina dos testes I, II e III utilizando enterocina produzida por <i>E. faecium</i> , com (CP) e sem (SP) pasteurização do sobrenadante, durante tempo total de 6h de incubação. Teste I SP (■), teste I CP (●), teste II SP (+), teste II CP (▲), teste III SP (○) e teste III CP (□).....	70
Figura 5.10 – Atividade de enterocina dos testes I, II e III utilizando enterocina produzida por <i>E. faecalis</i> , com (CP) e sem (SP) pasteurização do sobrenadante, durante tempo total de	

6h de incubação. Teste I SP (■), teste I CP (●), teste II SP (+), teste II CP (▲), teste III SP (○) e teste III CP (□).....	72
---	----

NOMENCLATURA

ART: açúcares redutores totais

AU: unidade arbitrária de atividade

BHI: meio Brain Heart Infusion

BU: unidade de atividade de bacteriocina

CCT: Coleção de Culturas Tropical

g: grama

h: hora

L: litro

M: gmol.L^{-1}

MCS: massa celular seca

min: minuto

mL: mililitro

MRS: meio Man Rogosa Sharp

N: nEqg.L^{-1}

P.A.: padrão analítico

p/v: peso por volume

rpm: rotações por minuto

UE: unidade de atividade de enterocina

UFC: unidade formadora de colônia

v/v: volume por volume

RESUMO

As bacteriocinas são substâncias protéicas produzidas por bactérias, com atividade bactericida e bacteriostática contra bactérias sensíveis. Estes compostos são produzidos por microrganismos gram-positivos e gram-negativos, incluindo as bactérias lácticas. Estas bactérias são extensamente usadas no processamento de alimentos devido a sua contribuição na vida de prateleira, textura e propriedades organolépticas. Algumas cepas de enterococos podem produzir bacteriocinas ativas contra bactérias patogênicas, tal como a *Listeria monocytogenes*. As bacteriocinas produzidas por *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* são peptídeos pequenos, hidrofóbicos e termoestáveis.

Dentro deste contexto este trabalho teve como objetivo estudar a produção de enterocina por *E. faecium* e *E. faecalis*. Inicialmente, as fermentações foram feitas em frascos Erlenmeyers, incubados a 37°C por 24h, para determinar as melhores condições de fonte de carbono (glicose, sacarose comercial ou açúcar mascavo), pH_{inicial} (4,0; 6,0; 8,0 ou 10,0) e agitação (0 ou 200rpm). O meio basal modificado sem glicose foi usado como meio base sendo complementado com diferentes fontes de carbono. Em um segundo estágio, os experimentos foram conduzidos em fermentador de bancada por 24h. Durante as fermentações foram coletadas amostras em intervalos de 24h ou 1h, para a determinação da atividade de enterocina, massa celular seca, pH e conteúdo de açúcar.

Os resultados obtidos a partir dos testes em frascos Erlenmeyers indicam que usando o *E. faecium* para produção de enterocina as melhores condições de cultivo foram pH_{inicial} 10,0, sacarose e sem agitação. A máxima produção de enterocina foi 2,81UE. Os resultados indicaram que as melhores condições para produção de enterocina usando *E. faecalis* foram pH_{inicial} 10,0, 200rpm e açúcar mascavo, com atividade de enterocina de 1,68UE. No fermentador, a maior atividade de enterocina foi 2,94UE após 21h de fermentação no experimento com pH_{inicial} 10,0, 200rpm, sacarose e *E. faecium*. A atividade de enterocina foi de 1,30UE após 12h de incubação no experimento com pH_{inicial} 10,0, 200rpm, açúcar mascavo e *E. faecalis*.

A *L. monocytogenes* Scott A foi utilizada como microrganismo teste e foi inibida pelas enterocinas produzidas por *E. faecium* e por *E. faecalis*.

Palavras-chaves: enterocina, enterococos, bacteriocina.

ABSTRACT

Bacteriocins are protein substances produced by bacteria that are bactericidal or bacteriostatic against sensitive bacterial species. Both gram-negative and gram-positive organisms, including the lactic acid bacteria, produce these compounds. These bacteria are extensively used in food processing, for their contribution to shelf life, texture and organoleptic properties. Some strains of enterococci can produce bacteriocins active against pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*. Bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* are small, hydrophobic and thermostable peptides.

The aim of this work was the study of enterocin production by *E. faecium* and *E. faecalis*. Initially, fermentations assays were carried out in Erlenmeyers flasks for determining the best conditions of carbon sources (glucose, sucrose and brown sugar), pH_{initial} (4,0; 6,0; 8,0 or 10,0) and agitation (0 or 200rpm). The modified basal medium without glucose was used as base medium and the different carbon employed. The flasks incubated at 37°C for 24h. In a second stage, the experiments were carried out in laboratory scale fermentor for 24h. During the fermentations samples were collected at intervals of 24 h or 1h, for determination of enterocin activity, biomass (cell dry mass), pH and sugar contents.

The first phase in Erlenmeyers flasks indicated that using *E. faecium* for enterocin production the best culture conditions were pH_{initial} 10,0, sucrose and without agitation. The maximum enterocin production was 2,81UE. The results indicated that the best conditions for enterocin production using *E. faecalis* were pH_{initial} 10,0, 200rpm and brown sugar, with enterocin activity of 1,68UE. In fermentor the highest enterocin activity was 2,94UE after 21h of fermentation in experiment using pH_{initial} 10,0, 200rpm, sucrose and *E. faecium*. The enterocin activity was 1,30UE after 12h of incubation in experiment with pH_{initial} 10,0, 200rpm, brown sugar and *E. faecalis*.

When it was used *L. monocytogenes* Scott A as microorganism test occurred its inhibition by enterocin of *E. faecium* and *E. faecalis*.

Key words: enterocin, enterococcus, bacteriocin.

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia ocupa uma posição de destaque no desenvolvimento integrado e harmônico da humanidade. Sua reconhecida importância traduz-se de maneira clara, tendo-se em vista o seu caráter multidisciplinar, pois engloba o uso da Microbiologia, da Bioquímica, da Engenharia, entre outras.

No sentido tecnológico, fermentação significa todo processo em que microrganismos de interesse atuam sobre substratos orgânicos, através de suas enzimas, e produzem determinadas substâncias ou substratos modificados úteis para o homem. Processos fermentativos são processos de transformação de material biológico ou de meio sintético por agentes biológicos, originando produtos de interesse (REGULY, 1996).

O consumo de alimentos formulados com preservativos naturais tem recebido maior interesse do consumidor, bem como, alimentos naturais e minimamente processados. Como resultado, há um maior interesse nos agentes antimicrobianos produzidos naturalmente. Devido aos elevados gastos com doenças relacionadas ao consumo de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos, os alimentos “seguros” têm recebido crescente interesse (YANG e RAY, 1994; CLEVELAND et al., 2001).

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas produzidos por bactérias que podem eliminar ou inibir o crescimento de outras bactérias. Muitas bactérias lácticas produzem uma grande diversidade de bacteriocinas. Ainda que as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas sejam encontradas em vários alimentos fermentados ou não, a nisina é geralmente a única bacteriocina largamente usada como preservativo em alimentos (CLEVELAND et al., 2001). As bacteriocinas de bactérias lácticas inibem uma faixa limitada de microrganismos patogênicos e esporulados e, por essa razão, são potencialmente úteis como preservativos em alimentos. Para esse fim, estas substâncias podem ser produzidas “in situ” por bactéria iniciadora ou através de separação do fermentado com posterior adição ao alimento (BARNBY-SMITH, 1992; PARENTE e RICCIARDI, 1994; CLEVELAND et al., 2001).

A nisina é usada como aditivo no processamento de queijos, embora vale ressaltar que outras bacteriocinas possuem o mesmo potencial de aplicação como preservativos

naturais de alimentos, não sendo muito usadas devido às informações insuficientes do modo de ação e cinética de destruição celular em função do pH e temperatura para fazer com que estas bacteriocinas possam ser usadas em alimentos (MAISNIER-PATIN et al., 1996).

Cepas de *Enterococcus* spp. têm sido isoladas de produtos alimentícios tais como azeitonas, alimentos fermentados, produtos lácteos e cárneos. Estudos mostram que as enterocinas produzidas a partir destas bactérias possuem alta especificidade contra vários microrganismos, entre eles a *Listeria* spp., podendo ser útil para o controle destes organismos em alimentos fermentados.

A aplicação de bacteriocinas de bactérias lácticas, em combinação com outros métodos tradicionais de preservação, pode ser efetiva para controlar as bactérias patogênicas e degradadoras, particularmente as patogênicas para humanos (ABEE, 1995). Estas bactérias têm sido reconhecidas, nos últimos anos, como os agentes mais problemáticos em higiene e inocuidade alimentar (GUERRA e BERNARDO, 2001).

AUDISIO et al. (2001) estudando o efeito de diferentes fontes de carbono para a síntese de bacteriocina utilizando *E. faecium* CRL1385, verificaram que o açúcar mascavo, quando utilizado em substituição à glicose no caldo LAPT, apresentou os melhores resultados de produção de enterocina.

O isolamento e a purificação das bacteriocinas permite que sejam adicionadas a uma grande variedade de alimentos, mas muitas delas são difíceis de serem purificadas e são instáveis na forma pura (BARNBY-SMITH, 1992).

Normalmente são utilizados meios complexos para o crescimento de bactérias lácticas e isto faz com que estes compostos dificultem as etapas de extração e purificação das bacteriocinas (PARENTE e HILL, 1992a). A precipitação com sulfato de amônio é citada como sendo o método mais favorável para a separação de bacteriocinas e em pH 2,0 ocorre a máxima liberação para o meio de cultivo (CAROLISSEN-MACKAY et al., 1997; YANG et al., 1992).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a produção e purificação parcial de enterocina utilizando *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* através de fermentação submersa.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação dos microrganismos produtores (*E. faecalis* ou *E. faecium*) de enterocina;
- Escolha do pH_{inicial} do meio de cultura e agitação ideais para a produção de enterocina;
- Avaliação da utilização de açúcar mascavo comercial, sacarose comercial e glicose como fontes de carbono no meio basal modificado;
- Comparar a produção de enterocina em frascos de Erlenmeyers e fermentador de bancada (Bioflo III);
- Purificar parcialmente a enterocina;
- Verificação da capacidade de inibição da *Listeria monocytogenes* Scott A utilizando as enterocinas produzidas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. BACTERIOCINAS

Muitas bactérias são capazes de produzir determinadas substâncias com atividade bactericida, denominadas genericamente de bacteriocinas. A produção de bacteriocinas é mediada por plasmídios, assim como é plasmidial a resistência as bacteriocinas (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Em 1925 ocorreu a descoberta das primeiras bacteriocinas que foram as colicinas, as quais apresentaram-se ativas contra *Escherichia coli*. Tais bacteriocinas foram produzidas por determinadas cepas de *E. coli* e algumas enterobactérias (DE VUYST e VANDAMME, 1994; FRANCO e LANDGRAF, 1996). Atualmente são conhecidas várias outras bacteriocinas produzidas principalmente por microrganismos gram-positivos, patogênicos ou não. O maior interesse na área de alimentos está sendo pelas bactérias lácticas, as quais são capazes de produzir uma ou mais bacteriocinas (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

As bacteriocinas constituem um grande e heterogêneo grupo de proteínas e peptídeos sintetizados ribossomicamente com propriedades antibacterianas que variam no espectro de atividade, modo de ação, peso molecular, origem genética e propriedades bioquímicas. (KLAENHAMMER, 1993; VLAEMYNCK et al., 1994; ABEE, 1995; CLEVELAND et al., 2001; HERRANZ et al., 2001; LEROY e DE VUYST, 2002; MORENO et al., 2003). Podem ser usadas como preservativos naturais em alimentos aumentando a vida de prateleira e mantendo a sanidade dos produtos alimentícios (CALLEWAERT et al., 2000; LOSTEINKIT et al, 2001).

De acordo com KLAENHAMMER (1993), as principais classes de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas incluem: (I) lantibióticos, (II) peptídeos pequenos estáveis ao calor, (III) proteínas instáveis ao calor e (IV) complexos protéicos cuja atividade requer a associação de um carboidrato ou lipídio.

Geralmente os preservativos químicos artificiais são empregados para limitar o número de microrganismos capazes de crescer nos alimentos, mas a atenção dos

consumidores tem sido voltada aos riscos à saúde associados a algumas destas substâncias, o que tem induzido pesquisadores a examinar a possibilidade do uso de bacteriocinas produzidas por bactérias láticas como biopreservativos (DE VUYST e VANDAMME, 1994; ABEE, 1995; HOLZAPFEL et al., 1995).

Considerando que os antibióticos são definidos como substâncias produzidas por um organismo que possui atividade inibidora em baixas concentrações contra outros organismos, a definição de bacteriocinas é muito mais restrita (DE VUYST e VANDAMME, 1994). As bacteriocinas são claramente distinguíveis dos antibióticos no seu modo de ação, síntese, espectro inibidor, toxicidade e mecanismos de resistência. As bacteriocinas são aplicáveis em alimentos; sintetizadas ribossomicamente e possuem uma estreita faixa de atividade, as células produtoras são imunes e normalmente afetam no microrganismo sensível a composição da membrana celular através da formação de poros e sua toxicidade não é relatada. Entretanto, os antibióticos são aplicáveis de modo clínico, são metabólitos secundários, o seu espectro de inibição varia, a célula produtora não é imune a este composto, normalmente afetam diferentes pontos das bactérias sensíveis (membrana celular ou compostos intracelulares) e possui toxicidade (CLEVELAND et al., 2001).

As bacteriocinas são utilizadas não somente na preservação de alimentos, mas também em aplicação clínica, como por exemplo, a lacticina 3147 e nisina podem prevenir a mastite em vacas (LOSTEINKIT et al, 2001). A enterocina CRL35 isolada de *E. faecium* CRL35 apresentou habilidade em inibir a multiplicação “in vitro” de células do vírus causador de herpes (WACHSMAN et al., 1999).

As bactérias láticas estão entre o grupo de microrganismos mais importantes no processamento de alimentos, tais como produtos lácteos e cárneos fermentados, principalmente devido a sua contribuição no desenvolvimento de flavor, textura, vida de prateleira e preservação nos alimentos (DU TOIT et al., 2000; OLASUPO et al., 2001; LEROY e DE VUYST, 2002; SARANTINOPOULOS et al., 2002; GIRAFFA, 2003). Predominam também nos processos de fermentação de alimentos devido à habilidade de produzir bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos (CAROLISSEN-MACKAY et al., 1997; HERRANZ et al., 2001; SABIA et al., 2002). As células de bactérias láticas e seus metabólitos, incluindo as bacteriocinas, têm sido consumidas pelo homem por

centenas de anos sem que ocorra qualquer efeito adverso (YANG e RAY, 1994; HOLZAPFEL et al., 1995).

Recentes estudos têm demonstrado que a produção de vários tipos de bacteriocinas por uma única cepa de bactéria láctica é um fenômeno mais comum encontrado na natureza do que inicialmente acreditado (CINTAS et al., 1998; HERRANZ et al., 2001; LEROY e DE VUYST et al., 2002). MURIANA (1996) citou que diferentes cepas da mesma espécie podem produzir diferentes níveis da mesma bacteriocina.

A identificação de bacteriocinas de bactérias lácticas com amplo espectro de inibição contra microrganismos patogênicos e deteriorantes ganhou interesse para a aplicação como preservativos em alimentos (DE VUYST e VANDAMME, 1994; RODRÍGUEZ et al., 2000). O espectro inibidor é restrito a bactérias gram-positivas, sendo que várias bacteriocinas produzidas são ativas contra *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, muitas bacteriocinas são estáveis ao calor, podendo ser aplicadas em combinação com tratamento térmico. Assim, as principais propriedades das bacteriocinas são: atividade bactericida, modo de ação irreversível, estáveis nos alimentos, biodegradáveis, digestíveis, seguras para saúde e ativas a baixas concentrações (DE VUYST e VANDAMME, 1994).

A biossíntese das bacteriocinas ocorre durante ou no final da fase exponencial de crescimento. Geralmente são produtos da excreção celular, mas uma parte dos compostos com atividade antimicrobiana pode permanecer retida no interior da célula. Por outro lado, vários autores verificaram que a produção de bacteriocinas está relacionada com a biomassa bacteriana (GUERRA e BERNARDO, 2001). Logo, as condições favoráveis para o crescimento bacteriano e formação de altas densidades celulares são freqüentemente benéficas para a produção de bacteriocinas. Porém, uma alta produção celular não resulta necessariamente em formação de grandes quantidades de bacteriocinas. A produção de bacteriocina pelas bactérias lácticas segue cinética de primeira ordem, significando que a liberação ocorre durante o processo de crescimento (FRANZ et al., 1996; LEROY e DE VUYST, 2002).

As bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos por dois métodos: como composto puro, ou no caso de produtos fermentados, pelo uso de bactérias lácticas que secretam as bacteriocinas (BARNBY-SMITH, 1992; LYON et al., 1995; GIRAFFA, 2003). Produtos tradicionais fermentados que contém bacteriocinas são consumidos há séculos, como por exemplo, cepas de *Pediococcus acidilactici* que produzem a bacteriocina pediocina AcH, a qual a cepa foi isolada de salsichas fermentadas e considerada segura e GRAS (Generally Regarded as Safe) (BARNBY-SMITH, 1992; LYON et al., 1995). As bacteriocinas são conhecidas há décadas e na Tabela 3.1 são mostrados alguns exemplos.

Nos Estados Unidos o uso de culturas starter produtoras de bacteriocinas como ingredientes não requer considerações especiais se a cultura é considerada como GRAS (Generally Recognized as Safe). Uma bacteriocina purificada somente é usada como conservante em alimentos, se for confirmada como GRAS, de acordo com o “Code of Federal Regulations”, apesar de que o FDA (Food and Drug Administration) pode requerer uma justificativa da afirmação. O uso de antibióticos é proibido em alimentos nos Estados Unidos, ao passo que a nisina foi confirmada como sendo GRAS em 1988 e muitos autores têm esboçado interesse na aprovação de novas bacteriocinas para uso em alimentos (CLEVELAND et al., 2001).

HURST (1981), citado por FLÔRES (2000), relatou que o uso de nisina para conservação de alimentos foi primeiramente permitido na Grã-Bretanha, sem limitações de quantidade ou necessidade de declarar sua presença no rótulo, mas foi restrita a alimentos enlatados que recebessem um mínimo tratamento térmico ou em alimentos que tivessem pH menor do que 4,5 e também para queijos e cremes

Em 1969, a Comissão da Organização de aditivos de alimentos dos especialistas em aditivos de alimentos deu aceitação internacional a nisina. O uso de nisina como aditivo é considerado aceitável se a média de consumo diário estiver entre 0-33000 unidades de nisina/Kg de peso corpóreo (existe cerca de 40×10^6 unidades em 1g de nisina pura). Mais de 400 unidades de nisina/grama de alimento são usualmente recomendadas para conservação de alimentos, isto é, cerca de 10ppm. Em um total de 33000 unidades, a média de consumo diário, é menos de 1mg. Uma pessoa de 70Kg pode, então, consumir cerca de 58mg de nisina pura diariamente, se este conservante for usado em queijos processados

aproximadamente 58Kg de queijo poderiam ser consumidos diariamente para alcançar o máximo consumo diário permitido (FLÔRES, 2000).

Tabela 3.1 - Exemplos de bacteriocinas produzidas por microrganismos

Microrganismo	Bacteriocina	Espectro inibidor	Autor (ano)
<i>Bacillus subtilis</i>	Subtilina	Bactérias gram-positivas	KLEIN et al., 1992
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisina	Bactérias gram-positivas	MATTICK e HIRSCH, 1944
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CNRZ	Lacticina 481	Bactérias lácticas; clostrídios	PIARD et al., 1992
<i>Pediococcus</i> <i>pentosaceus</i> FBB61	Pediocina A	Bactérias lácticas; clostrídios; listerias; estafilococos	DAESCHEL e KLAENHAMMER , 1985
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocina PA1	Algumas bactérias lácticas; listeria	GONZÁLEZ e KUNKA, 1987
<i>Enterococcus faecium</i> CRL 35	Enterocina CRL 35	<i>Listeria monocytogenes</i>	MINAHK et al., 2000
<i>Lactobacillus sake</i>	Sakacina A	Algumas bactérias lácticas; listerias	SCHILLINGER e LUCKE, 1989
<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> UL5	Mesenterocina 5	Algumas bactérias lácticas; listerias	DABA et al., 1991
<i>Enterococcus faecalis</i> EFS2	Enterocina EFS2	<i>Listeria innocua</i>	MAINSNIER- PATIN, 1996
<i>Enterococcus faecium</i> 226	Enterocina 226	<i>Listeria monocytogenes</i>	VILLANI et al., 1992
<i>Enterococcus faecalis</i> INIA4	Enterocina 4	<i>Listeria monocytogenes</i>	NUÑEZ et al., 1997

Fonte: BARNBY-SMITH (1992), CLEVELAND et al. (2001), MINAHK et al. (2000).

Existem vários métodos para quantificar as bacteriocinas produzidas. CABO et al. (1999) citaram as vantagens e desvantagens destes métodos. Um dos problemas do método baseado na difusão em ágar é que as bacteriocinas normalmente são peptídeos ou proteínas e estes compostos não apresentam boa difusão em géis, desta forma alguns detergentes, tais como o Tween são utilizados para facilitar este processo. Este método também inclui algumas variáveis que normalmente não são levadas em conta, bem como o efeito que proporcionam no resultado final de atividade, como por exemplo, o tempo de difusão do extrato contendo a bacteriocina e a densidade do ágar utilizado. Este método é semiquantitativo e condicionado a várias interpretações, pois é definido como a menor concentração da bacteriocina que produz uma zona de inibição perceptível. Quando é realizada a medida do diâmetro ou da área da zona de inibição, o grau de erro é alto e a repetibilidade é baixa, o que conduz freqüentemente a respostas de atividades duvidosas. Estes mesmos autores citaram que o pH 6,0 e um tempo de 6h são as condições ideais para realizar ensaios de determinação de atividade.

3.2. ENTEROCOCOS

Essas bactérias, antes um subgrupo do gênero *Streptococcus* passaram a pertencer ao gênero *Enterococcus* a partir de 1984. A utilização dos enterococos como indicadores de contaminação fecal dos alimentos apresenta algumas restrições, pois também são encontrados em ambientes diferentes do trato intestinal. Apesar das limitações do uso desses microrganismos como indicadores de contaminação fecal, sua presença em números elevados em alimentos indica práticas sanitárias inadequadas, ou exposição do alimento a condições que permitiram a multiplicação de microrganismos indesejáveis. Em alimentos fermentados por bactérias do gênero *Enterococcus*, o número elevado desses microrganismos não tem o mesmo significado (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Atualmente 20 espécies pertencem a este gênero, das quais o *E. faecium* e o *E. faecalis* são as mais encontradas. Os enterococos podem estar presentes no solo, na superfície das águas, em plantas e vegetais. Podem crescer em alimentos crus e multiplicar-se durante as fermentações, devido a sua habilidade em sobreviver em condições extremas

de pH, temperatura e salinidade. Estas bactérias podem resistir a condições normais de processamento de alimentos (GIRAFFA, 2003).

Os enterococos podem causar infecções através de alimentos contaminados, mas os casos citados são raros e a comprovação da patogenicidade destes microrganismos é escassa (PARENTE e HILL, 1992b; HOLZAPFEL et al., 1995).

No que diz respeito à produção de bacteriocina de enterococos, esta parece ser uma característica comum para cepas associadas com alimentos. Estas substâncias antibacterianas são chamadas enterocinas. Geralmente pertencem à classe II de bacteriocinas e possuem o potencial de inibir o crescimento de um amplo espectro de microrganismos, sendo na maioria ativas contra bactérias gram-positivas (patogênicas e deteriorantes), mas algumas têm a capacidade de inibir bactérias gram-negativas (SABIA et al., 2002). GÁLVEZ et al. (1989) citaram que a enterocina AS-48 isolada de *E. faecalis* inibiu o crescimento de *Escherichia coli* K-12.

A Classe II de bacteriocinas provenientes de bactérias lácticas despertou maior interesse nos últimos anos como sendo a mais promissora para preservação de alimentos, devido ao seu melhor desempenho em termos de atividade biológica e propriedades físico-químicas do que a maioria das bacteriocinas de outras classes (KLAENHAMER, 1993; ENNAHAR et al., 1999; ENNAHAR et al., 2001; SABIA et al., 2002).

Tanto as bactérias lácticas como os enterococos produzem vários compostos bactericidas incluindo os ácidos orgânicos, que fazem baixar o pH, o peróxido de hidrogênio, enzimas bacteriolíticas e as bacteriocinas (LYON et al., 1995; CINTAS et al., 1998; DU TOIT et al., 2000; GUERRA e BERNARDO, 2001). As bactérias lácticas geralmente são consideradas microrganismos GRAS com muitas aplicações na indústria de alimentos (AYMERICH et al., 2002).

Tem sido relatado que cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* são hábeis em produzir enterocinas com capacidade de inibir a *Listeria* spp., quando estas são desenvolvidas em leite e queijos (GIRAFFA 1995a; GIRAFFA et al., 1995b; NUÑEZ et al., 1997; ENNAHAR et al., 1998; SARANTINOPOULOS et al., 2002). Em geral, as bacteriocinas produzidas a partir destes microrganismos são peptídeos pequenos, hidrofóbicos e

termoestáveis com grande potencial tecnológico (MAISNIER-PATIN et al., 1996; LAUKOVÁ et al., 1999a; MORENO et al., 2003).

Muitas bacteriocinas da classe II identificadas há muito tempo são ativas contra organismos envolvidos em infecções por alimentos e deterioração dos mesmos, como *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Brochothrix* spp. e outras bactérias lácticas deteriorantes (ENNAHAR et al., 1999; ENNAHAR et al., 2001; HERRANZ, et al. 2001).

Nos últimos anos, houve numerosos relatos da produção de enterocinas por enterococos, principalmente por cepas de *E. faecium* associadas a alimentos (GIRAFFA, 1995a; MURIANA, 1996; ENNAHAR et al., 2001). Dentre estes produtos pode-se citar: leite e produtos lácteos (VILLANI et al., 1993; OLASUPO et al., 1994; VLAEMYNCK et al., 1994; MAISNIER-PATIN et al., 1996; NUÑEZ et al., 1997; ENNAHAR et al., 1998; MINAHK et al., 2000; RODRÍGUEZ et al., 2000; LEROY e DE VUYST, 2002; SARANTINOPOULOS et al., 2002), salsichas fermentadas (LYON et al., 1995; CINTAS et al., 1998; HERRANZ et al., 2001; SABIA et al., 2002), frangos (AUDISIO et al., 2001), “nuka” - massa japonesa (LOSTEINKIT et al, 2001) e vegetais (FRANZ et al., 1996).

DOI et al. (2002) isolaram de uma silagem de grama na Tailândia, uma cepa de *E. faecalis* K-4 que produz a enterocina K-4, sendo esta uma bacteriocina de tamanho pequeno, estável ao calor e com atividade antilisteria.

Poucos são os relatos sobre a produção de enterocinas utilizando enterococos de origem intestinal (humana ou animal), mas DU TOIT et al. (2000) isolaram sete cepas de enterococos de fezes de porco e observaram que possuíam atividade contra bactérias gram-positivas. Da mesma forma, as enterocinas produzidas possuíam características semelhantes àquelas produzidas a partir de fonte alimentar.

O peso molecular das enterocinas isoladas e estudadas varia muito: 3000Da (PARENTE e HILL, 1992b); 2500-3000Da (VLAEMYNCK et al., 1994); 6756Da (MAISNIER-PATIN et al., 1996); 3000-4000Da (DU TOIT et al., 2000) 5462Da (ENNAHAR et al., 2001), 4829-5465Da (HERRANZ et al., 2001), 3000-5000Da (LOSTEINKIT et al., 2001) e menor que 5000Da (SABIA et al., 2002).

3.3. PRODUÇÃO DE ENTEROCINA

PARENTE e RICCIARDI (1994) citaram que os fatores que afetam a produção de bacteriocinas em meios com ou sem o controle de pH tem sido estudados por vários autores. Meios complexos são normalmente requeridos para obtenção da produção máxima de bacteriocina, sendo que o pH ótimo de produção raramente coincide com o pH ótimo de crescimento das bactérias lácticas. Estes autores estudaram a influência do pH na produção de enterocina 1146 em fermentação tipo batelada. O meio usado para as fermentações continha (g.L⁻¹): glicose (10,0); triptona (7,5); caseína hidrolisada (5,0); extrato de levedura (2,5); KH₂PO₄ (5,0); Tween 80 (2,0); MgSO₄.7H₂O (0,25) e MnSO₄.4H₂O (0,05). A agitação foi de 300rpm, temperatura 37°C, tempo de fermentação de 16h, 5% (v/v) de inóculo (*E. faecium* DPC1146) e pH_{inicial} 5,0. Durante as diferentes fermentações o pH foi controlado em 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5. O pH do inóculo foi ajustado para 6,8 antes da esterilização. Na fermentação em batelada a pH 5,5 a maior produção foi observada no início do crescimento celular sendo cessada no final do processo. A atividade máxima de bacteriocina (1,96MBU.L⁻¹) foi obtida após 7h de fermentação, ao final do crescimento celular, e a partir deste período a atividade da mesma começou a decrescer. Resultados similares foram obtidos a pH 6,0 e 6,5, enquanto que a produção de bacteriocina foi muito menor a pH 5,0.

A produção da enterocina 1146 por *E. faecium* DPC 1146 é dependente da composição do meio, sendo difícil afirmar em qual fase do crescimento do microrganismo ocorre máxima produção. Utilizando o meio GM17 a maior produção de enterocina aconteceu na fase logarítmica de crescimento enquanto que em leite desnatado reconstituído (10%) na fase estacionária (DE VUYST e VANDAMME, 1994).

YANG e RAY (1994) estudando a produção de quatro bacteriocinas de bactérias lácticas (nisina, pediocina, sakacina e leucocina) concluíram que é altamente influenciada pelas cepas utilizadas, pH final, composição do meio de cultura e tempo de incubação na temperatura ótima de crescimento.

FRANZ et al. (1996) estudaram a caracterização da enterocina 900 produzida por *E. faecium* BFE 900 isolada de azeitonas pretas e também analisaram a influência do pH_{inicial} e do meio de crescimento na produção desta enterocina. Os melhores resultados

foram obtidos em meios de cultura com pH_{inicial} entre 6,0 e 10,0 e valores de produção variando entre 8,81 e 9,28 log UFC.mL⁻¹. A composição do meio que permitiu obter o melhor resultado de atividade (3200AU.mL⁻¹) foi igual a 10g.L⁻¹ de peptona, 5g.L⁻¹ de extrato de levedura, 2g.L⁻¹ de extrato de malte e 1g.L⁻¹ de Tween 80. A unidade de atividade arbitrária (AU) foi definida como a diluição mais alta, que produzia uma zona clara de inibição em placa de petri inoculada com o microrganismo teste (*Lactobacillus sake*) com adição de bacteriocina, sendo multiplicado por um fator de 100 para obter a unidade AU.mL⁻¹ da amostra original.

AUDISIO et al. (2001) estudaram o efeito de diferentes fontes de carbono para a síntese de bacteriocina utilizando *E. faecium* CRL 1385. Como meio padrão foi utilizado o caldo LAPT sem glicose (pH 6,5), adicionado de algumas fontes de carbono (glicose, sacarose comercial e açúcar mascavo). O *E. faecium* cresceu em todos os meios estudados mostrando que a origem da fonte de carbono não afeta significativamente o crescimento. No caldo LAPT sem glicose houve crescimento, porém não se observou produção de bacteriocina. Foram estudados também subprodutos da indústria açucareira como fonte de carbono complementando o meio LAPT (sem glicose) com bagaço de cana, suco de cana, suco da primeira prensagem da cana ou melaço. A atividade de bacteriocina foi mais alta na presença de melaço, provavelmente devido a sua composição química. Os melhores resultados de atividade foram com o açúcar mascavo, glicose e melaço sendo estes 11636, 1600 e 1454AU.mL⁻¹, respectivamente. A glicose é considerada como principal fonte de carbono para a maioria dos microrganismos devido ao seu tamanho, rápida utilização e conversão em energia celular. Entretanto, algumas bactérias possuem uma complexa máquina enzimática que permite o uso de carboidratos complexos para o desenvolvimento. A natureza e a concentração da fonte de carbono são críticas para a produção de bacteriocina. Aparentemente, há uma dependência entre a síntese de bacteriocina e a presença e concentração de frutose e sacarose.

PARENTE e HILL (1992a) analisaram e compararam os fatores que afetam a produção de bacteriocinas por bactérias lácticas. Para isto, foi utilizado o *E. faecium* DPC1146 que cresceu no meio M17, contendo 0,5% de glicose a 37°C por 16h. Como microrganismo teste foram utilizados a *Listeria innocua* DPC1770 e o *Lactococcus lactis*

subsp. *lactis* MG1614, que se desenvolvem em produtos lácteos. A enterocina 1146 foi produzida utilizando meio complexo contendo (g.L⁻¹): glicose (10,0), extrato de levedura (0,0-10,0), triptona (2,5-12,5), β-glicerofosfato de sódio (19,0), MgSO₄.7H₂O (0,25), MnSO₄.4H₂O (0,05) e Tween 80 (0,0-4,0) variando o pH entre 6,0 e 7,0. Os resultados obtidos foram de 0,442 (densidade ótica) e atividade de 1408BU.mL⁻¹ para a enterocina 1146, quando se utilizou 10,0g.L⁻¹ de triptona, 2,5g.L⁻¹ de extrato de levedura, 1,0g.L⁻¹ de Tween 80 e pH 6,75. O pH final ficou entre 4,1 e 4,6. A densidade ótica a 600nm foi usada como medida indireta de biomassa e a atividade em BU.mL⁻¹ foi empregada como a quantidade de bacteriocina necessária para obter 50% de inibição do microrganismo teste comparado com o padrão (sem a bacteriocina).

SARANTINOPOULOS et al. (2002) estudando a produção de enterocina, por *E. faecium* FAIR-E 198, observaram que a máxima atividade foi obtida no meio MRS contendo 2% de glicose, a 37°C e pH controlado em 6,5. Em temperaturas e pH menores a atividade foi menor e a adição de cloreto de sódio reduziu a atividade. O uso de leite desnatado como meio de crescimento resultou em baixa produção de enterocina. Porém, GIRAFFA et al. (1995b) concluíram que o leite é um meio apropriado para o crescimento e produção de enterocina por *E. faecium* 7C5.

LEROY e DE VUYST (2002) observaram que há uma relação dependente entre o pH, densidade celular e a liberação de bacteriocina. Verificaram também que a temperatura influencia a cinética de crescimento celular, o metabolismo do açúcar e a produção de enterocina por *E. faecium* RZS C5.

OGRODOWSKI (2001) estudou a influência da temperatura de incubação, composição do meio de cultura e pH inicial da fermentação na produção de enterocina pelo *E. faecium* CCT 5079. Os melhores resultados foram obtidos com o Meio Basal composto de (g.L⁻¹): glicose e/ou sacarose 20,0; triptona 10,0; extrato de levedura 7,5; KH₂PO₄ 2,0; MgSO₄.7H₂O 0,25; MnSO₄.4H₂O 0,05 e Tween 80 2,0, temperatura de incubação de 37°C e pH_{inicial} 10,0.

3.4. ATIVIDADE E MODO DE AÇÃO DAS ENTEROCINAS

A maioria das bacteriocinas tem demonstrado efeito bactericida, com algumas exceções, leuconocina S e leucocina A-UAL187 que são bacteriostáticas (HOLZAPFEL et al., 1995).

LÓPEZ-LARA et al. (1991) citaram que a diminuição no número de células viáveis é proporcional à quantidade de enterocina adicionada e o tempo de incubação durante as primeiras horas. PARENTE e HILL (1992c) observaram que o efeito bactericida da enterocina 1146 é extremamente rápido, quando adicionado a culturas de *L. innocua*, após 30min cerca de 90 a 98% das células viáveis foram inibidas. Todas cepas de *Listeria* testadas, incluindo a *L. monocytogenes* Scott A patogênica para humanos, foram altamente sensíveis a enterocina 1146 (PARENTE e HILL, 1992b).

Segundo VILLANI et al. (1993), LYON et al. (1995) e MAISNIER-PATIN et al. (1996) nos últimos anos tem-se noticiado vários casos de doenças após ingestão de alimentos contaminados por microrganismos, dentre eles a *Listeria monocytogenes*, que pode causar listeriose infectando mulheres grávidas, recém nascidos e pessoas imunodeprimidas. A refrigeração e outros métodos de conservação não têm prevenido a sobrevivência e crescimento da *L. monocytogenes* em alimentos contaminados.

Cepas de *Lactobacillus sake*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri* foram inibidas pela enterocina 900, produzida por *E. faecium* BFE 900 isolado de azeitonas pretas (FRANZ et al., 1996).

RODRÍGUEZ et al.(2000) isolaram bactérias lácticas produtoras de bacteriocina de 298 amostras de leite de ovelha, cabra e vaca. Das 87 bactérias identificadas, 67 pertenciam ao gênero lactococos (65 *L. lactis* subsp. *lactis* e 2 *L. lactis* subsp. *cremoris*) , 8 enterococos (7 *E. faecalis* e 1 *E. faecium*), 5 lactobacilos (4 *L. paracasei* subsp. *paracasei* e 1 *L. plantarum*) e 2 *Leuconostoc* spp. Através da técnica de PCR foram identificadas as bactérias isoladas, sendo as bactérias lácticas produtoras de nisina as mais abundantes, seguidas das produtoras de lacticina 481 e enterocina AS-48 as quais também foram encontradas em grandes quantidades. A enterocina AS-48 apresentou largo espectro de

inibição, incluindo *Listeria* spp., *Clostridium tyrobutyricum*, *Lactobacillus buchneri* e *Staphylococcus aureus*.

O efeito da concentração da enterocina 226NWC na viabilidade das células *L. monocytogenes* foi avaliado nas concentrações de 640 e 1280AU.mL⁻¹. Na primeira concentração a população foi reduzida em 93,7% (2,9x10⁹ UFC.mL⁻¹ para 1,8x10⁸ UFC.mL⁻¹), enquanto que a adição de 1280AU.mL⁻¹ de enterocina resultou na redução de 99,3% das colônias (3,29x10⁹ UFC.mL⁻¹ para 2,2x10⁷ UFC.mL⁻¹) (VILLANI et al., 1993).

Da mesma forma GIRAFFA et al. (1995b) utilizando *E. faecium* 7C5 como microrganismo produtor, comprovaram o poder de inibição da enterocina frente a *L. monocytogenes* e *L. innocua*. Observaram também que a combinação dos efeitos da diminuição do pH e ação da enterocina possuem efeito sinérgico.

Como a nisina pode ser consumida oralmente, o seu efeito na microflora oral foi observado. Após 1min da ingestão de chocolate contendo nisina, somente 1/40 da concentração de atividade original foi detectada na saliva. Entretanto, o mesmo estudo foi realizado quando leite com chocolate contendo penicilina foi ingerido e, desta vez na saliva foi encontrada atividade antibacteriana por um longo período de tempo. Um estudo feito nas enzimas gástricas concluiu que a tripsina inativa a nisina, fazendo com que a microflora benéfica não seja afetada, bem como a microflora do intestino (CLEVELAND et al., 2001).

Bacteriocina produzida por bactéria láctica foi isolada por OLASUPO et al. (1994) de alimento fermentado de leite desnatado de vaca, típico da Nigéria chamado “wara”. Esta cepa foi identificada como *E. faecium* NA01 e após o seu desenvolvimento em caldo MRS foi avaliado o seu espectro de inibição. O *E. faecium* apresentou atividade inibidora perante *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus viridescens* e *Enterococcus faecalis*.

McKAY (1990) comprovou a atividade antimicrobiana da bacteriocina produzida pelo *E. faecium* diante da *Listeria* spp. Quando o *E. faecium* e a *L. innocua* cresceram em culturas separadas a contagem de cada microrganismo chegou a 10⁹ UFC.mL⁻¹, porém no cultivo simultâneo a *L. innocua* foi fortemente inibida, resultado que demonstra que a inibição pode ocorrer juntamente com o crescimento exponencial do *E. faecium*, como mostra a Figura 3.1.

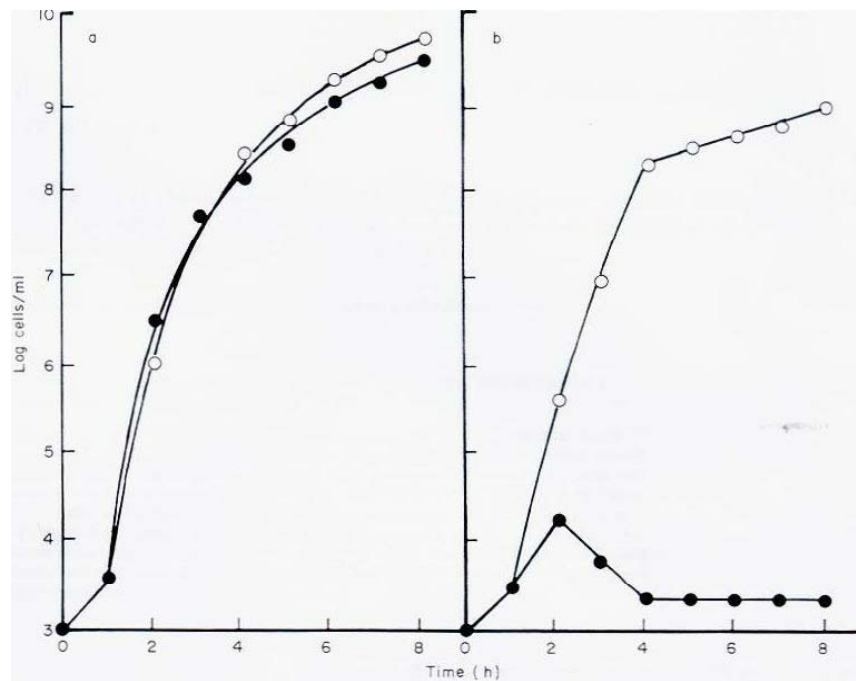


Figura 3.1 - Crescimento em caldo BHI de (a) culturas puras e (b) cultura mista de *Enterococcus faecium* NCIB 2702 (o) e *Listeria innocua* SL (●). (Fonte: Mc KAY, 1990)

LYON et al. (1995) testaram a atividade da enterocina EL1 frente a bactérias gram-positivas, sendo que das bactérias testadas 7 cepas de *Listeria* spp. e 5 de *Enterococcus* spp. foram sensíveis à substância antimicrobiana. Das bactérias gram-negativas, *Aeromonas hydrofila*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, 3 cepas de *Escherichia coli*, 2 espécies de *Pseudomonas* e 5 espécies de *Salmonella* nenhuma foi inibida.

HERRANZ et al. (2001) concluíram que todas as bactérias gram-positivas deteriorantes testadas (5 cepas de *Listeria monocytogenes*, uma de *Clostridium perfringens*, uma de *Clostridium botulinum* e 3 *Staphylococcus aureus*) foram sensíveis a enterocina, com zona de inibição entre 15,2 e 18,4mm. Enquanto que todas as bactérias gram-negativas testadas (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter aerogenes* e *Aeromonas hydrophila*) não foram inibidas pelas duas enterocinas produzidas pelo *E. faecium* P21 nas condições experimentais utilizadas. Tal fato ocorre devido aos diferentes mecanismos de ação nas células sensíveis.

A enterocina N15 isolada de *E. faecium* N15 inibiu o crescimento da *L. monocytogenes*, porém não inibiu as bactérias gram-negativas testadas (LOSTEINKIT et al., 2001). O mesmo foi observado por MAISNIER-PATIN et al. (1996) utilizando a enterocina EFS2 e por ENNAHAR et al. (1998) com enterocina 81, isoladas de *E. faecalis* EFS2 e *E. faecium* WHE 81, respectivamente.

RODRÍGUEZ et al. (2000) observaram que as enterocinas produzidas por *E. faecalis* TAB 20 e TAB 52 e *E. faecium* TAB 7 inibiram microrganismos patogênicos e deteriorantes presentes em produtos lácteos, tais como, cepas de *Clostridium tyrobutyricum*, *Listeria* spp. e *Lactobacillus buchneri*.

A Figura 3.2 mostra a diminuição do número de células viáveis da *Listeria innocua* quando adicionada ao meio contendo enterocina EFS2 ($6,4\text{AU.mL}^{-1}$) e nisina ($25,6\text{AU.mL}^{-1}$). A atividade foi definida como a diluição que fornece uma zona de inibição expressa em unidades por mL (AU.mL^{-1}) (MAISNIER-PATIN et al., 1996).

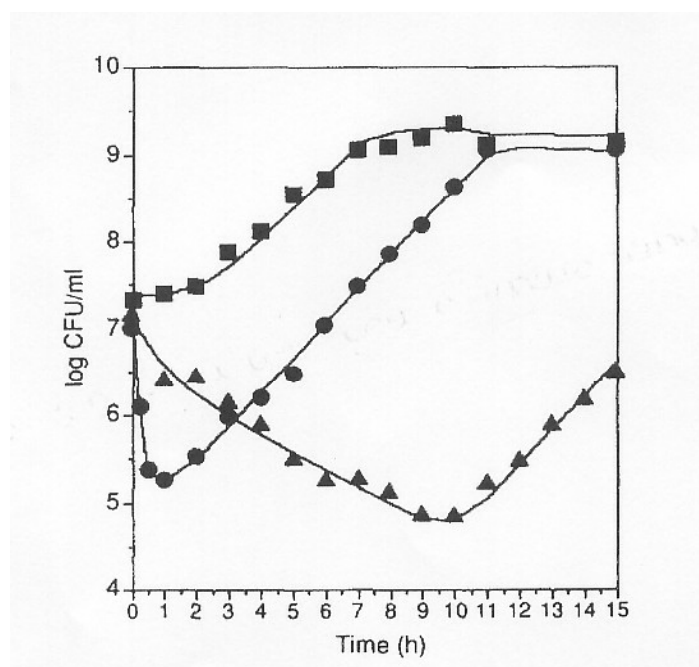


Figura 3.2 - Contagem de *Listeria innocua* LIN11 em meio TSBYE (pH 7,0) a 30°C, após adição de enterocina EFS2 (▲), nisina (●) e amostra controle sem bacteriocinas (■). (Fonte: MAISNIER-PATIN et al., 1996).

CALLEWAERT et al. (2000) observaram que a contagem total de *Listeria* em salsichas fermentadas diminuiu $2,42 \log \text{UFC.g}^{-1}$ e $1,87 \log \text{UFC.g}^{-1}$ para o *E. faecium* RZS C13 e o *E. faecium* CCM 4231, respectivamente.

FRANCO e LANDGRAF (1996) citaram que o modo de ação ainda não está suficientemente elucidado, mas sabe-se que a porção protéica é fundamental para a atividade da bacteriocina. Acredita-se que a ação depende da ligação a receptores da superfície celular bacteriana, com permeabilização da membrana citoplasmática e formação de canais iônicos que causam o fluxo rápido de componentes celulares de baixo peso molecular. Há dissipação do gradiente eletroquímico na membrana citoplasmática, resultando em uma situação incompatível com a viabilidade celular. Evidências indicam que ocorrem alguns efeitos secundários tais como degradação de macromoléculas vitais como proteínas, DNA e RNA, inibição de síntese de proteína, de DNA, de RNA e de peptoglicano, responsáveis pela integridade celular. Interferências com a formação e degradação de ATP também foram relatadas.

AUDISIO et al. (2001) citaram que a inibição observada em algumas cepas patogênicas pode ser devido à ação combinada do ácido lático e da bacteriocina produzida pelo crescimento do *E. faecium* na presença de glicose como fonte de carbono. SABIA et al. (2002) citaram que não houve diminuição na densidade ótica da suspensão de células nos experimentos, indicando que a atividade da enterocina 416K1 contra a *L. monocytogenes* é bactericida sem que ocorra a lise celular.

MINAHK et al. (2000) avaliaram o efeito da enterocina CRL 35 na membrana celular da *L. monocytogenes* e concluíram que a atividade da enterocina é bactericida e não bacteriostática, causando diminuição próxima de 100% de UFC.mL^{-1} dentro de 30min. Com altas concentrações de enterocina a membrana e parede celular foram quebradas e o conteúdo celular foi difundido no meio externo. Por outro lado, quando foram utilizadas pequenas quantidades de enterocina a estrutura celular não foi modificada, porém a concentração de íons K^+ e de íons fosfato aumentaram, o que indicou que houve liberação dos mesmos causando a morte da bactéria. Devido a estas características a enterocina CRL 35 possui potencial para ser usada como agente antimicrobiano em alimentos.

3.5. PURIFICAÇÃO DAS ENTEROCINAS

O isolamento e a purificação das bacteriocinas permite que sejam adicionadas a uma grande variedade de alimentos, mas muitas delas são difíceis de serem purificadas e são instáveis na forma pura. Em consequência, pouco se conhece sobre muitas bacteriocinas, exceto a nisina (BARNBY-SMITH, 1992).

Meios complexos normalmente são usados para o crescimento das bactérias lácticas e tem sido relatado que os componentes do meio interferem na purificação posterior da enterocina (PARENTE e HILL, 1992a). Para obter a enterocina 1146 parcialmente purificada, estes mesmos autores utilizaram precipitação do meio sem células com sulfato de amônia, seguida de diálise contra tampão fosfato de potássio (pH 5,5; 50mM) e esterilização por filtração com posterior estocagem a -20°C .

CAROLISSEN-MACKAY et al. (1997) citaram que o Tween 80 é um poderoso surfactante que auxilia na produção de bacteriocinas, mas interfere nas etapas de purificação. A precipitação com sulfato de amônio é citada como sendo o método mais favorável para a separação de bacteriocinas.

HERRANZ et al. (2001) para promoverem a caracterização da bacteriocina isolada de *E. faecium* P21 fizeram precipitação com sulfato de amônia, filtração com gel, troca catiônica, interação hidrofóbica e cromatografia de fase reversa. Após a última passagem na coluna de fase reversa foram obtidas duas frações contendo bacteriocinas. A recuperação da atividade de enterocina foi de 1,25% para a fração A e 1,81% para a fração B, em relação a atividade de enterocina inicial presente no sobrenadante contendo células livres.

As técnicas de YANG et al. (1992) utilizadas por PARENTE e RICCIARDI (1994), mostraram que a E1146 é adsorvida nas células vivas ou mortas em pH maior que 4,5. Após a adsorção, quantidades significativas de bacteriocinas (60-80%) podem ser liberadas das células mortas, através de aquecimento, usando NaCl (0,1M) a pH 2,0, enquanto que somente 2-5% da atividade adsorvida poderia ser liberada das células vivas.

YANG et al. (1992) citaram que a pH 6,0 ocorre alta adsorção das bacteriocinas nas células e a pH 2,0 há a máxima liberação destas, presente nas células, para o meio.

LYON et al. (1995) e YANG et al. (1992) citaram que o sulfato de amônia pode precipitar proteínas contaminantes diminuindo o rendimento após a purificação, pois a porção adsorvida nas células é perdida. Devido a este fato, após o crescimento celular, LYON et al. (1995) acertaram o pH da cultura em 6,5 com adição de NaOH (6,0M) e para efetuar a separação das células foi feita centrifugação (30min, 4°C). As células foram lavadas com tampão acetato de sódio (pH 6,5) e a bacteriocina foi extraída das mesmas com tampão fosfato de sódio (pH 2,0; 50mM) contendo 1,0M NaCl. Após, o extrato foi dessalinizado, concentrado e congelado, tendo sido obtida uma enterocina parcialmente purificada.

MAISNIER-PATIN et al. (1996) estudaram a purificação da enterocina EFS2, produzida por *E. faecalis* EFS2. A maior atividade (6400AU.mL^{-1}) foi observada após 5h de incubação a 37°C em meio BAPT. A *Listeria innocua* foi usada como microrganismo teste, tanto para a enterocina EFS2 como para a nisina produzida por *Lactococcus lactis*. A purificação da enterocina foi conseguida através de precipitação com sulfato de amônia e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A enterocina purificada foi colocada em uma cultura de *L. innocua*, sendo observada atividade bactericida que induziu a liberação dos componentes intracelulares causando a lise celular.

DU TOIT et al. (2000) após centrifugação e acerto do pH para 6,5, também utilizaram o sulfato de amônia (80% saturação) para precipitar a enterocina. A suspensão foi centrifugada (30min, 4°C) e o precipitado ressuspensionado em água destilada e dialisado contra água destilada para obter a enterocina parcialmente purificada.

MINAHK et al. (2000) adicionaram o sulfato de amônia até uma concentração final de 60% (p/v) com o objetivo de precipitar a enterocina CRL35 presente no meio de fermentação devido ao desenvolvimento do *Enterococcus faecium* CRL35.

LOSTEINKIT et al. (2001) também utilizaram a precipitação com sulfato de amônio (50% saturação) após o aquecimento a 100°C por 10min e filtração em membrana (0,45µm). A enterocina precipitada foi separada através de centrifugação, ressuspensa e dialisada com tampão fosfato de sódio pH 7,0 para obter a enterocina parcialmente purificada.

LYON et al. (1995) relataram que a adsorção da enterocina EL1 nas células do microrganismo produtor é altamente influenciada pelo pH da solução tampão. A Tabela 3.2 mostra as quantidades de enterocina encontradas no sobrenadante e ligadas às células devido às variações de pH. Observa-se que no pH 2,0 conseguiu-se a maior quantidade de enterocina no sobrenadante, aumentando assim o rendimento durante a extração.

Tabela 3.2 - Atividade da enterocina EL1 encontrada no sobrenadante e nas células devido à variação de pH da solução tampão utilizada para a extração

pH	Células (AU.mL ⁻¹)	Sobrenadante (AU.mL ⁻¹)
5 a 7	10 ⁵	10 ⁵
4 e 8	10 ⁴	10 ⁶
3 e 9	10 ³	10 ⁷
2	0	10 ⁹

Fonte: LYON et al. (1995)

ENNAHAR et al. (2001) estudaram a purificação da enterocina produzida a partir do *E. faecium* WHE 81 isolado de queijo. Foi observado que a enterocina precipitada com sulfato de amônio com 70% de saturação não perdeu a atividade antibacteriana após ter sido recuperada. De qualquer modo, somente 50% da atividade antibacteriana pôde ser medida depois de suspender o precipitado em água, isto ocorre devido aos compostos com atividade inibidora estarem concentrados no precipitado ou pelo fato da bacteriocina apresentar baixa solubilidade.

3.6. ESTABILIDADE DAS ENTEROCINAS

RODRÍGUEZ et al. (2000) avaliaram a sensibilidade das enterocinas isoladas diante de variações de temperatura, pH e enzimas. Todas as enterocinas isoladas foram inibidas pela α -quimiotripsina, proteinase K e tripsina, com exceção de uma enterocina produzida por uma cepa de *E. faecalis* que não foi inibida pela tripsina. Todas as enterocinas produzidas a partir de cepas de enterococos foram inativadas pelo aquecimento

a 100°C por 20min. Para os pH testados (2,6,7 e 9) todas as enterocinas não foram inativadas, com exceção da enterocina isolada do *E. faecium* TAB 7 que foi inativada em pH 2,0.

A atividade da enterocina 01 isolada de *E. faecium* NA01 foi completamente eliminada pela α -quimiotripsina e proteinase K, mas não pela tripsina e pepsina. Esta enterocina apresentou estabilidade a 100°C por 5min e no pH entre 2,0 - 6,0, por outro lado, o aquecimento a 100°C por longos períodos resulta em inativação (OLASUPSO et al., 1994).

A enterocina parcialmente purificada 226NWC não foi inibida após tratamento térmico a 70°, 80° e 90°C por 30min, porém foi parcialmente inibida a 100°C por 30min e totalmente inibida a 121°C por 15min (VILLANI et al., 1993).

SABIA et al. (2002) avaliaram o efeito da temperatura, aquecimento, enzimas, pH e tempo de estocagem na enterocina 416 K1 produzida por *E. casseliflavus* IM 416K1. Foi observado que a enterocina foi inibida por proteinase K e pepsina, porém aquecimento a 90°C/2h não afetou a atividade. Da mesma maneira, na faixa de pH entre 3,0 e 9,0 e durante estocagem a 4°C por 6 meses a enterocina permaneceu com atividade.

HERRANZ et al. (2001) demonstraram que a atividade da enterocina produzida pelo *E. faecium* P21 permaneceu igual mesmo após o aquecimento a 80 e 100°C por 20min.

As enterocinas produzidas por microrganismos isolados de fezes de porco apresentaram sensibilidade à α -quimiotripsina, proteinase K, pronase, tripsina, papaína e pepsina, mas a atividade não foi afetada pela lipase, lisozima e catalase. Baixos níveis de enterocina foram mantidos após o aquecimento do sobrenadante a 121°C por 15min (DU TOIT et al., 2000).

VLAEMYNCK et al. (1994) avaliaram a resistência ao aquecimento de duas enterocinas produzidas por *E. faecium* em diferentes valores de pH. Durante o tratamento térmico a estabilidade da enterocina ao calor foi afetada pelo pH. Observou-se que em pH neutro ou ácido não houve alteração na atividade ou foi parcial, porém em pH 8,5 as bacteriocinas apresentaram-se menos estáveis e após esterilização nenhuma atividade foi observada. Independente do pH (4,5, 6,5 e 8,5) e da temperatura de estocagem (-20°, 6° e

20°C) durante 14 dias as bacteriocinas parcialmente purificadas permaneceram estáveis. Após a concentração do sobrenadante obtido e liofilização nenhuma atividade foi observada.

MAISNIER-PATIN et al. (1996) verificaram o efeito da temperatura e pH na estabilidade da enterocina EFS2 produzida por *E. faecalis* ESF2. Para determinar a influência do pH, o microrganismo teste *Listeria innocua*, foi inoculado em meios TSBYE com pH ajustado para 4,5; 6,0; 7,0 e 8,0 com HCl ou NaOH 1N. A atividade da enterocina foi pouco afetada pelo pH após 6h de incubação, porém a atividade foi menor no pH 4,5 do que em pH mais elevados. Culturas em meio TSBYE (pH 7,0) foram incubadas a 15, 30 e 35°C e foi observado que a 35°C a inibição do microrganismo teste foi mais rápida (6h) do que a 30°C (9-10h), porém a 15°C a bacteriocina perdeu sua atividade, pois após 18h de incubação não promoveu destruição celular.

LYON et al. (1995) observaram que o pH entre 2-7 não afeta a estabilidade da enterocina EL1, porém pH 8-10 diminui a atividade da mesma. O aquecimento a 121°C por 30min fez com que a enterocina perdesse sua atividade, bem como, a tripsina, α -quimiotripsina, proteinase e pronase. A catalase não afetou sua atividade, indicando que o peróxido de hidrogênio não é o fator de inativação da bacteriocina. Os autores afirmaram também, que a atividade inibidora não deve estar relacionada a substâncias de baixo peso molecular como ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio.

A atividade da enterocina N15 apresentou estabilidade frente a uma ampla faixa de pH 2,0 a 10,0. Porém a atividade foi perdida após o tratamento com enzimas proteolíticas (proteinase K, α -quimiotripsina, pepsina, tripsina e lisozima) e α -amilase, sendo resistente à lipase. No que diz respeito à resistência térmica a enterocina foi resistente ao tratamento a 100°C por 2h, mas foi completamente inativada em condições de esterilização (121°C por 15min) (LOSTEINKIT et al., 2001).

A enterocina Bc-48 produzida por *E. faecalis* subsp. *liquefaciens* apresentou alta sensibilidade ao aquecimento e foi parcialmente inativada durante incubação a 45°C e 50°C por 60min. Entretanto, pode ser mantida a 4°C por 1 semana e a -20°C por 3 meses sem haver nenhuma perda na atividade apresentando também estabilidade no pH entre 5,5 e 9,0 (LÓPEZ-LARA et al., 1991).

OGRODOWSKI (2001) demonstrou que a enterocina produzida por *E. faecium* é estável ao congelamento, sem perda da atividade em até 62 dias. Da mesma forma, a enterocina foi submetida a diferentes temperaturas para a avaliação de sua resistência térmica. Foi observado que temperaturas entre 40 e 60°C induziram o aumento da atividade de enterocina; já na temperatura de 70°C a atividade teve um pequeno aumento até 60min, praticamente desprezível, caindo após este tempo e para as temperaturas de 80 a 90°C a atividade teve queda acentuada.

OLASUPO et al. (1994) avaliaram o efeito do pH, de enzimas, da temperatura e tempo de aquecimento na enterocina 01 produzidas por *E. faecium*. Observaram que as enzimas α -quimiotripsina e proteinase K e aquecimentos a 100°C, por longos períodos, inibiram completamente a atividade da enterocina. Porém, a atividade foi estável a aquecimentos a 100°C por 5min em pH entre 2,0 e 6,0.

Após o tratamento com α -quimiotripsina, tripsina, pepsina e proteinase K a atividade da enterocina 900 (6400 AU.mL⁻¹) foi totalmente eliminada. O aquecimento por 3, 10 ou 20min a 100°C não afetaram a atividade de enterocina, porém quando mantida por 15min a 121°C houve um declínio da atividade para 800AU.mL⁻¹ (FRANZ et al., 1996).

3.7. APLICAÇÃO E USO

Bacteriocinas e bactérias produtoras de bacteriocinas têm sido empregadas como recurso tecnológico na produção de certos tipos de alimentos, com o objetivo de controlar o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e/ou microrganismos deteriorantes nesses produtos. Por serem as bacteriocinas consideradas conservantes “naturais”, seu emprego em alimentos é muito promissor (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

A aplicação das bacteriocinas pode ser de duas maneiras: uso das bactérias lácticas produtoras ou adição da bacteriocina diretamente ao alimento (BARNBY-SMITH, 1992; PARENTE e RICCIARDI, 1994; CLEVELAND et al., 2001; HUGAS et al., 2003).

A composição química e física do alimento pode ter uma influência significativa na atividade da bacteriocina (CLEVELAND et al., 2001). A ação das bacteriocinas nos microrganismos sensíveis é influenciada por um grande número de fatores, tais como, pH,

concentração celular, conteúdo lipídico, enzimas proteolíticas e sistema líquido e sólido (ABEE et al., 1995).

Devido à pequena massa molecular, PIARD e DESMAZEAUD (1992) citado por GIRAFFA (1995a), relataram que as enterocinas podem ser aplicadas em alimentos semi-sólidos, pois ocorre difusão rápida e que a maioria dos alimentos possui esta característica.

Algumas cepas de enterococos são capazes de produzir bacteriocinas que são ativas contra bactérias patogênicas. As bacteriocinas produzidas por enterococos adicionadas aos alimentos como cultura iniciadora, mostra-se como uma boa opção para melhorar a qualidade e sanidade de vários alimentos fermentados sem influenciar o crescimento da cultura iniciadora (LYON et al., 1995; MAISNIER-PATIN et al., 1996; CALLEWART et al., 2000; SARANTINOPOULOS et al., 2002).

A enterocina 1146 é uma bacteriocina produzida por *E. faecium* DPC 1146 que apresenta alta especificidade contra *L. monocytogenes* e pode ser utilizada para o controle de microrganismos em alimentos fermentados, nos quais outras bacteriocinas poderiam inibir os microrganismos iniciadores (PARENTE e HILL, 1992b; PARENTE e HILL, 1992c; PARENTE e RICCIARDI, 1994).

ENNAHAR et al. (2001) citaram que as enterocinas produzidas por *E. faecium* CTC492 e *E. faecium* WHE 81, isoladas de salsicha e queijo, respectivamente, oferecem um modo natural de aplicação simultânea em várias carnes fermentadas e produtos lácteos para promover a preservação destes.

As bactérias lácticas são comumente usadas como culturas starter em alimentos fermentados e os pesquisadores têm investigado estas bactérias que também produzem bacteriocinas para serem utilizadas como cultura starter (PARENTE e RICCIARDI, 1994; GIRAFFA, 1995a; CLEVELAND et al., 2001). NUÑEZ et al. (1997) observaram que a contagem da *Listeria monocytogenes* em queijo Manchego inoculado com *E. faecalis*, diminuiu em 6 logs em 7 dias, considerando que a cultura starter utilizada não foi afetada.

PARENTE e HILL (1992b) citaram que cepas de enterococos têm sido isoladas de queijos artesanais e suas culturas e seu uso como cultura starter tem sido proposto em queijo Cheddar e Fontina.

E. faecium FAIR-E 198 juntamente com as culturas starter foi adicionado no leite durante a fabricação de queijo Feta, mas nenhuma atividade de enterocina foi observada, o que pode ser atribuído ao fato de não ter sido produzida ou não ter sido detectada devido à absorção no queijo (SARANTINOPOULOS et al., 2002). Este mesmo autor citou que FARIAS et al. (1999) adicionou enterocina CRL 35 e *Listeria monocytogenes* durante a fabricação de queijo com leite de cabra e embora a presença da enterocina não tenha sido detectada, o crescimento da bactéria patogênica foi drasticamente inibido.

LAUKOVÁ et al. (1999a) estudaram a adição de enterocina CCM 4231 (produzida por *E. faecium* CCM 4231) em salame fermentado seco, para o controle do crescimento de *L. monocytogenes*. Inicialmente foram adicionadas às amostras de salame 10^4 UFC.g⁻¹ (unidades formadoras de colônia por grama) de *L. monocytogenes* e durante três semanas foi quantificado o número de colônias presentes. Após uma semana, 10^7 UFC.g⁻¹ foram encontradas nos experimentos sem adição de enterocina e 10^4 UFC.g⁻¹ quando a enterocina estava presente, porém não foi observada atividade de bacteriocina. Este fato pode ser explicado através da baixa difusão da bacteriocina no salame, perda de atividade ao longo do tempo ou devido às dificuldades associadas ao método de detecção da atividade de bacteriocina em produtos cárneos. Para obter completa eliminação das culturas contaminantes, quantidades maiores de bacteriocina purificada deveriam ser adicionadas.

LAUKOVÁ et al. (1999b) verificaram o efeito inibidor da enterocina purificada CCM 4231 (concentração 3200AU.mL⁻¹) no crescimento do *Staphylococcus aureus* SA1 em leite desnatado e iogurte, e da *Listeria monocytogenes* em iogurte. Houve uma diminuição das células viáveis de *S. aureus* SA1 no leite de 10^{10} UFC.mL⁻¹ nas amostras controle (sem enterocina) para 10^2 UFC.mL⁻¹ após 24h da adição da enterocina. No iogurte, após 3,5h da adição da enterocina foi observada uma contagem de 10^3 UFC.mL⁻¹, enquanto que nas amostras sem enterocina a contagem foi de 10^6 UFC.mL⁻¹. Nas amostras com *L. monocytogenes* houve uma diminuição de 3,77 log UFC.mL⁻¹ nas amostras com enterocina em relação às amostras sem enterocina. Apesar do efeito inibidor ter sido observado não houve detecção analítica da atividade de enterocina nas amostras.

MORENO et al. (2003) utilizaram o *E. faecium* RZS C5 juntamente com as culturas starter para a fabricação de queijo Cheddar. As amostras de queijo foram passadas em placas contendo o microrganismo indicador e foram observadas zonas de inibição, o que demonstrou a presença de atividade de enterocina nos queijos.

A enterocina 416 K1 é termoestável, estável em uma ampla faixa de pH e a baixas temperaturas por longo período, podendo ser utilizada em alimentos pasteurizados, ácidos ou não e empregada em alimentos refrigerados (SABIA et al., 2002).

CALLEWAERT et al. (2000) utilizaram o *E. faecium* RZS C13 e *E. faecium* CCM 4231 como aditivos juntamente com as culturas iniciadoras na fabricação de salsichas e observaram a inibição do crescimento da *Listeria*, além de torná-las com sabor mais suave e menos ácidas do que as salsichas fermentadas tradicionais. Tais propriedades são altamente apreciáveis pelos consumidores.

HUGAS et al. (2003) citaram que algumas cepas de *E. faecium* K77D foram aprovadas para serem utilizadas como culturas starter em produtos lácteos pela “UK Advisory Committee on Novel Foods and Processes” e também são usadas amplamente como culturas starter ou como probióticos pela “International Dairy Federation”. No futuro pode ocorrer um aumento no interesse das bactérias lácticas e suas bacteriocinas, utilizadas como biopreservativos, como resultado da mudança na consciência dos consumidores, no que diz respeito aos riscos derivados não somente do consumo de alimentos contaminados, mas também dos conservantes químicos normalmente usados para o controle de contaminações.

AYMERICH et al. (2002) aplicaram o *E. faecium* CTC 492 como bioprotetor em presunto suíno cozido (depois da fatiagem e antes da embalagem) para inibir a formação de “smile” devido ao *Lactobacillus sakei* CTC746. As enterocinas A e B podem prevenir a formação de “smile” por 21 dias de estocagem a vácuo e na temperatura de 8°C. O nitrito e o cloreto de sódio nas concentrações adicionadas durante a elaboração do presunto não afetam a produção de enterocina.

HUGAS et al. (2003) citaram também que as enterocinas poderiam ser usadas para solucionar os problemas de deterioração e contaminação que ocorrem em produtos cárneos, apesar da implementação de HACCP, mas as normas vigentes impedem a aplicação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMO

Os microrganismos estudados para a produção de enterocina em frascos Erlenmeyers foram o *Enterococcus faecium* CCT 5079 e *Enterococcus faecalis* CCT 0328, ambos obtidos junto a Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello.

4.1.1. Cultura Estoque

Os dois microrganismos produtores de enterocina cresceram em tubos de ensaio contendo 7mL de Meio Basal Modificado por OGRODOWSKI (2001) contendo 20g.L⁻¹ de agar, citado na Tabela 4.1. Antes da esterilização, a 121°C por 15min, o pH foi ajustado para 6,8 com NaOH ou HCl 2N. O crescimento das culturas ocorreu a 37°C por 24h sem agitação.

Tabela 4.1 - Composição do Meio Basal Modificado por OGRODOWSKI (2001)

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

4.1.2. Pré-inóculo

As culturas estoque, descritas no item 4.1.1, foram utilizadas para inocular frascos Erlenmeyers com capacidade para 500mL contendo 200mL de Meio Basal Modificado (Tabela 4.1), que foram incubados a 37°C por 24h e sem agitação. A manutenção do pré-inóculo foi feita com adição de 40% de glicerol e posterior congelamento.

4.1.3. Inóculo

Para cada 400mL de Meio Basal Modificado (Tabela 4.1) utilizou-se quatro tubos com a cultura de *Enterococcus faecium* CCT 5079 descrita no item 4.1.2. O pH inicial foi ajustado para 6,8 antes da esterilização a 121°C por 15min e o crescimento ocorreu a 37°C por 24h e sem agitação. O mesmo procedimento foi realizado para obter o inóculo do *Enterococcus faecalis* CCT 0328.

4.2. MICRORGANISMOS TESTE

4.2.1. Propagação e Manutenção

O *Enterococcus faecalis* CCT 0328 foi utilizado como microrganismo teste, sendo propagado em tubos de ensaio inclinados contendo 7mL de caldo MRS (Man Rogosa Sharp), no qual a concentração de agar foi de 20g.L⁻¹. O pH foi ajustado em 6,5 antes da esterilização (121°C por 15min), os tubos foram incubados a 37°C sem agitação e mantidos refrigerados após 24h de crescimento.

Outro microrganismo utilizado para avaliar a atividade antibacteriana do *E. faecium* e *E. faecalis* foi a bactéria *Listeria monocytogenes* Scott A fornecida pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência de Alimentos (FEA-UNICAMP), sendo propagado em meio BHI (Brain Heart Infusion) na temperatura de 37°C em tubos com agar inclinado.

4.2.2. Cultivo

O cultivo dos microrganismos teste foi feito em frascos Erlenmeyers de 500mL contendo 200mL de meio (esterilizados a 121°C por 15min), sendo utilizado o caldo MRS e caldo BHI, como meio para o *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes* Scott A, respectivamente. Estes frascos foram inoculados com as culturas, obtidas no item 4.2.1 e incubados a 37°C por 24h sem agitação.

4.3. SUBSTRATO

Nas fermentações em frascos Erlenmeyers foram utilizadas três fontes de carbono diferentes, glicose (P.A.), açúcar mascavo comercial e sacarose comercial, tendo como base o Meio Basal Modificado (descrito na Tabela 4.1). A sacarose e o açúcar mascavo foram adicionados na proporção de 2% p/v (concentração final). O pH_{inicial} do meio foi ajustado em 4,0; 6,0; 8,0 ou 10,0 antes da esterilização.

4.4. PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM FRASCOS ERLENMEYERS

4.4.1. Definição Preliminar das Condições de Cultivo para Produção de Enterocina

As fermentações para seleção do microrganismo produtor (*E. faecium* CCT 5079 ou *E. faecalis* CCT 0328), o pH_{inicial} (4, 6, 8, e 10), agitação (0 e 200rpm) e a fonte de carbono (glicose, sacarose comercial e açúcar mascavo comercial) que fornecem a maior produção de enterocina, foram feitas em frascos Erlenmeyers de 250mL.

Cada frasco de 250mL contendo 100mL de meio basal modificado (de acordo com a Tabela 4.2 e 4.3) estéril (121°C por 15min) e 10% (v/v) de concentração inicial de inóculo, preparado de acordo com o item 4.1.3. foi incubado a 37°C por 48h e as amostras retiradas em intervalos de 24h (0, 24 e 48h).

As Tabelas 4.2 e 4.3 apresentam os experimentos preliminares para os microrganismos produtores *E. faecium* e *E. faecalis*, respectivamente.

Tabela 4.2 - Experimentos preliminares feitos para averiguar a produção de enterocina em frascos Erlenmeyers utilizando *Enterococcus faecium*

Ensaio	pH _{inicial}	Agitação (rpm)	Fonte de Carbono
1	4,0	0	Glicose
2	4,0	200	Glicose
3	4,0	0	Sacarose
4	4,0	200	Sacarose
5	4,0	0	Açúcar mascavo
6	4,0	200	Açúcar mascavo
7	6,0	0	Glicose
8	6,0	200	Glicose
9	6,0	0	Sacarose
10	6,0	200	Sacarose
11	6,0	0	Açúcar mascavo
12	6,0	200	Açúcar mascavo
13	8,0	0	Glicose
14	8,0	200	Glicose
15	8,0	0	Sacarose
16	8,0	200	Sacarose
17	8,0	0	Açúcar mascavo
18	8,0	200	Açúcar mascavo
19	10,0	0	Glicose
20	10,0	200	Glicose
21	10,0	0	Sacarose
22	10,0	200	Sacarose
23	10,0	0	Açúcar mascavo
24	10,0	200	Açúcar mascavo

Tabela 4.3 - Experimentos preliminares feitos para averiguar a produção de enterocina em frascos Erlenmeyers utilizando *Enterococcus faecalis*

Ensaio	pH _{inicial}	Agitação (rpm)	Fonte de Carbono
25	4,0	0	Glicose
26	4,0	200	Glicose
27	4,0	0	Sacarose
28	4,0	200	Sacarose
29	4,0	0	Açúcar mascavo
30	4,0	200	Açúcar mascavo
31	6,0	0	Glicose
32	6,0	200	Glicose
33	6,0	0	Sacarose
34	6,0	200	Sacarose
35	6,0	0	Açúcar mascavo
36	6,0	200	Açúcar mascavo
37	8,0	0	Glicose
38	8,0	200	Glicose
39	8,0	0	Sacarose
40	8,0	200	Sacarose
41	8,0	0	Açúcar mascavo
42	8,0	200	Açúcar mascavo
43	10,0	0	Glicose
44	10,0	200	Glicose
45	10,0	0	Sacarose
46	10,0	200	Sacarose
47	10,0	0	Açúcar mascavo
48	10,0	200	Açúcar mascavo

4.4.2. Produção de Enterocina em Frascos Erlenmeyers

Foram selecionados 32 experimentos que apresentaram os melhores resultados de atividade de enterocina, para confirmar os dados obtidos anteriormente.

Nesta segunda etapa as fermentações tiveram tempo total de 24h com amostragem no tempo inicial e final da fermentação. Através dos resultados da etapa anterior observou-se que a atividade de enterocina não possuía aumento significativo após as primeiras 24h de cultivo. Todas outras condições das fermentações tais como, temperatura, volume de meio e concentração de inóculo foram mantidas. Os experimentos feitos para a produção de enterocina utilizando o *E. faecium* podem ser observados na Tabela 4.4 e com o *E. faecalis* na Tabela 4.5.

Tabela 4.4 - Produção de enterocina utilizando o *E. faecium*, em frascos Erlenmeyers

Ensaio	pH _{inicial}	Agitação (rpm)	Fonte de Carbono
1	4,0	0	Glicose
2	4,0	200	Glicose
3	4,0	0	Açúcar mascavo
4	4,0	200	Açúcar mascavo
5	6,0	0	Glicose
6	6,0	200	Glicose
7	6,0	0	Açúcar mascavo
8	6,0	200	Açúcar mascavo
9	8,0	0	Sacarose
10	8,0	200	Sacarose
11	8,0	0	Açúcar mascavo
12	8,0	200	Açúcar mascavo
13	10,0	0	Sacarose
14	10,0	200	Sacarose
15	10,0	0	Açúcar mascavo
16	10,0	200	Açúcar mascavo

Tabela 4.5 - Produção de enterocina utilizando o *E. faecalis*, em frascos Erlenmeyers

Ensaio	pH _{inicial}	Agitação (rpm)	Fonte de Carbono
17	4,0	0	Sacarose
18	4,0	200	Sacarose
19	4,0	0	Açúcar mascavo
20	4,0	200	Açúcar mascavo
21	6,0	0	Sacarose
22	6,0	200	Sacarose
23	6,0	0	Açúcar mascavo
24	6,0	200	Açúcar mascavo
25	8,0	0	Sacarose
26	8,0	200	Sacarose
27	8,0	0	Açúcar mascavo
28	8,0	200	Açúcar mascavo
29	10,0	0	Sacarose
30	10,0	200	Sacarose
31	10,0	0	Açúcar mascavo
32	10,0	200	Açúcar mascavo

4.5. PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM FERMENTADOR DE BANCADA

Após a determinação das condições de pH_{inicial}, agitação e fonte de carbono que fornecem os melhores resultados de atividade de enterocina foram feitas fermentações em fermentador de bancada “New-Brunswick” - Bioflo III de 5L, sendo o volume de meio utilizado de 4L.

Todas as fermentações foram conduzidas a 37°C, sem aeração e com um tempo total de fermentação de 24h com amostragem a cada 1h. No momento da amostragem foi determinado o pH e a amostra foi congelada para posteriores determinações analíticas. A concentração inicial de inóculo foi de 10% (v/v), sendo este preparado de acordo com o item 4.1.3. A Tabela 4.6 mostra os experimentos feitos no fermentador de bancada Bioflo.

Tabela 4.6 - Produção de enterocina utilizando o fermentador de bancada Bioflo III

Ensaio	pH _{inicial}	Agitação (rpm)	Fonte de Carbono*	Microrganismo Produtor
1	10,0	200	Sacarose	<i>E. faecium</i>
2	10,0	200	Açúcar mascavo	<i>E. faecium</i>
3	6,0	200	Sacarose	<i>E. faecalis</i>
4	10,0	25	Sacarose	<i>E. faecium</i>
5	10,0	25	Açúcar mascavo	<i>E. faecium</i>
6	10,0	200	Açúcar mascavo	<i>E. faecalis</i>

* todas as fontes de carbono utilizadas foram de origem comercial

4.6. METODOLOGIA ANALÍTICA

4.6.1. Determinação de Massa Celular Seca (MCS)

As amostras retiradas durante as fermentações foram centrifugadas a 3000rpm por 20min; em seguida, o sobrenadante foi separado e a biomassa lavada duas vezes com água destilada. As amostras foram secas em estufa a vácuo a 65°C até peso constante e a quantidade de massa celular foi determinada por diferença de peso. O sobrenadante separado foi utilizado posteriormente para as demais análises.

4.6.2. Determinação de pH

A determinação de pH de cada amostra foi feita através de potenciômetro (DIGIMED, modelo DM 20).

4.6.3. Determinação da Concentração de Açúcar (Consumo de Substrato)

Para verificar a quantidade de açúcar que foi consumida durante a fermentação, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado para a determinação de açúcares

redutores totais (ART) através do método de SOMOGIY-NELSON (1952). A concentração de açúcar foi calculada através de curva padrão para cada substrato.

4.6.4. Determinação da Atividade de Enterocina (UE)

Para a determinação da atividade de enterocina foi usada uma modificação do procedimento descrito por BERRIDGE E BARRET (1952). Foram utilizados tubos de ensaio contendo 5mL de caldo MRS, 2mL do sobrenadante (obtido no item 4.6.1), com o pH ajustado para 6,5 e 1mL de meio fermentado do microrganismo teste. Os tubos foram incubados a 37°C, juntamente com um tubo padrão contendo 7mL de caldo MRS e 1mL de meio fermentado do microrganismo teste e após 6h a absorbância foi lida a 600nm em espectrofotômetro HACH DR/4000, usando como branco um tubo contendo 8mL de caldo MRS. Para a determinação da atividade, os valores lidos nos tubos contendo a enterocina foram comparados com o padrão.

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

4.6.5. Determinação da Atividade de Enterocina (UE) com *Listeria monocytogenes* Scott A como Microrganismo Teste

Para verificar a eficácia da enterocina produzida foram feitos testes utilizando os sobrenadantes das culturas de *E. faecium* e de *E. faecalis* e a *L. monocytogenes* Scott A como microrganismo teste. O pH foi acertado para 6,5 e foram avaliados dois tipos de sobrenadantes, pasteurizado e não pasteurizado, sendo que as condições de pasteurização foram 4min a 80°C.

O sobrenadante de *E. faecium* foi obtido do ensaio 5 feito em fermentador de bancada e após 24h de incubação. Este ensaio foi conduzido sem agitação, pH_{inicial} 10,0 e com açúcar mascavo como fonte de carbono. O ensaio 6 feito em fermentador de bancada e

com agitação de 200rpm, pH_{inicial} 10,0 e açúcar mascavo como fonte de carbono, foi utilizado para obter após 24h de fermentação, o sobrenadante de *E. faecalis*.

Para avaliar se as quantidades de enterocina adicionadas durante a determinação foram suficientes para inibir a *Listeria* fez-se três tipos de determinação de atividade, de acordo com a Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Testes feitos para a determinação de atividade de enterocina utilizando *Listeria monocytogenes* Scott A como microrganismo teste

Teste	Tubo padrão*	Tubo*
I		5mL caldo BHI
	7mL caldo BHI	+
	+	1mL SN <i>L. monocytogenes</i>
	1mL SN <i>L. monocytogenes</i>	+
		2mL enterocina
II		5mL caldo BHI
	8mL caldo BHI	+
	+	1mL SN <i>L. monocytogenes</i>
	1mL SN <i>L. monocytogenes</i>	+
		3mL enterocina
III		5mL caldo BHI
	9mL caldo BHI	+
	+	1mL SN <i>L. monocytogenes</i>
	1mL SN <i>L. monocytogenes</i>	+
		4mL enterocina

* SN = sobrenadante

Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C por 6h, sendo feita a cada 1h a leitura de absorbância a 600nm em espectrofotômetro HACH DR/4000, usando como branco um tubo contendo 8mL de caldo BHI para zerar o espectrofotômetro.

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

4.6.6. Purificação Parcial da Enterocina

O método de purificação parcial foi feito em dois sobrenadantes, ambos obtidos após 24h de incubação dos ensaios 3 e 4 feitos no fermentador de bancada Bioflo III. O ensaio 3 foi conduzido com *E. faecalis* como microrganismo produtor, pH_{inicial} 6,0, agitação de 200rpm e com sacarose como fonte de carbono. O ensaio 4 também utilizou sacarose, mas o microrganismo produtor foi o *E. faecium*, pH_{inicial} 10,0 e sem agitação.

Para efetuar a purificação da enterocina produzida, após o término da fermentação o pH das amostras foi ajustado para 6,5 com NaOH 6,0M. As amostras foram colocadas em banho termostatizado até que atingissem 4°C. Posteriormente, separou-se a biomassa do sobrenadante (1) através de centrifugação (3500rpm, 30min).

A biomassa separada foi lavada com tampão fosfato de sódio pH 6,5 e centrifugada (3500rpm, 20min). O sobrenadante (2) foi separado e a biomassa lavada com tampão fosfato de sódio pH 2,0, contendo 1,0M de cloreto de sódio (NaCl). Novamente as amostras foram colocadas em banho termostatizado até chegar a 4°C. Após centrifugação (3500rpm, 30min), a biomassa foi descartada e o sobrenadante reservado (3) (LYON et al., 1995).

Foram feitas determinações de atividade de enterocina nos sobrenadantes (1), (2) e (3). Os sobrenadantes (1), (2) e (3) foram misturados seguindo-se precipitação com sulfato de amônia ((NH₄)₂SO₄) 60% (p/v). A mistura foi colocada na geladeira por 1h depois de centrifugada (3500rpm, 20min). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em tampão fosfato de sódio pH 6,5. A solução resultante foi dialisada contra tampão fosfato de sódio pH 6,5 utilizando saco de diálise para posterior determinação de atividade de enterocina (PARENTE e HILL, 1992b).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM FRASCOS ERLLENMEYERS

5.1.1. Definição Preliminar das Condições de Cultivo para Produção de Enterocina

Foram feitas fermentações com o objetivo de determinar o microrganismo produtor e as melhores condições de pH_{inicial}, fonte de carbono e agitação para a produção de enterocina.

Em todos os ensaios o *E. faecalis* foi utilizado como microrganismo teste, inclusive nos meios em que foi empregado como microrganismo produtor da enterocina. O *E. faecalis* foi propagado em meio basal modificado para produzir enterocina e em meio MRS como microrganismo teste.

As Tabelas 5.1 e 5.2 apresentam os resultados de pH, massa celular seca, atividade de enterocina e concentração de açúcar dos ensaios feitos em frascos Erlenmeyers utilizando o *E. faecium* (ensaios 1 a 24 – Tabela 4.2) e o *E. faecalis* (ensaios 25 a 48 – Tabela 4.3) como microrganismo produtor.

Os três ensaios que propiciaram os melhores resultados de atividade utilizando o *E. faecium* como microrganismo produtor foram o 7, o 11 e o 22. O ensaio 7 foi feito com pH_{inicial} 6,0, sem agitação e com glicose como fonte de carbono, a atividade de enterocina foi de 4,38UE após 24h de incubação e este valor manteve-se até 48h. A atividade foi de 4,39UE (24h) e 4,46UE (48h) no ensaio 11 conduzido com glicose, pH_{inicial} 6,0 e sem agitação. A sacarose foi utilizada como fonte de carbono no ensaio 22, no qual a atividade foi 4,18UE em 48h de incubação, com pH_{inicial} 10,0 e agitação 200rpm.

Para o *E. faecalis*, os três ensaios nos quais foram observadas as melhores atividades foram o 34, o 40 e o 46, com pH_{inicial} 6,0; 8,0 e 10,0, respectivamente. Todos os ensaios foram conduzidos com sacarose como fonte de carbono e agitação de 200rpm. A atividade foi de 4,64UE (24h) no ensaio 34; 5,31UE (24h) no ensaio 40 e 5,21UE (24h) no ensaio 46.

Tabela 5. 1 - Valores de pH, massa celular seca (g.L⁻¹), atividade de enterocina (UE) e concentração de açúcar (g.L⁻¹) dos experimentos preliminares com *E. faecium* em frascos Erlenmeyers nos tempos de 0, 24 e 48h

Ensaio	pH			Massa Celular Seca (g.L ⁻¹)			Atividade (UE)			Concentração de Açúcar (g.L ⁻¹)		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
1 G	x	4,4	4,4	0,00*	0,02	0,20	2,09	3,34	3,29	18,77	16,23	14,69
2 G	x	4,4	4,4	0,00*	0,01	0,29	2,09	2,81	3,16	18,77	16,52	15,32
3 S	4,43	4,24	4,19	0,13	0,39	0,74	1,54	2,39	2,51	21,87	19,55	19,12
4 S	4,43	4,26	4,23	0,13	0,59	0,72	1,54	1,91	2,43	21,87	18,52	17,72
5 M	x	4,2	4,2	0,07	0,08	0,09	2,65	3,00	3,09	22,18	22,14	21,54
6 M	x	4,2	4,2	0,07	0,22	0,51	2,65	2,82	3,20	22,18	21,79	19,11
7 G	x	4,2	4,2	0,00*	0,18	0,56	1,55	4,38	4,38	21,39	16,62	15,64
8 G	x	4,8	4,9	0,02	0,08	0,56	1,55	2,86	3,00	21,39	18,27	14,69
9 S	6,34	4,91	4,78	0,34	0,80	1,08	0,52	2,44	2,64	19,98	19,85	15,50
10 S	6,34	5,18	5,14	0,34	0,54	0,78	0,52	2,06	2,61	19,98	18,70	18,54
11 M	x	4,3	4,4	0,01	0,23	0,32	1,45	4,39	4,46	21,79	19,75	17,96
12 M	x	4,9	4,9	0,01	0,06	0,13	1,45	3,31	3,07	21,79	18,92	18,19
13 G	x	4,5	4,4	0,06	0,19	0,26	0,48	2,77	3,45	21,58	14,74	14,11
14 G	x	5,7	5,5	0,06	0,06	0,13	0,48	1,49	1,84	21,58	17,95	16,39
15 S	8,13	4,75	4,72	0,48	0,98	1,12	0,00	3,03	3,15	18,07	17,51	17,26
16 S	8,13	5,01	5,00	0,48	1,15	1,29	0,00	3,09	2,80	18,07	15,50	14,37
17 M	x	5,0	5,0	0,67	0,61	1,10	0,00	3,14	3,06	22,57	18,74	17,32
18 M	x	5,5	5,5	0,67	0,09	0,10	0,00	2,92	2,54	22,57	21,49	20,61
19 G	7,04	4,59	4,48	0,16	0,33	0,56	0,00	2,01	2,11	12,96	9,85	8,44
20 G	7,04	6,38	5,72	0,16	0,39	0,59	0,00	0,00	0,00	12,96	11,91	11,33
21 S	9,73	4,86	4,76	0,72	1,59	2,07	0,00	3,75	3,79	18,50	13,39	12,08
22 S	9,73	5,04	4,88	0,72	1,71	2,05	0,00	3,78	4,18	18,50	11,42	10,99
23 M	x	5,1	5,0	0,53	0,14	0,23	0,00	3,31	3,24	20,87	16,27	14,37
24 M	x	5,4	5,4	0,53	0,43	0,52	0,00	3,07	3,25	20,87	16,03	15,29

x- valores não medidos; G- glicose; S – sacarose e M – açúcar mascavo como fonte de carbono

* massa celular seca do inóculo não foi detectada pelo método utilizado

Tabela 5.2 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e concentração de açúcar (g.L^{-1}) dos experimentos preliminares com *E. faecalis* em frascos Erlenmeyers nos tempos de 0, 24 e 48h

Ensaio	pH			Massa Celular Seca (g.L^{-1})			Atividade (UE)			Concentração de Açúcar (g.L^{-1})		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
25 G	4,52	4,14	4,08	0,38	0,44	0,47	2,15	3,77	3,31	20,67	19,82	14,05
26 G	4,52	4,13	4,14	0,38	0,50	0,52	2,15	3,21	3,44	20,67	19,67	11,24
27 S	4,46	4,03	3,93	0,22	0,39	0,55	1,64	3,15	3,44	19,98	16,93	16,53
28 S	4,46	4,02	3,97	0,22	0,56	1,02	1,64	3,40	3,31	19,98	17,99	16,64
29 M	4,34	4,12	4,10	0,25	0,35	0,84	2,38	3,34	3,68	22,78	22,13	21,47
30 M	4,34	4,15	4,15	0,25	0,32	0,36	2,38	2,94	3,30	22,78	21,85	20,63
31 G	6,07	4,23	4,20	0,27	0,46	0,65	0,69	4,14	4,34	19,87	16,52	13,86
32 G	6,07	4,34	4,42	0,27	0,57	0,62	0,69	4,08	3,53	19,87	17,89	15,33
33 S	6,34	4,93	4,73	0,30	0,93	1,18	0,51	1,89	2,26	18,70	15,07	14,74
34 S	6,34	4,60	4,61	0,30	1,15	1,86	0,51	4,64	4,24	18,70	17,64	15,90
35 M	6,19	4,38	4,43	0,40	0,46	0,58	0,40	4,17	3,97	21,86	20,69	19,89
36 M	6,19	4,90	4,91	0,40	0,66	0,69	0,40	2,70	2,60	21,86	18,85	18,32
37 G	6,72	4,42	4,33	0,31	0,44	0,56	0,00	3,27	4,29	17,60	15,67	12,18
38 G	6,72	4,60	4,67	0,31	0,32	0,70	0,00	3,02	3,06	17,60	12,83	11,93
39 S	8,14	4,58	4,59	0,56	1,51	1,82	0,00	3,35	3,20	17,72	15,47	14,59
40 S	8,14	4,68	4,69	0,56	1,68	1,82	0,00	5,31	4,89	17,72	12,61	12,58
41 M	7,89	4,74	4,77	0,86	0,95	1,07	0,00	2,89	2,87	21,26	18,74	15,11
42 M	7,89	4,83	4,92	0,86	1,40	1,20	0,00	3,62	3,49	21,26	16,49	15,96
43 G	6,94	4,54	4,45	0,41	0,68	0,70	0,00	2,88	2,64	14,26	9,24	9,04
44 G	6,53	4,30	4,29	0,31	1,08	1,01	0,22	4,53	4,40	17,28	15,64	12,69
45 S	9,72	4,71	4,69	0,92	1,83	1,94	0,00	3,91	3,97	18,19	11,59	10,08
46 S	9,71	4,66	4,74	0,92	2,34	2,70	0,00	5,21	5,12	18,19	12,33	9,89
47 M	9,48	4,80	4,85	1,17	1,22	1,37	0,00	2,73	2,60	21,79	13,89	13,00
48 M	9,48	4,82	4,93	1,17	1,97	2,16	0,00	3,68	3,39	21,79	10,67	9,70

G- glicose; S – sacarose e M – açúcar mascavo como fonte de carbono

As Tabelas 5.3 e 5.4 apresentam os valores de consumo de açúcar entre o tempo inicial e final dos experimentos preliminares feitos em frascos Erlenmeyers com *E. faecium* e *E. faecalis*, respectivamente. Para o cálculo do consumo foi considerado como a concentração inicial de açúcar a amostra no tempo zero, incluindo-se também os 10% de inóculo.

Tabela 5.3 – Consumo de açúcar (g.L^{-1} e %) verificado nos experimentos preliminares por *E. faecium* feitos em frascos Erlenmeyers entre o tempo inicial e final de fermentação (0 e 48h)

Ensaio	Consumo (g.L^{-1})	Consumo %	Ensaio	Consumo (g.L^{-1})	Consumo %
1 G	4,08	21,74	13 G	7,47	34,62
2 G	3,45	18,38	14 G	5,19	24,05
3 S	2,75	12,57	15 S	0,81	4,48
4 S	4,15	18,98	16 S	3,70	20,48
5 M	0,64	2,89	17 M	5,25	23,26
6 M	3,07	13,84	18 M	1,96	8,68
7 G	5,75	26,88	19 G	4,52	34,88
8 G	6,70	31,32	20 G	1,63	12,58
9 S	4,48	22,42	21 S	6,42	34,70
10 S	1,44	7,21	22 S	7,51	40,59
11 M	3,83	17,58	23 M	6,50	31,15
12 M	3,60	16,52	24 M	5,58	26,74

G- glicose; S – sacarose e M – açúcar mascavo como fonte de carbono

Na Tabela 5.3 observa-se que o consumo de açúcar variou de 2,89% a 40,59%. O menor consumo de substrato foi no ensaio 5 conduzido com $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0, sem agitação e utilizando açúcar mascavo como fonte de carbono. No ensaio 22 foi onde houve o maior consumo de açúcar (40,59%) e um dos três maiores valores de atividade de enterocina (4,18UE). A fonte de carbono utilizada neste ensaio foi sacarose, o $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 e agitação de 200rpm.

Tabela 5. 4 – Consumo de açúcar (g.L^{-1} e %) verificado nos experimentos preliminares por *E. faecalis* feitos em frascos Erlenmeyers entre o tempo inicial e final de fermentação (0 e 48h)

Ensaio	Consumo (g.L^{-1})	Consumo %	Ensaio	Consumo (g.L^{-1})	Consumo %
25 G	6,62	32,03	37 G	5,42	30,80
26 G	9,43	45,62	38 G	5,67	32,22
27 S	3,45	17,27	39 S	3,13	17,66
28 S	3,34	16,72	40 S	5,14	29,01
29 M	1,31	5,75	41 M	6,15	28,93
30 M	2,15	9,44	42 M	5,30	24,93
31 G	6,01	30,25	43 G	5,22	36,61
32 G	4,54	22,85	44 G	4,59	26,56
33 S	3,96	21,18	45 S	8,11	44,58
34 S	2,80	14,97	46 S	8,30	45,63
35 M	1,97	9,01	47 M	8,79	40,34
36 M	3,54	16,19	48 M	12,09	55,48

G- glicose; S – sacarose e M – açúcar mascavo como fonte de carbono

Nas fermentações feitas com *E. faecalis*, como microrganismo produtor, observou-se um maior consumo de açúcar em relação aos ensaios com *E. faecium*, sendo que os valores variaram de 5,75 a 55,48%. O menor consumo foi observado quando se empregou $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 4,0, sem agitação e açúcar mascavo como fonte de carbono (ensaio 29). A atividade de enterocina obtida nestas condições de 3,68UE. Já no ensaio 48 o consumo de açúcar foi o maior, porém a atividade de enterocina observada foi menor que no ensaio 29, com valor de 3,39UE. Este ensaio também se utilizou açúcar mascavo como fonte de carbono, mas a agitação foi 200rpm e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0.

Avaliando-se os valores de consumo de açúcar e atividade de enterocina para todos os experimentos preliminares, feitos em frascos Erlenmeyers, pôde-se concluir que não há uma relação direta entre estes dois parâmetros.

O pH de todos os ensaios foi acertado antes da esterilização e os valores ficaram próximos do esperado, com exceção dos meios que utilizavam glicose e pH_{inicial} 10,0 (ensaios 19, 20, 43 e 44), nos quais o pH_{inicial} ficou menor que o proposto.

Da mesma forma os valores iniciais de concentração de açúcar nos ensaios 19, 20 e 43 foram menores do que 20g.L⁻¹, adicionados no momento do preparo do meio. Possivelmente a combinação do pH_{inicial} e concentração inicial de açúcar menor, fizeram com que no ensaio 20 nenhuma atividade de enterocina fosse observada.

5.1.2. Produção de Enterocina em Frascos Erlenmeyers

Em todos os experimentos preliminares a atividade foi feita de maneira incorreta, o pH do sobrenadante não foi acertado para 6,5, antes da realização da determinação de atividade de enterocina. A inibição do crescimento do microrganismo teste pode ter ocorrido devido ao baixo pH causado pela formação de ácidos orgânicos durante a fermentação e não só através da ação da enterocina.

CABO et al. (1999) citaram que o pH de incubação do microrganismo teste é um importante fator na determinação de atividade. CINTAS et al. (1998) afirmaram que o pH do sobrenadante deve ser acertado para 6,2, a fim de eliminar a inibição do crescimento do microrganismo teste pela diminuição do pH ou formação de peróxido de hidrogênio.

Após avaliar os resultados preliminares dos 48 ensaios foram selecionados 32 para confirmar e verificar os dados obtidos anteriormente. Devido aos fatos discutidos no item 5.1.1 todos os experimentos feitos com glicose como fonte de carbono e pH_{inicial} 10,0 foram descartados, porque apresentaram baixos valores de atividade de enterocina.

As fermentações tiveram tempo total de 24h e amostragem nos tempos inicial e final de fermentação, pois através dos resultados preliminares observou-se que a atividade da enterocina não propiciou aumento significativo após 24h de cultivo e na maioria dos ensaios ocorreu até mesmo uma pequena diminuição dos valores.

A partir desta etapa as amostras obtidas durante as fermentações foram centrifugadas e o pH do sobrenadante acertado em 6,5 (NaOH ou HCl 2N) antes da determinação da atividade de enterocina.

A Tabela 5.5 mostram os valores de pH, massa celular seca, atividade de enterocina, concentração de açúcar e atividade específica de enterocina para os tempos de 0 e 24h, referentes à Tabela 4.4.

Tabela 5.5 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE), concentração de açúcar (g.L^{-1}) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) durante a produção de enterocina em frascos Erlenmeyers por *E. faecium* nos tempos de 0 e 24h

Ensaio	pH		Massa Celular Seca (g.L^{-1})		Atividade (UE)		Concentração. de Açúcar (g.L^{-1})		Atividade Específica (UE.L.g^{-1})
	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	24h
1 G	4,10	3,98	0,16	0,53	0,81	0,91	20,78	17,97	1,72
2 G	4,10	4,01	0,16	0,47	0,81	0,92	20,78	17,52	1,96
3 M	4,36	4,17	0,23	0,57	0,77	1,13	18,93	14,16	1,98
4 M	4,36	4,20	0,23	0,61	0,77	1,37	18,93	14,80	2,25
5 G	6,01	4,14	0,28	0,62	0,62	2,09	20,58	16,30	3,37
6 G	6,01	4,83	0,28	0,63	0,62	1,29	20,58	18,20	2,05
7 M	6,21	4,41	0,28	0,72	0,60	1,68	19,89	17,37	2,33
8 M	6,21	4,87	0,28	0,50	0,60	0,95	19,89	16,58	1,90
9 S	7,87	4,72	0,36	1,11	0,38	1,96	20,37	16,27	1,77
10 S	7,87	4,94	0,36	1,10	0,38	1,23	20,37	18,71	1,12
11 M	7,89	4,79	0,29	1,15	0,76	1,84	19,33	17,67	1,60
12 M	7,89	5,32	0,29	1,15	0,76	1,12	19,33	17,77	0,97
13 S	9,72	4,87	0,61	0,72	0,00	2,81	20,74	13,11	3,90
14 S	9,72	5,04	0,61	0,97	0,00	2,48	20,74	15,82	2,56
15 M	9,37	4,86	0,56	0,76	0,44	2,39	19,85	14,24	3,14
16 M	9,37	5,09	0,56	1,19	0,44	2,05	19,85	12,66	1,72

G- glicose; S – sacarose e M – açúcar mascavo como fonte de carbono

Na Figura 5.1 estão representados os valores de atividade de enterocina no tempo de 24h em frascos Erlenmeyers utilizando como microrganismo produtor o *E. faecium* e o $\text{pH}_{\text{inicial}}$ de cada fermentação.

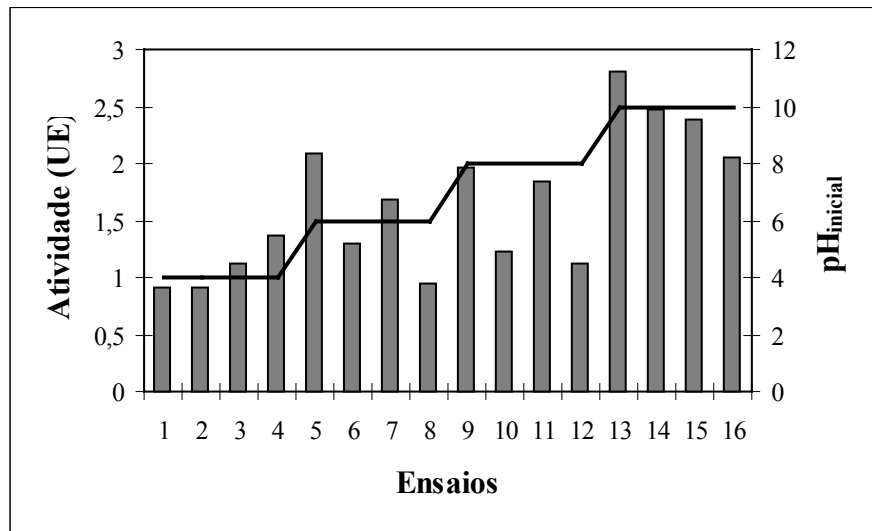


Figura 5.1 - Valores de atividade de enterocina (UE) e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ de fermentação em frascos Erlenmeyers por *E. faecium* com 24h de incubação dos ensaios 1 a 16

Analisando-se os resultados de atividade de enterocina, representados na Figura 5.1, observou-se que os valores aumentaram com o aumento do $\text{pH}_{\text{inicial}}$ de 4,0 a 10,0, com exceção do ensaio 5 o qual representa o quarto maior valor de atividade (2,09UE) sendo conduzido com $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 6,0.

Nos ensaios 14, 15 e 16 também foram obtidos valores de atividade elevados, sendo 2,48; 2,39 e 2,05UE, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados com $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0, nos ensaios 15 e 16 o açúcar mascavo foi utilizado como fonte de carbono enquanto que no ensaio 14 foi a sacarose. Em relação à agitação os ensaios 14 e 16 foram feitos com 200rpm e o ensaio 15 sem agitação.

Os valores de pH, massa celular seca, atividade de enterocina, concentração de açúcar e atividade específica de enterocina para os tempos de 0 e 24h, durante a produção de enterocina em frascos Erlenmeyers utilizando como microrganismo produtor o *E. faecalis* estão mostrados na Tabela 5.6.e na Figura 5.2, estão representados os valores de atividade de enterocina no tempo de 24h e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ de cada fermentação.

Tabela 5.6 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE), concentração de açúcar (g.L^{-1}) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) durante a produção de enterocina em frascos Erlenmeyers com *E. faecalis* nos tempos de 0 e 24h

Ensaio	pH		Massa Celular Seca (g.L^{-1})		Atividade (UE)		Concentração. de Açúcar (g.L^{-1})		Atividade Específica (UE.L.g^{-1})
	0h	24h	0h	24h	0h	24h	0h	24h	24h
17 S	4,25	4,09	0,13	0,53	0,67	0,73	21,08	17,96	1,38
18 S	4,25	4,12	0,13	0,19	0,67	0,88	21,08	19,90	4,63
19 M	4,06	4,00	0,09	0,31	0,90	0,56	21,05	18,25	1,81
20 M	4,06	4,01	0,09	0,16	0,90	0,69	21,05	20,09	4,31
21 S	6,08	4,44	0,13	0,31	0,43	0,86	21,91	19,42	2,77
22 S	6,08	4,66	0,13	0,69	0,43	1,53	21,91	18,75	2,22
23 M	5,96	4,25	0,03	0,50	0,28	0,63	20,61	18,89	1,26
24 M	5,96	4,77	0,03	0,72	0,28	0,65	20,61	18,73	0,90
25 S	8,06	4,63	0,17	1,01	0,66	1,48	19,34	18,83	1,47
26 S	8,06	4,68	0,17	1,41	0,66	0,81	19,34	16,31	0,57
27 M	7,65	4,66	0,18	0,99	0,24	1,10	20,57	15,26	1,11
28 M	7,65	4,79	0,18	1,29	0,24	1,06	20,57	15,44	0,82
29 S	9,59	4,71	0,38	1,33	0,83	0,70	21,83	15,44	0,53
30 S	9,59	4,65	0,38	1,81	0,83	0,64	21,83	13,69	0,35
31 M	9,44	4,75	0,48	1,40	0,41	1,17	20,93	13,26	0,84
32 M	9,44	4,72	0,48	2,04	0,41	1,68	20,93	11,86	0,82

G- glicose; S – sacarose e M – açúcar mascavo como fonte de carbono

O pH_{final} nos ensaios de 17 a 32 variaram de 4,00 (ensaio 19) a 4,79 (ensaio 28), enquanto que o menor valor de massa celular seca foi de $0,16\text{g.L}^{-1}$ no ensaio 20. Os maiores valores de massa celular seca e atividade foram observados no ensaio 32, sendo estes resultados respectivamente, $2,04\text{ g.L}^{-1}$ e $1,68\text{UE}$; este ensaio foi feito com açúcar mascavo, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 e agitação de 200rpm. Nas fermentações em frascos Erlenmeyers e

com o *E. faecium*, como microrganismo produtor, não foram observados nas mesmas condições, os maiores valores de massa celular seca e atividade de enterocina.

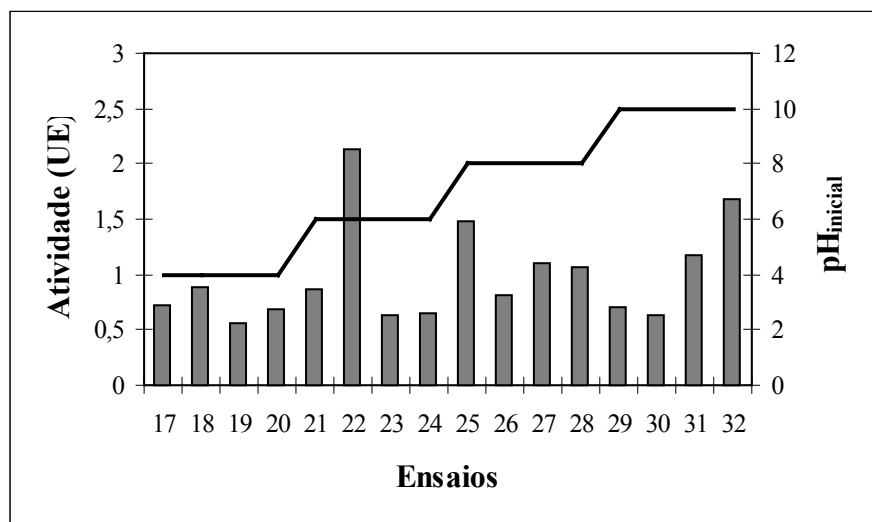


Figura 5.2 - Valores de atividade de enterocina (UE) e pH_{inicial} de fermentação em frascos Erlenmeyers por *E. faecalis* com 24h de incubação dos ensaios 17 a 32

Os ensaios 22, 25 e 31 também apresentaram valores elevados de atividade de enterocina, sendo que no ensaio 22 o valor encontrado foi de 1,53UE (200rpm, pH_{inicial} 6,0 e sacarose), no ensaio 25 a atividade máxima foi 1,48UE e as condições de cultivo foram pH_{inicial} 8,0, sem agitação e com sacarose como fonte de carbono. Já o ensaio 31, conduzido com agitação de 200rpm, açúcar mascavo e pH_{inicial} 10,0, apresentou atividade de enterocina de 1,17UE.

Os resultados dos ensaios feitos com o *E. faecium* (Tabela 5.5) mostraram que, para 24h de fermentação, o ensaio 13 foi o que apresentou o maior valor de atividade específica (3,90UE.L.g⁻¹) e de atividade de enterocina (2,81UE). As condições de pH_{inicial}, agitação e fonte de carbono utilizadas neste ensaio forneceram o maior valor de atividade e também o maior rendimento da atividade de enterocina por célula.

Avaliando os ensaios com *E. faecalis* no tempo de 24h, a melhor atividade de enterocina (ensaio 32) e a maior atividade específica (ensaio 18) não foram observadas no mesmo ensaio, ou seja, as condições utilizadas no ensaio 32 apesar de favorecerem a maior atividade da enterocina não propiciaram o maior rendimento de atividade de enterocina por

célula. Contudo, as condições do ensaio 32 são as melhores, uma vez que no volume total de fermentação, houve maior produção de enterocina.

Através dos resultados da Tabela 5.6 constatou-se a inibição do microrganismo teste pela enterocina produzida por *E. faecalis*, porém nos ensaios 17 a 32 esta cepa foi utilizada como microrganismo produtor e microrganismo teste. Alguns autores citaram atividade das enterocinas isoladas do mesmo microrganismo produtor, porém utilizando linhagens diferentes. HERRANZ et al. (2001) observaram atividade da enterocina P21 produzida por *E. faecium* P21 frente a *E. faecium* L50, *E. faecium* T136 e *E. faecium* P13. Da mesma forma ENNAHAR et al. (1998) testaram a atividade da enterocina 81 produzida por *E. faecium* WHE 81 perante a mesma cepa produtora e em uma cepa de *E. faecium* 5432. Foi verificada zona de inibição na cepa 5432 e com o microrganismo produtor nenhuma zona de inibição foi observada. VILLANI et al. (1993) purificaram parcialmente a enterocina 226NWC produzida por *E. faecalis* 226 e testaram a capacidade de inibição da mesma enterocina; foi constatado que não ocorreu a inibição da cepa do microrganismo produtor e de uma cepa de *E. faecalis* 229.

Conforme relatos de CINTAS et al. (1998), HERRANZ et al. (2001) e LEROY e DE VUYST et al. (2002) uma única cepa de bactéria láctica é capaz de produzir mais de uma bacteriocina, sendo este um fato encontrado na natureza com bastante frequência, contrariando o que inicialmente era acreditado.

O fato da enterocina produzida pelo *E. faecalis* CCT 0328 inibir o próprio microrganismo produtor, pode ser explicado através dos diferentes meios de propagação da cepa. Quando o *E. faecalis* foi utilizado como microrganismo produtor de enterocina, o meio utilizado foi o basal modificado e como microrganismo teste foi propagado em meio MRS.

Pôde-se concluir que dependendo dos componentes do meio e das suas respectivas concentrações, são produzidas diferentes enterocinas por uma mesma cepa. Isto explica o fato da enterocina produzida pelo *E. faecalis* inibir o próprio microrganismo produtor.

A Tabela 5.7 mostra os resultados de consumo de açúcar em g.L⁻¹ e porcentagem de consumo, observado nos experimentos em frascos Erlenmeyers com *E. faecium* (ensaio 1 a 16) e *E. faecalis* (ensaio 17 a 32).

Tabela 5.7 – Consumo de açúcar (g.L^{-1} e %) verificado nos experimentos para produção de enterocina em frascos Erlenmeyers por *E. faecium* (ensaio 1 a 16) e *E. faecalis* (ensaio 17 a 32) entre o tempo inicial e final de fermentação (0 e 24h)

Ensaio	Consumo (g.L^{-1})	Consumo %	Ensaio	Consumo (g.L^{-1})	Consumo %
1 G	2,81	13,52	17 S	3,12	14,80
2 G	3,26	15,69	18 S	1,18	5,60
3 M	4,77	25,20	19 M	2,80	13,30
4 M	4,13	21,82	20 M	0,96	4,56
5 G	4,28	20,80	21 S	2,49	11,36
6 G	2,38	11,56	22 S	3,16	14,42
7 M	2,52	12,67	23 M	1,72	8,35
8 M	3,31	16,64	24 M	1,88	9,12
9 S	4,1	20,13	25 S	0,51	2,64
10 S	1,66	8,15	26 S	3,03	15,67
11 M	1,66	8,59	27 M	5,31	25,81
12 M	1,56	8,07	28 M	5,13	24,94
13 S	7,63	36,79	29 S	6,39	29,27
14 S	4,92	23,72	30 S	8,14	37,29
15 M	5,61	28,26	31 M	7,67	36,65
16 M	7,19	36,22	32 M	9,07	43,33

G- glicose; S – sacarose e M – açúcar mascavo como fonte de carbono

Avaliando os resultados dos ensaios conduzidos com *E. faecium* (Tabela 5.5 e Tabela 5.7) observou-se que no ensaio feito com $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 8,0, agitação de 200rpm e com açúcar mascavo foi encontrado o menor consumo de substrato (8,07%) e também valor de atividade de enterocina pequeno (1,12UE). Porém no ensaio 13 foram observados os maiores valores de consumo de substrato (36,79%) e formação de produto (atividade de enterocina de 2,81UE).

Comparando os valores de consumo de açúcar dos ensaios 17 a 32 (Tabela 5.7) onde se utilizou *E. faecalis* como microrganismo produtor, observou-se que o menor

consumo 2,64% foi no ensaio 25, no qual o $\text{pH}_{\text{inicial}}$ foi 8,0, sem agitação e com sacarose como fonte de carbono. Porém apesar do consumo de substrato ter sido o menor a atividade de enterocina observada foi a terceira maior, com valor de 1,48UE (Tabela 5.6).

O maior consumo de substrato (43,33%), atividade de enterocina (1,68UE) e produção de biomassa ($2,04\text{g.L}^{-1}$) ocorreram no ensaio 32, que foi conduzido com açúcar mascavo, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 e 200rpm de agitação.

Com todos os resultados obtidos nas fermentações em frascos Erlenmeyers pode-se definir que utilizando o *E. faecium*, as melhores condições para produção de enterocina são $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0, sem agitação e com sacarose como fonte de carbono. Já para o *E. faecalis* como microrganismo produtor, utilizando $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0, agitação de 200rpm e açúcar mascavo como fonte de carbono foi obtida máxima produção de enterocina.

Todas estas condições contrariam os resultados obtidos nos ensaios preliminares, o que confirma que o acerto do pH é uma etapa fundamental na determinação da atividade da enterocina; para que os valores encontrados não levem a conclusões erradas das melhores condições de cultivo.

5.2. PRODUÇÃO DE ENTEROCINA EM FERMENTADOR DE BANCADA

A partir dos resultados obtidos para produção de enterocina em frascos Erlenmeyers, foram selecionadas as melhores condições para serem utilizadas no fermentador de bancada. A Tabela 4.6 indica os ensaios realizados, sendo que em quatro deles foi utilizado o *E. faecium* e em dois o *E. faecalis* como microrganismo produtor.

As fermentações ocorreram durante um período total de 24h com amostragens a cada 1h. Na Tabela 5.8 são apresentados os valores de pH_{final} , massa celular seca (g.L^{-1}), concentração de açúcar (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) da produção de enterocina por *E. faecium* em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, sacarose e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 (Ensaio 1).

Tabela 5.8 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), concentração de açúcar (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) durante a produção de enterocina por *E. faecium* em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando sacarose e $\text{pH}_{\text{inicial}} 10,0$ (Ensaio 1)

Tempo (h)	pH	Massa Celular Seca (g.L^{-1})	Concentração de Açúcar (g.L^{-1})	Atividade (UE)	Atividade Específica (UE.L.g^{-1})
0	9,75	0,59	24,71	0,21	0,36
1	9,66	0,59	24,57	0,49	0,83
2	9,64	0,59	24,04	0,56	0,95
3	9,63	0,66	23,72	0,75	1,14
4	9,62	0,69	23,66	0,84	1,22
5	9,41	0,73	23,56	0,87	1,19
6	9,12	0,75	22,46	1,25	1,67
7	8,73	0,80	22,38	1,45	1,81
8	7,95	0,74	21,51	1,85	2,50
9	7,11	0,80	20,73	1,91	2,39
10	6,54	0,87	20,37	2,19	2,52
11	6,03	0,90	20,29	2,32	2,58
12	5,62	0,92	19,13	2,67	2,90
13	5,31	0,80	18,24	2,78	3,48
14	5,16	0,84	18,08	2,63	3,13
15	5,07	0,87	18,04	2,57	2,95
16	5,05	0,76	18,00	2,75	3,62
17	5,00	0,74	17,63	2,50	3,38
18	4,99	0,78	17,24	2,61	3,35
19	4,97	0,69	17,22	2,52	3,65
20	4,93	0,70	17,08	2,74	3,91
21	4,91	0,73	17,06	2,94	4,03
22	4,91	0,76	16,98	2,91	3,83
23	4,92	0,73	16,62	2,65	3,63
24	4,88	0,80	16,13	2,89	3,61

Durante a fermentação o pH variou de 9,75 a 4,88, enquanto que no ensaio em frascos Erlenmeyers após 24h de incubação o pH chegou a um valor final de 5,04. A máxima produção de biomassa ($0,92\text{g.L}^{-1}$) foi observada em 12h e após este período ocorreu um declínio do valor chegando a $0,80\text{g.L}^{-1}$ no final da fermentação. No ensaio em frascos Erlenmeyers o valor encontrado após 24h ($0,97\text{ g.L}^{-1}$) ficou próximo ao valor máximo obtido em 12h de incubação ($0,92\text{g.L}^{-1}$) no fermentador de bancada.

Na Figura 5.3 estão representadas as curvas que descrevem o comportamento característico do ensaio 1, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.8.

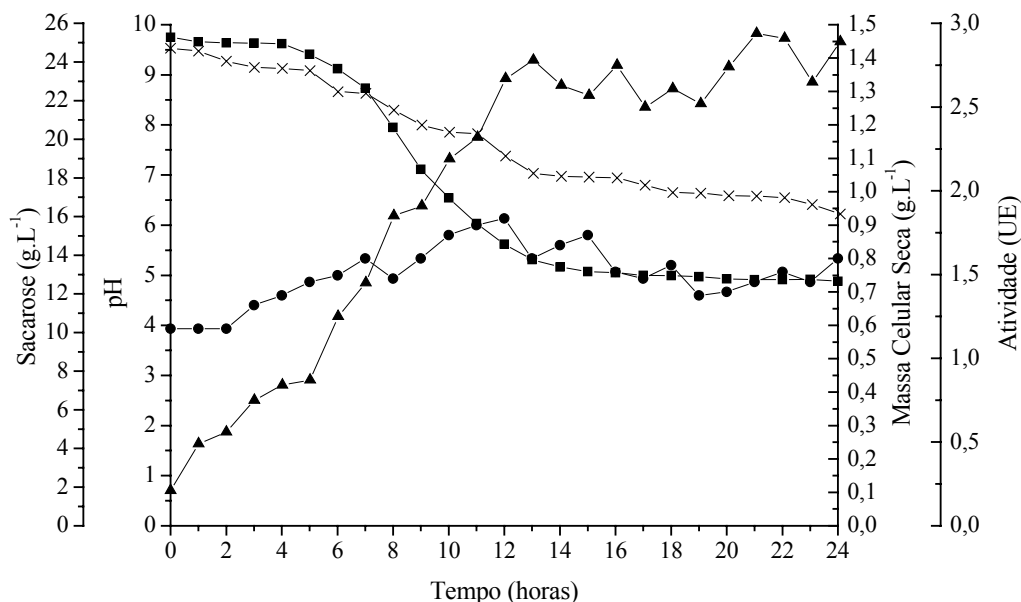


Figura 5.3 - Valores de pH (■), massa celular seca (●), concentração de sacarose (×) e atividade de enterocina (▲) por *E. faecium* em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando sacarose e pH_{inicial} 10,0 (Ensaio 1)

A máxima atividade de enterocina foi observada no tempo de 21h com valor de 2,94UE e permaneceu praticamente constante até o final da fermentação. A produção de enterocina nos frascos Erlenmeyers foi menor obtendo valor máximo de 2,48UE. O consumo de açúcar no fermentador de bancada foi superior aos frascos Erlenmeyers, sendo os valores de 34,72% no fermentador e 23,72% nos frascos Erlenmeyers, de acordo com as Tabelas 5.7 e 5.14, respectivamente.

OGRODOWSKI (2001) utilizando as mesmas condições de $\text{pH}_{\text{inicial}}$, fonte de carbono, agitação e microrganismo produtor, obteve uma máxima atividade de enterocina de 2,66UE após 17h de fermentação e pH_{final} 7,86, massa celular seca $0,33\text{g.L}^{-1}$ (24h) e concentração de açúcar $13,11\text{g.L}^{-1}$ (24h). Comparando os resultados pode-se verificar que os valores de atividade de enterocina e massa celular seca no ensaio 1 foram superiores aos citados por OGRODOWSKI (2001) que utilizou as mesmas condições.

Na Figura 5.3 observa-se que à medida que o pH começa a diminuir, a atividade de enterocina aumenta em proporções maiores, e após 12h os valores de enterocina e pH permanecem praticamente constantes. Nas condições utilizadas neste ensaio verificou-se que o pH teve relação inversa com a atividade de enterocina.

Os resultados de pH_{final} , massa celular seca (g.L^{-1}) concentração de açúcar (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) do ensaio 2 estão mostrados na Tabela 5.9 e Figura 5.4. Este ensaio foi feito com $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0, agitação de 200rpm, açúcar mascavo e com *E. faecium*.

O pH_{final} da fermentação feita em frascos Erlenmeyers (5,09) ficou próximo ao valor observado no fermentador de bancada (4,95). A massa celular seca de $1,19\text{g.L}^{-1}$ obtida nos frascos Erlenmeyers foi superior ao valor de $0,44\text{g.L}^{-1}$ encontrado após 24h de incubação no fermentador de bancada. Além disso, a massa celular seca permaneceu praticamente constante durante toda a fermentação, sendo o máximo valor de 0,65-0,66 entre 5 e 10h de incubação.

No ensaio 2 o consumo de açúcar foi o terceiro maior observado no fermentador de bancada, sendo o valor de 41,40% (Tabela 5.14), enquanto que nos frascos Erlenmeyers este valor foi um pouco menor, 36,22%.

A atividade máxima foi observada em 14h de incubação com valor de 2,15UE e no final da fermentação a atividade diminuiu para 1,98UE; sendo este valor praticamente igual ao encontrado nos frascos Erlenmeyers (2,05UE) com o mesmo tempo de incubação. A Figura 5.4 mostra comportamento semelhante ao ensaio 1, no qual conforme o pH diminui ocorre aumento da atividade de enterocina. A partir de 10h de fermentação os valores de pH, atividade de enterocina, massa celular seca e concentração de açúcar mascavo permaneceram praticamente constantes até 24h.

Tabela 5.9 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), concentração de açúcar (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) durante a produção de enterocina por *E. faecium* em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando açúcar mascavo e $\text{pH}_{\text{inicial}} 10,0$ (Ensaio 2)

Tempo (h)	pH	Massa Celular Seca (g.L^{-1})	Concentração de Açúcar (g.L^{-1})	Atividade (UE)	Atividade Específica (UE.L.g^{-1})
0	9,60	0,57	20,65	0,23	0,40
1	9,54	0,58	20,57	0,35	0,60
2	9,49	0,58	20,47	0,46	0,79
3	9,45	0,59	20,13	0,47	0,80
4	9,34	0,61	19,61	0,52	0,85
5	9,16	0,65	19,25	0,77	1,18
6	8,64	0,68	18,27	0,81	1,19
7	7,73	0,66	18,09	0,90	1,36
8	6,87	0,66	15,58	1,48	2,24
9	6,30	0,65	15,14	1,61	2,48
10	5,83	0,66	15,12	1,89	2,86
11	5,50	0,61	14,70	1,82	2,98
12	5,34	0,63	14,68	1,85	2,94
13	5,24	0,61	14,62	1,91	3,13
14	5,18	0,59	14,48	2,15	3,64
15	5,12	0,62	14,04	1,95	3,15
16	5,08	0,60	13,60	1,83	3,05
17	5,06	0,58	13,26	1,89	3,26
18	5,05	0,52	13,38	1,84	3,54
19	5,01	0,52	14,47	1,86	3,58
20	4,99	0,54	14,20	1,97	3,65
21	4,99	0,58	13,76	1,99	3,43
22	4,97	0,56	13,06	2,02	3,61
23	4,95	0,50	12,88	2,00	4,00
24	4,95	0,44	12,10	1,98	4,50

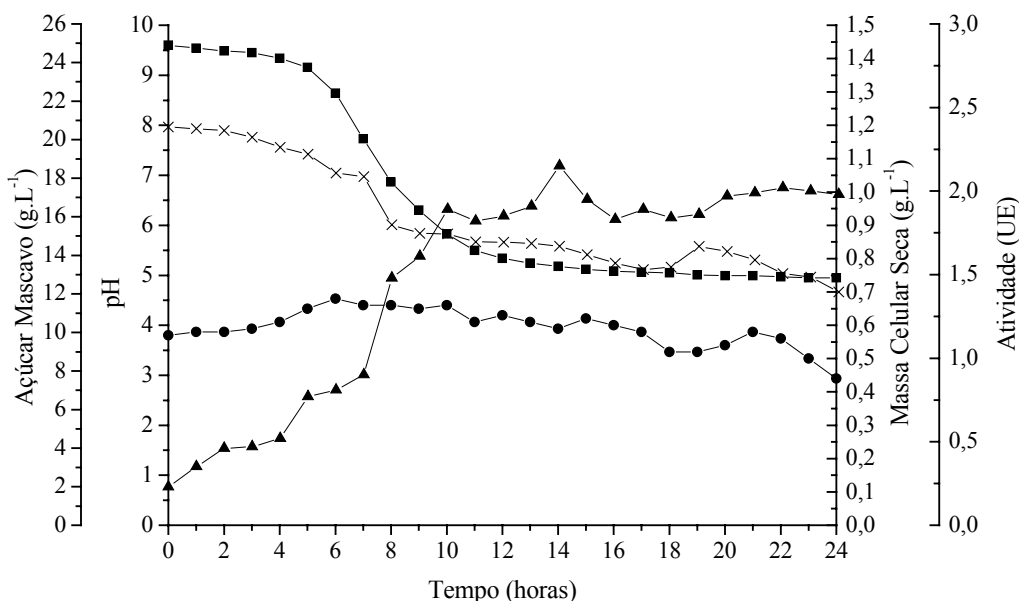


Figura 5.4 - Valores de pH (■), massa celular seca (●), concentração de açúcar mascavo (×) e atividade de enterocina (▲) por *E. faecium* em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando açúcar mascavo e pH_{inicial} 10,0 (Ensaio 2)

O ensaio 3 foi conduzido com pH_{inicial} 6,0, agitação de 200rpm, sacarose como fonte de carbono e com *E. faecalis* como microrganismo produtor. Os resultados de pH_{final}, massa celular seca (g.L⁻¹), concentração de açúcar (g.L⁻¹), atividade específica (UE) e atividade específica (UE.L.g⁻¹) deste ensaio estão representados Tabela 5.10 e Figura 5.5.

No ensaio 3 foram observados os menores valores de consumo de açúcar e atividade de enterocina. Apesar de que nos frascos Erlenmeyers a atividade de enterocina tenha sido o segundo maior valor para estas condições, no fermentador de bancada o mesmo comportamento não foi encontrado. A máxima atividade nos frascos Erlenmeyers foi de 1,53UE e utilizando as mesmas condições no fermentador de bancada foi 0,92UE em 11h, cujo valor caiu para apenas 0,28UE no final da fermentação.

Tabela 5.10 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), concentração de açúcar (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) durante a produção de enterocina por *E. faecalis* em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando sacarose e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 6,0 (Ensaio 3)

Tempo (h)	pH	Massa Celular Seca (g.L^{-1})	Concentração de Açúcar (g.L^{-1})	Atividade (UE)	Atividade Específica (UE.L.g^{-1})
0	6,09	0,30	22,87	0,39	1,30
1	5,92	0,34	22,81	0,40	1,18
2	5,36	0,53	22,16	0,51	0,96
3	4,85	0,61	21,77	0,54	0,89
4	4,70	0,66	21,49	0,51	0,77
5	4,58	0,43	21,20	0,62	1,44
6	4,50	0,60	21,45	0,82	1,37
7	4,43	0,71	21,20	0,88	1,24
8	4,44	1,06	20,88	0,84	0,79
9	4,46	0,84	19,95	0,82	0,98
10	4,46	0,92	19,49	0,79	0,86
11	4,46	0,94	19,67	0,92	0,98
12	4,46	1,01	19,79	0,77	0,76
13	4,46	1,35	19,28	0,78	0,58
14	4,47	1,28	19,69	0,63	0,49
15	4,48	1,18	19,42	0,54	0,46
16	4,47	1,19	19,35	0,51	0,43
17	4,48	1,13	19,31	0,47	0,42
18	4,50	1,20	19,24	0,36	0,30
19	4,46	1,07	19,17	0,35	0,33
20	4,48	1,23	19,49	0,28	0,23
21	4,48	1,27	19,05	0,33	0,26
22	4,47	1,31	19,49	0,34	0,26
23	4,48	1,27	18,99	0,30	0,24
24	4,48	1,02	19,03	0,28	0,27

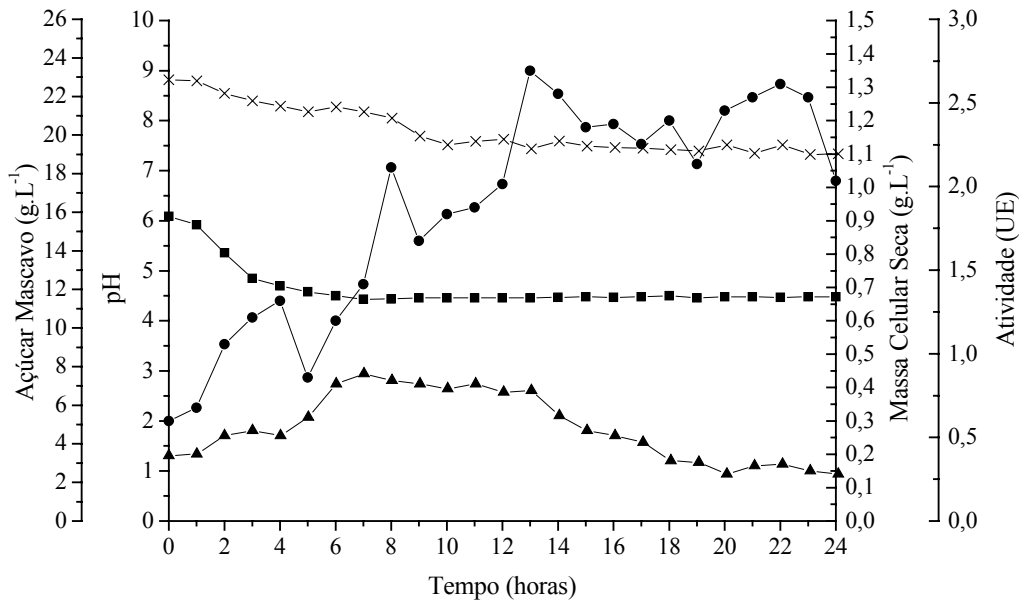


Figura 5.5 - Valores de pH (■), massa celular seca (●), concentração de sacarose (x) e atividade de enterocina (▲) por *E. faecalis* em fermentador de bancada com agitação, utilizando sacarose e pH_{inicial} 6,0 (Ensaio 3)

No fermentador de bancada, apenas 16,79% da fonte de carbono adicionada no início da fermentação foi consumida e nos frascos Erlenmeyers o consumo também foi baixo (14,42%). Apesar do baixo consumo de açúcar e de atividade de enterocina, a massa celular seca chegou a um valor elevado (1,35g.L⁻¹) em 13h de incubação. Nos frascos Erlenmeyers apenas 0,69g.L⁻¹ foram produzidas.

O pH após 7h permaneceu praticamente constante até o final da fermentação, mas o valor diminuiu de 6,09 no início para 4,48 no final, como era esperado. Nos frascos Erlenmeyers houve maior declínio, sendo encontrada queda de pH, de 6,08 para 4,66.

A Tabela 5.11 e a Figura 5.6 mostram os resultados de pH_{final}, massa celular seca (g.L⁻¹), concentração de açúcar (g.L⁻¹), atividade de enterocina.(UE) e atividade específica (UE.L.g⁻¹) do ensaio 4 (*E. faecium*, pH_{inicial} 10,0, sem agitação e com sacarose).

Tabela 5.11 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), concentração de açúcar (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) durante a produção de enterocina por *E. faecium* em fermentador de bancada sem agitação, utilizando sacarose e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 (Ensaio 4)

Tempo (h)	pH	Massa Celular Seca (g.L^{-1})	Concentração de Açúcar (g.L^{-1})	Atividade (UE)	Atividade Específica (UE.L.g^{-1})
0	9,65	0,51	22,72	0,05	0,10
1	9,58	0,51	22,70	0,09	0,18
2	9,55	0,54	22,06	0,24	0,44
3	9,37	0,57	22,02	0,71	1,25
4	9,07	0,65	20,13	1,01	1,55
5	8,82	0,65	19,81	1,12	1,72
6	8,57	0,67	19,35	1,36	2,03
7	8,55	0,68	19,40	1,61	2,37
8	7,96	0,73	18,05	1,41	1,93
9	6,84	0,92	17,74	1,70	1,85
10	5,54	0,96	16,17	1,83	1,91
11	4,96	1,00	15,12	1,91	1,91
12	4,79	1,10	14,46	1,95	1,77
13	4,70	1,11	14,68	2,07	1,86
14	4,60	1,04	14,50	1,97	1,89
15	4,56	1,16	14,60	2,00	1,72
16	4,53	1,28	14,21	2,13	1,66
17	4,51	1,33	14,62	2,07	1,56
18	4,50	1,10	14,18	2,12	1,93
19	4,47	1,37	14,57	1,78	1,30
20	4,46	1,37	14,53	1,78	1,30
21	4,48	1,35	14,53	1,76	1,30
22	4,45	1,27	13,71	1,64	1,29
23	4,46	1,39	13,78	1,48	1,06
24	4,42	1,28	12,86	1,18	0,92

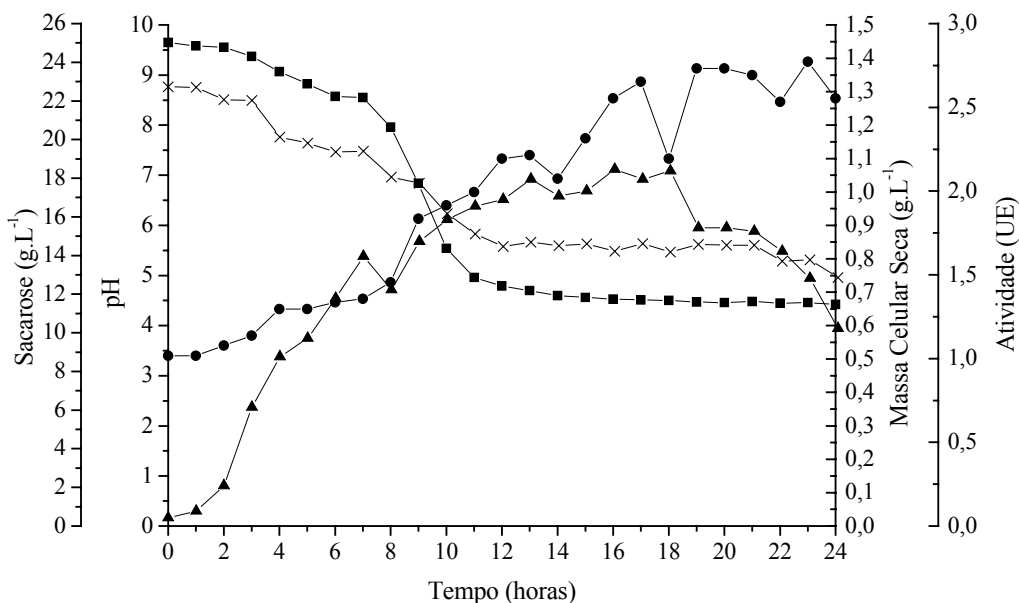


Figura 5.6 - Valores de pH (■), massa celular seca (●), concentração de sacarose (×) e atividade de enterocina (▲) por *E. faecium* em fermentador de bancada sem agitação, utilizando sacarose e pH_{inicial} 10,0 (Ensaio 4)

No ensaio 4 a massa celular seca alcançou valor de 1,39g.L⁻¹ em 23h e nos frascos Erlenmeyers apenas 0,72g.L⁻¹ foram observadas no ensaio feito nas mesmas condições. O pH variou de 9,65 a 4,42. O consumo de açúcar foi de 43,40%, o segundo maior valor encontrado nas fermentações no fermentador de bancada e o maior valor nos frascos Erlenmeyers (36,79%).

A atividade de enterocina nos frascos Erlenmeyers foi de 2,81UE em 24h, o maior valor observado quando utilizado o *E. faecium* como microrganismo produtor, porém no fermentador de bancada em 16h ocorreu o máximo valor de 2,13UE e em 24h a atividade foi menor, 1,18UE.

Os resultados de pH_{final}, massa celular seca (g.L⁻¹), concentração de açúcar (g.L⁻¹), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g⁻¹) do ensaio 5 estão mostrados e representados na Tabela 5.12 e Figura 5.7, respectivamente. O ensaio 5 foi feito com *E. faecium* como microrganismo produtor, pH_{inicial} 10,0, sem agitação e com açúcar mascavo.

Tabela 5.12 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), concentração de açúcar (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) durante a produção de enterocina por *E. faecium* em fermentador de bancada sem agitação, utilizando açúcar mascavo e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 (Ensaio 5)

Tempo (h)	pH	Massa Celular Seca (g.L^{-1})	Concentração de Açúcar (g.L^{-1})	Atividade (UE)	Atividade Específica (UE.L.g^{-1})
0	9,69	0,35	20,99	0,19	0,54
1	9,60	0,32	20,24	0,24	0,75
2	9,53	0,32	20,67	0,43	1,34
3	9,35	0,37	20,16	0,46	1,24
4	9,09	0,52	19,76	0,55	1,06
5	8,00	0,63	17,95	1,00	1,59
6	5,95	0,99	15,08	1,48	1,49
7	5,10	1,07	14,23	1,63	1,52
8	4,74	1,16	13,6	2,09	1,80
9	4,69	1,17	12,81	2,38	2,03
10	4,61	1,20	11,71	2,45	2,04
11	4,58	1,21	11,55	2,63	2,17
12	4,50	1,22	11,57	2,26	1,85
13	4,48	1,10	11,59	2,25	2,05
14	4,48	1,06	11,67	1,76	1,66
15	4,49	1,09	11,67	1,88	1,72
16	4,50	1,09	11,63	1,85	1,70
17	4,49	1,12	11,39	1,56	1,39
18	4,48	1,15	11,31	1,75	1,52
19	4,48	1,13	11,23	1,91	1,69
20	4,48	1,07	11,43	1,86	1,74
21	4,48	1,14	11,31	1,51	1,32
22	4,48	1,10	11,19	1,81	1,65
23	4,46	1,03	10,4	1,90	1,84
24	4,46	1,08	9,59	1,45	1,34

Neste ensaio foram consumidos 54,31% do açúcar adicionado no começo da fermentação, porém os valores de atividade de enterocina e biomassa não foram os maiores observados nos ensaios conduzidos com *E. faecium*.

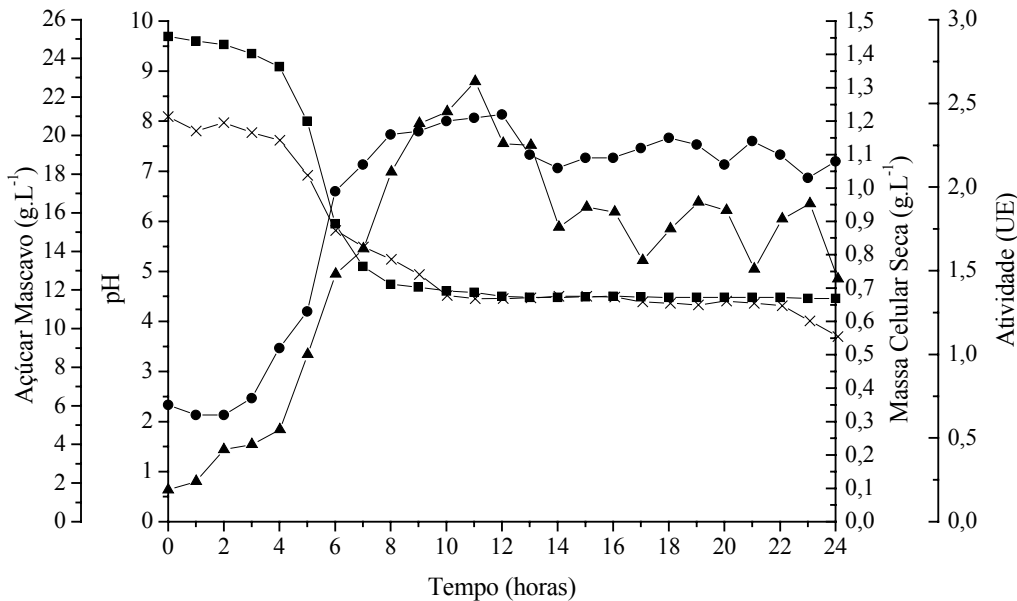


Figura 5.7 - Valores de pH (■), massa celular seca (●), concentração de açúcar mascavo (×) e atividade de enterocina (▲) por *E. faecium* em fermentador de bancada sem agitação, utilizando açúcar mascavo e pH_{inicial} 10,0 (Ensaio 5)

Em 12h de incubação ocorreu formação de 1,22g.L⁻¹ de biomassa e ao término da fermentação (24h) foi encontrado no meio fermentado apenas 1,08g.L⁻¹, porém este valor foi superior ao produzido nos frascos Erlenmeyers 0,76g.L⁻¹, com o mesmo tempo de fermentação. Neste ensaio foi observada uma relação direta entre a formação de biomassa e produção de enterocina.

A atividade de enterocina em 11h foi a máxima observada neste ensaio, com um valor de 1,63UE e em 24h, 1,45UE. Os valores foram inferiores ao encontrado no ensaio 15, que foi conduzido nas mesmas condições que nos frascos Erlenmeyers. O pH variou de 9,69 a 4,46 e a mesma relação entre pH e atividade de enterocina dos ensaios 1 e 2 foi observada neste ensaio.

Todos os resultados obtidos no ensaio 6 são mostrados na Tabela 5.13, este ensaio foi feito com *E. faecalis*, agitação de 200rpm, açúcar mascavo e pH_{inicial} 10,0.

Tabela 5.13 - Valores de pH, massa celular seca (g.L^{-1}), concentração de açúcar (g.L^{-1}), atividade de enterocina (UE) e atividade específica (UE.L.g^{-1}) durante a produção de enterocina por *E. faecalis* em fermentador de bancada com agitação de 200rpm, utilizando açúcar mascavo e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 10,0 (Ensaio 6)

Tempo (h)	pH	Massa Celular Seca (g.L^{-1})	Concentração de Açúcar (g.L^{-1})	Atividade (UE)	Atividade Específica (UE.L.g^{-1})
0	9,60	0,32	20,87	0,00	0,00
1	9,54	0,35	20,55	0,00	0,00
2	9,48	0,36	18,82	0,26	0,72
3	9,39	0,38	18,94	0,22	0,58
4	9,11	0,53	18,62	0,75	1,42
5	8,18	0,62	18,15	0,85	1,37
6	6,77	1,05	16,90	0,81	0,77
7	5,42	1,31	13,92	0,90	0,69
8	4,96	1,36	13,90	0,76	0,56
9	4,84	1,37	13,70	0,85	0,62
10	4,74	1,40	13,52	0,81	0,58
11	4,70	1,39	13,17	0,87	0,63
12	4,67	1,43	13,11	1,30	0,91
13	4,69	1,49	13,37	1,20	0,81
14	4,64	1,43	13,37	0,67	0,47
15	4,63	1,44	13,21	0,69	0,48
16	4,63	1,43	13,19	0,61	0,43
17	4,64	1,42	13,25	0,76	0,54
18	4,63	1,41	13,01	0,80	0,57
19	4,64	1,42	13,07	0,81	0,57
20	4,63	1,43	12,97	1,10	0,77
21	4,64	1,43	12,4	0,91	0,64
22	4,64	1,49	13,09	0,88	0,59
23	4,64	1,49	12,83	0,77	0,52
24	4,64	1,47	12,54	0,78	0,53

Aproximadamente 40% do açúcar foi consumido durante a fermentação no fermentador de bancada e nos frascos Erlenmeyers o consumo foi de 43%. A biomassa produzida entre 9 e 24h permaneceu praticamente constante, sendo que os valores variaram entre 1,37 a 1,49g.L⁻¹ neste período. Nos frascos Erlenmeyers a massa celular seca chegou a 2,04g.L⁻¹, sendo o maior valor observado para as fermentações com *E. faecalis*.

A atividade de enterocina após 12h foi de 1,30UE sendo este o valor máximo alcançado durante toda a fermentação. Em 24h foi observado 0,78UE no fermentador de bancada e para o mesmo tempo de incubação e nas mesmas condições de cultivo nos frascos Erlenmeyers 1,68UE, o maior valor encontrado utilizando o *E. faecalis* como microrganismo produtor.

A Figura 5.8 representa as curvas características dos resultados do ensaio 6 em fermentador de bancada. As curvas de pH e biomassa indicam uma relação direta entre o declínio do pH e aumento da formação de biomassa. A partir de 8h de fermentação, os valores de pH e biomassa permaneceram praticamente constantes até o final da fermentação.

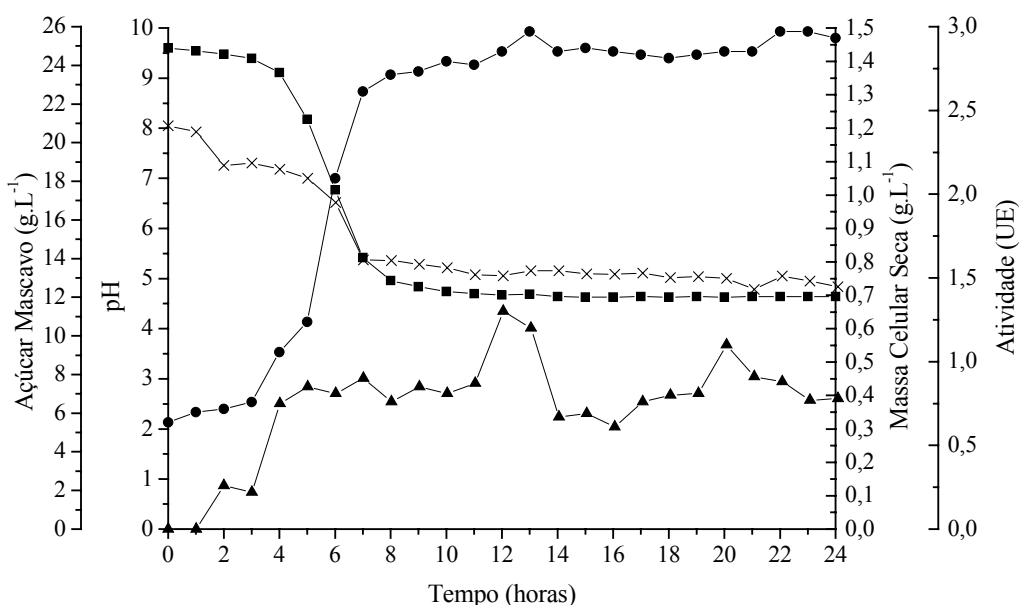


Figura 5.8 - Valores de pH (■), massa celular seca (●), concentração de açúcar mascavo (×) e atividade de enterocina (▲) por *E. faecalis* em fermentador de bancada com agitação, utilizando açúcar mascavo e pH_{inicial} 10,0 (Ensaio 6)

Avaliando-se todos os resultados de atividade específica dos ensaios feitos no fermentador de bancada pôde-se observar que nos ensaios 1 (tempo 21h) e 5 (tempo 11) o maior valor de atividade de enterocina e atividade específica foram observados para o mesmo tempo de fermentação. Nestes ensaios as condições de pH_{inicial} , agitação, fonte de carbono e tempo de fermentação fornecem o maior valor de atividade de enterocina e também o maior rendimento de atividade de enterocina por célula.

Para os ensaios 2, 3, 4 e 6 não foi observada a melhor atividade de enterocina e maior atividade específica para o mesmo tempo de fermentação. Apesar disto, vale ressaltar que as condições de melhor atividade de enterocina (pH_{inicial} , agitação, fonte de carbono e tempo de fermentação) devem ser usadas para posterior obtenção de enterocina, pois no volume total de fermentação houve uma maior produção de enterocina nestas condições.

Na Tabela 5.14 é possível verificar os valores de consumo de açúcar ($g.L^{-1}$ e %) nos ensaios para produção de enterocina em fermentador de bancada entre o tempo inicial e final de fermentação.

Tabela 5.14 – Consumo de açúcar ($g.L^{-1}$ e %) verificado nos ensaios para produção de enterocina em fermentador de bancada entre o tempo inicial e final de fermentação (0 e 24h)

Ensaio	Consumo ($g.L^{-1}$)	Consumo %
1	8,58	34,72
2	8,55	41,40
3	3,84	16,79
4	9,86	43,40
5	11,4	54,31
6	8,33	39,91

Avaliando os resultados da Tabela 5.14 pode-se observar que, em todos os ensaios, o maior consumo foi de 54,31% (ensaio 5). Porém de acordo com OGRODOWSKI (2001) concentrações menores que 20g.L^{-1} adicionadas no início da fermentação fazem com que a produção de enterocina seja menor.

OGRODOWSKI (2001) estudou a influência da concentração de sacarose em frascos Erlenmeyers utilizando *E. faecium*. Para isto foram feitas fermentações com meio basal em diferentes concentrações de sacarose, de 10 a 150g.L^{-1} . Para as concentrações de 20 a 150g.L^{-1} os valores de atividade foram elevados e não tiveram variações significativas entre eles. A exceção foi o ensaio com concentração de 10g.L^{-1} , no qual a atividade foi de 2,08UE, enquanto que para as demais concentrações de sacarose foram superiores a 2,55UE. Foi observada também uma tendência indicando que, quanto maior a concentração inicial de sacarose menor é o seu consumo em valores relativos (%), possivelmente devido ao excesso de sacarose que pode conduzir à inibição pelo substrato.

Analizando os 6 ensaios feitos em fermentador de bancada pode-se observar que somente no ensaio 5 ocorreu uma relação entre a formação de biomassa e produção de enterocina.

Nos ensaios 1, 2 e 5 foi observado o mesmo comportamento em relação ao pH e atividade de enterocina, ou seja, na medida em que o pH diminuiu ocorreu aumento da atividade de enterocina.

LEROY e DE VUYST (2002) encontraram que o pH influencia o crescimento celular e a produção da enterocina produzida por *E. faecium* RZS C5. A máxima atividade de enterocina no sobrenadante foi alcançada no final da fase de crescimento logarítmico seguida de declínio durante a fase estacionária.

HERRANZ et al. (2001) observaram que a máxima atividade antimicrobiana foi obtida no final da fase de crescimento logarítmico (12h após a inoculação) quando o pH do meio baixou para 4,4. Durante a fase estacionária houve uma diminuição rápida da atividade de enterocina.

A produção de enterocina por *E. casseliflavus* IM 416K1 é dependente da fase de crescimento da bactéria, pois em 4h de incubação, no começo da fase de crescimento

logarítmico, se inicia a produção de enterocina e após 14h (começo da fase estacionária) foi encontrada a atividade máxima (SABIA et al., 2002). Nos trabalhos de VILLANI et al. (1993) e LOSTEINKIT et al. (2001) as enterocinas 226NWC (*E. faecalis* 226) e N15 (*E. faecium* N15) foram produzidas continuamente durante a fase de crescimento exponencial e a máxima atividade foi obtida no final da fase de crescimento exponencial. Posteriormente a produção diminuiu, possivelmente devido às proteases extracelulares produzidas pela bactéria.

A produção de enterocina por *E. faecium* FAIR-E 198 em meio MRS foi detectada no começo da fase exponencial de crescimento com um pico de atividade na metade desta fase. No final da fase logarítmica e durante a fase estacionária, a produção de bacteriocina diminuiu rapidamente. Diversos mecanismos têm sido responsabilizados por este declínio, tais como, agregação de proteínas, degradação proteolítica por enzimas específicas e adsorção das bacteriocinas nas células produtoras (SARANTINOPOULOS et al., 2002).

DU TOIT et al. (2000) observaram a produção de enterocina durante o começo da fase exponencial de crescimento e a máxima atividade no começo da fase estacionária. Em seguida houve um declínio da atividade, sendo que este fato pode ser explicado pela degradação pelas proteases, pH baixo da cultura ou readsorção à superfície das células produtoras.

A máxima atividade da enterocina EFS2 produzida por *E. faecalis* EFS2 foi encontrada no começo da fase estacionária (MAISNIER-PATIN et al., 1996). Já a produção da enterocina Bc-48 (*E. faecalis* ssp. *liquefaciens*) e da enterocina 1146 (*E. faecium* DPC1146) ocorreram durante a fase de crescimento logarítmico, mas cessaram quando a cultura alcançou a fase estacionária (LÓPEZ-LARA et al., 1991; PARENTE e RICCIARDI, 1994).

Comparando os resultados de atividade obtidos no fermentador de bancada com as fermentações feitas em frascos Erlenmeyers, pode-se afirmar que com exceção dos ensaios 1 e 2, em todos os outros ensaios a atividade de enterocina foi superior nos frascos Erlenmeyers.

YANG e RAY (1994) avaliaram a produção de quatro bacteriocinas (nisina, pediocina, leuconocina e sakacina), sendo observado que a atividade foi maior no

fermentador (Biostat M) com controle de pH do que nos frascos Erlenmeyers sem controle de pH, e em todos os casos as condições que propiciaram altas produções celulares também propiciaram altas produções de bacteriocinas.

5.3. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE ENTEROCINA UTILIZANDO *Listeria monocytogenes* Scott A COMO MICRORGANISMO TESTE

Com objetivo de determinar a atividade das enterocinas produzidas pelo *E. faecium* e *E. faecalis* utilizando a *Listeria monocytogenes* Scott A como microrganismo teste, foram feitos alguns testes para verificar sua eficácia, conforme descrito no item 4.6.5.

Os sobrenadantes utilizados foram obtidos das fermentações em fermentador de bancada após 24h de incubação, nas condições dos ensaios 5 e 6, sendo o *E. faecium* e o *E. faecalis* os microrganismos produtores, respectivamente.

Foram avaliados dois tipos de sobrenadante, um pasteurizado e outro não, mas nos dois casos o pH foi acertado para 6,5. As condições de pasteurização foram 4min a 80°C e esta etapa foi feita a fim de eliminar as células que não foram separadas durante a centrifugação, descartando a possibilidade de interferência destas durante a determinação de atividade.

De acordo com a Tabela 4.7 foram feitos três testes de determinação de atividade de enterocina a fim de avaliar se as quantidades de enterocina adicionadas eram suficientes para inibir a *Listeria*.

A Tabela 5.15 mostra os resultados dos testes I, II e III de determinação de atividade de enterocina produzida por *E. faecium*; com e sem pasteurização do sobrenadante, durante um tempo total de 6h de incubação com amostras a cada 1h e na Figura 5.9 estão representados estes valores.

Tabela 5.15 – Valores de atividade de enterocina de *E. faecium* (UE) dos testes I, II e III usando como microrganismo teste *L. monocytogenes* Scott A, com e sem pasteurização do sobrenadante, durante tempo total de 6h de incubação

Tempo (h)	Teste I SP	Teste I CP	Teste II SP	Teste II CP	Teste III SP	Teste III CP
	Atividade de Enterocina (UE)					
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0,57	0,69	1,25	1,20	1,16	1,13
4	2,34	2,36	2,66	2,98	3,08	3,28
5	2,20	2,36	3,24	3,40	3,57	3,65
6	2,24	2,68	3,25	3,64	3,45	3,91

SP – sem pasteurização do sobrenadante que contém a enterocina

CP – com pasteurização do sobrenadante que contém a enterocina (80°C, 4min)

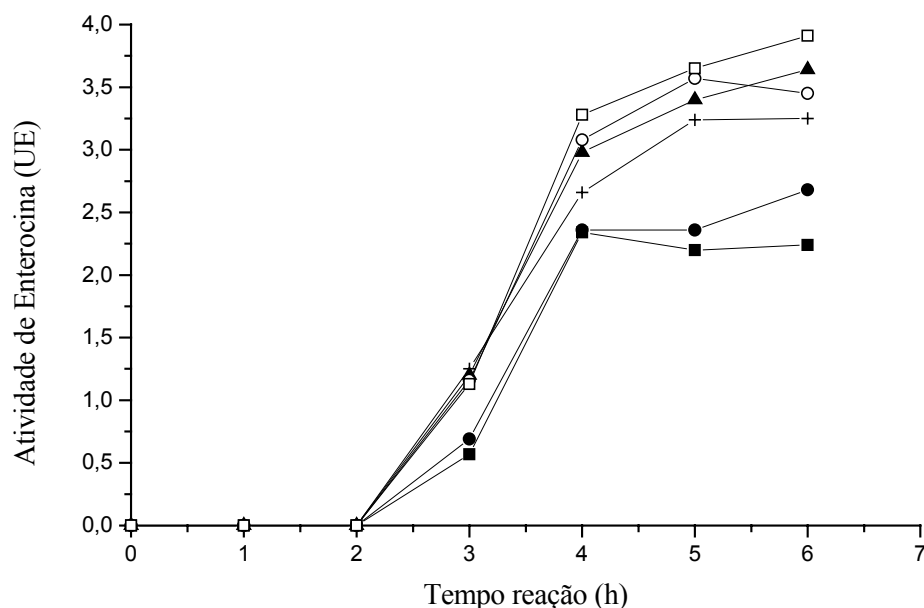


Figura 5.9 – Atividade de enterocina dos testes I, II e III utilizando enterocina produzida por *E. faecium*, com (CP) e sem (SP) pasteurização do sobrenadante, durante tempo total de 6h de incubação. Teste I SP (■), teste I CP (●), teste II SP (+), teste II CP (▲), teste III SP (○) e teste III CP (□)

Analisando-se os resultados da Tabela 5.15 e Figura 5.9 verifica-se que, com exceção dos testes II e III em 3h de incubação, todos os resultados obtidos com sobrenadante pasteurizado forneceram valores de atividade de enterocina superiores aos com sobrenadante não pasteurizado. As células do microrganismo produtor que não foram separadas durante a centrifugação interferiram na determinação de atividade de enterocina, por isso o sobrenadante deve ser pasteurizado por 4min a 80°C.

YANG et al. (1992) após o acerto do pH em 6,5, utilizaram aquecimento do meio fermentado por 25min a 70°C com objetivo de matar as células. Posteriormente, o meio foi centrifugado por 15min para separar as células do sobrenadante.

YANG e RAY (1994) utilizaram o aquecimento das culturas a 75°C por 15min a fim de matar as células do microrganismo produtor da enterocina.

DU TOIT et al. (2000) e FRANZ et al. (1996) conduziram a separação das células para determinação de atividade de enterocina de modo diferente. O meio fermentado foi centrifugado 14000rpm por 10min e o sobrenadante teve o pH ajustado em 6,5-7,0 com NaOH, e após estes procedimentos as células remanescentes foram inativadas com aquecimento a 100°C por 5min.

No que diz respeito ao tempo de incubação para determinação da atividade de enterocina, os melhores resultados foram obtidos no tempo de 6h e o comportamento da atividade ao longo do tempo poderia ter sido verificado através da incubação por um período de tempo maior.

Pôde-se verificar que a quantidade de enterocina adicionada no método descrito no item 4.6.4, ou seja, 2mL de sobrenadante, foi capaz de promover a inibição do microrganismo teste (*L. monocytogenes* Scott A). Na Figura 5.9 observa-se que a quantidade de enterocina adicionada durante os testes foi diretamente proporcional à atividade de enterocina encontrada durante a determinação de atividade, utilizando uma modificação do procedimento descrito por BERRIDGE e BARRET (1952).

Os resultados dos testes I, II e III de determinação de atividade de enterocina produzida por *E. faecalis* estão mostrados na Tabela 5.16. Foram feitas determinações a cada 1h durante um tempo total de 6h de incubação dos sobrenadantes com e sem

pasteurização. Nas curvas da Figura 5.10 estão representados os resultados da Tabela 5.16, as quais descrevem o comportamento característico de cada teste.

Da mesma forma que ocorreu com o sobrenadante do *E. faecium*, os melhores resultados de atividade foram obtidos com o sobrenadante pasteurizado, confirmando o fato de que algumas células do microrganismo produtor possivelmente não foram separadas durante a centrifugação e afetaram a determinação de atividade de enterocina. Comparando os resultados de atividade das Tabelas 5.15 e 5.16, observa-se que a diferença entre os valores de atividade, utilizando sobrenadante pasteurizado e não pasteurizado, foi muito maior quando o *E. faecalis* foi o microrganismo produtor da enterocina testada.

Para o sobrenadante sem pasteurização a maior atividade foi observada após 5h, sendo que até 4h de incubação nenhuma atividade havia sido detectada. Já para o sobrenadante pasteurizado os maiores resultados foram encontrados em 6h e um tempo maior de incubação poderia ser usado.

Tabela 5.16 – Valores de atividade de enterocina de *E. faecalis* (UE) dos testes I, II e III usando como microrganismo teste *L. monocytogenes* Scott A, com e sem pasteurização do sobrenadante, durante tempo total de 6h de incubação

Tempo (h)	Teste I SP	Teste I CP	Teste II SP	Teste II CP	Teste III SP	Teste III CP
	Atividade de Enterocina (UE)					
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0,54	0	1,17	0	1,19
4	0	1,89	0	3,00	0	3,24
5	0,92	2,23	1,18	3,25	1,71	3,95
6	0,76	2,66	1,05	3,59	1,50	4,15

SP – sem pasteurização do sobrenadante que contém a enterocina

CP – com pasteurização do sobrenadante que contém a enterocina (80°C, 4min)

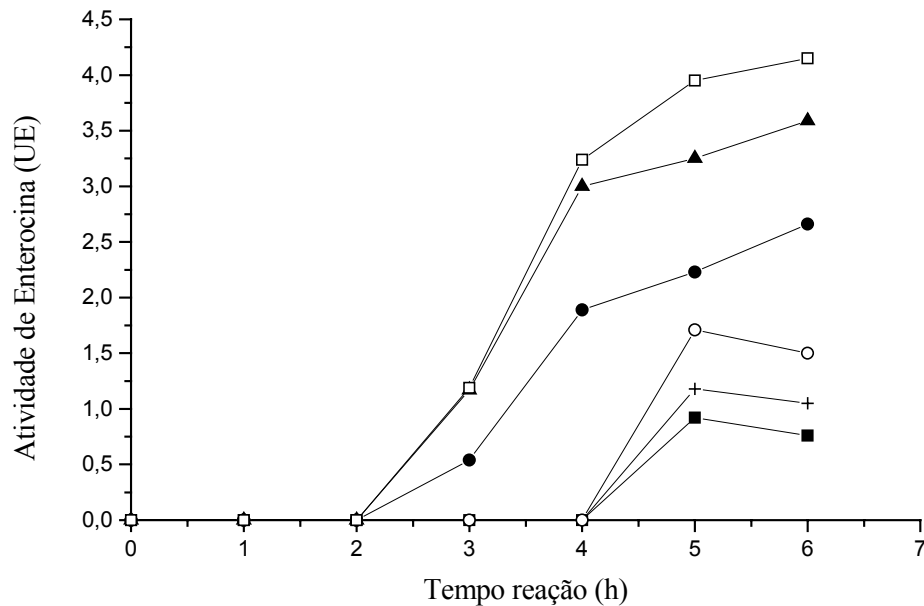


Figura 5.10 – Atividade de enterocina dos testes I, II e III utilizando enterocina produzida por *E. faecalis*, com (CP) e sem (SP) pasteurização do sobrenadante, durante tempo total de 6h de incubação. Teste I SP (■), teste I CP (●), teste II SP (+), teste II CP (▲), teste III SP (○) e teste III CP (□)

A quantidade de enterocina produzida por *E. faecalis* adicionada durante a determinação de atividade é proporcional à atividade de enterocina observada nos testes I, II e III.

As enterocinas produzidas por *E. faecium* e *E. faecalis* são capazes de inibir o crescimento da *L. monocytogenes* Scott A. O teste I é uma modificação do procedimento descrito por BERRIDGE e BARRET (1952), e consegue detectar a atividade das enterocinas testadas, não sendo necessário adicionar quantidades maiores de sobrenadante como nos testes II e III. Tempos maiores de incubação durante a determinação da atividade de enterocina poderiam ser testados, com o objetivo de verificar o comportamento da atividade por um período de tempo maior.

MINAHK et al. (2000) verificaram que após 30min da adição da enterocina CRL35 em *L. monocytogenes* houve um decréscimo de aproximadamente 100% na contagem de UFC.mL⁻¹ e este acompanhamento foi feito apenas até 60min de incubação.

5.4. PURIFICAÇÃO PARCIAL DAS ENTEROCINAS

Através do método utilizado para a purificação parcial das enterocinas, descrito no item 4.6.6, foram obtidos três sobrenadantes. Cada sobrenadante foi separado durante as etapas da purificação e congelado para posterior determinação da atividade de enterocina.

Os meios fermentados utilizados para a realização da purificação parcial foram obtidos dos ensaios 3 e 4, feitos no fermentador de bancada Bioflo III e após 24h de incubação.

No ensaio 3 o *E. faecalis* foi o microrganismo produtor de enterocina e no ensaio 4, o *E. faecium*. O sobrenadante (1) foi obtido após a primeira centrifugação, o (2) após a lavagem das células com tampão fosfato pH 6,5 e centrifugação e o (3) após lavagem das células com tampão fosfato pH 2,0 e centrifugação. A Tabela 5.17 mostra os resultados obtidos para atividade de enterocina dos sobrenadantes obtidos durante as etapas de purificação parcial das enterocinas.

Tabela 5.17 – Valores de atividade de enterocina (UE) dos sobrenadantes obtidos durante as etapas de purificação parcial das enterocinas produzidas por *E. faecium* e *E. faecalis* em fermentador de bancada, nos ensaios 4 e 3, respectivamente

Sobrenadante	Enterocina <i>E. faecium</i>	Enterocina <i>E. faecalis</i>
	Atividade de Enterocina (UE)	
1	1,82	0,98
2	0,64	0,72
3	0,00	0,70

O extrato bruto da enterocina produzida por *E. faecium*, ou seja, sem ter passado por nenhuma etapa da purificação, apenas com acerto do pH e centrifugação, apresentou atividade de 1,18UE após 24h de incubação, valor inferior ao sobrenadante (1) e superior aos sobrenadantes (2) e (3). Já o extrato bruto da enterocina produzida por *E. faecalis* apresentou atividade de 0,28UE, valor este menor que qualquer um dos sobrenadantes

obtidos durante a purificação parcial. Como era esperado o sobrenadante (1) das duas enterocinas utilizadas foi o que apresentou atividade maior.

Após a precipitação com sulfato de amônio da solução composta dos três sobrenadantes foi obtido um precipitado, sendo este resuspenso em tampão fosfato de sódio pH 6,5 e esta solução dialisada. Porém com a enterocina produzida por *E. faecium* não ocorreu precipitação com sulfato de amônio. Para a enterocina de *E. faecalis*, após a diálise, a solução que ficou dentro do saco de diálise foi centrifugada e o precipitado obtido apresentou uma atividade de 0,58UE e o sobrenadante 0,82UE.

Com base nos resultados obtidos, pode-se dizer que seria necessário realizar a purificação parcial em outros extratos brutos a fim de definir quais etapas não são necessárias durante o procedimento de purificação.

Outros métodos de purificação de bacteriocinas descritos na bibliografia podem ser testados com objetivo de comparar a eficiência de cada método e concluir qual é o mais indicado para enterocinas produzidas por *E. faecium* e *E. faecalis*.

Vários autores tais como, DU TOIT et al. (2000), MINAHK et al. (2000) e VILLANI et al. (1993) utilizaram a precipitação com sulfato de amônio para obter a enterocina parcialmente purificada. A etapa de diálise deve ser feita para eliminar o sulfato de amônio adicionado durante a purificação e outras proteínas que tenham precipitado juntamente com as enterocinas.

6. CONCLUSÕES

Através da análise dos ensaios feitos em frascos Erlenmeyers pode-se concluir que:

- utilizando o *E. faecium* como microrganismo produtor o melhor resultado para atividade de enterocina (2,81UE) e o consumo de substrato mais elevado (36,79%) foram observados no ensaio 13. As condições de cultivo foram pH_{inicial} 10,0, sem agitação e com sacarose como fonte de carbono. O pH_{final} chegou a 4,87 e 0,72g.L⁻¹ de massa celular seca foram encontrados após 24h de incubação. A máxima produção de massa celular seca foi observada no ensaio 16 (pH_{inicial} 10,0, 200rpm e açúcar mascavo) com um valor de 1,19g.L⁻¹;

- para o *E. faecalis*, como microrganismo produtor, no ensaio 32, conduzido com pH_{inicial} 10,0, 200 rpm de agitação e com açúcar mascavo como fonte de carbono, foram obtidos os maiores valores de atividade de enterocina de 1,68UE, maior consumo de substrato (43,33%) e maior produção de massa celular seca (2,04g.L⁻¹) com pH_{final} foi de 4,72.

Com relação aos quatro ensaios feitos em fermentador de bancada com *Enterococcus faecium* como microrganismo produtor conclui-se que:

- no ensaio 1 conduzido com pH_{inicial} 10,0, agitação de 200rpm e sacarose como fonte de carbono foi observado maior valor de atividade de enterocina de 2,94UE após 21h de incubação;

- o maior consumo de substrato entre os tempos inicial e final de fermentação (54,31%) foi encontrado no ensaio 5 (pH_{inicial} 10,0, sem agitação e açúcar mascavo);

- após 23h de fermentação foi observada máxima produção de massa celular seca com valor de 1,39g.L⁻¹, sendo as condições de cultivo de pH_{inicial} 10,0, sem agitação e com sacarose como fonte de carbono.

No fermentador de bancada utilizando o *E. faecalis* como microrganismo produtor foram feitos dois ensaios e os melhores resultados foram:

- atividade de enterocina de 1,30UE (em 12h), consumo de açúcar de 39,91% e máxima produção de massa celular seca de 1,49g.L⁻¹ (em 13, 22 e 23h de incubação), sendo todos estes resultados obtidos no ensaio 6 conduzido com pH_{inicial} 10,0, agitação de 200rpm e com açúcar mascavo como fonte de carbono.

Com relação aos testes feitos para a determinação de atividade de enterocina utilizando *L. monocytogenes* Scott A como microrganismo teste conclui-se que:

- nos sobrenadantes pasteurizados contendo as enterocinas produzidas por *E. faecium* e *E. faecalis* foram obtidos resultados de atividade de enterocina superiores em relação aos sobrenadantes sem pasteurização, por isso após a separação do sobrenadante do meio de cultura o sobrenadante deve ser pasteurizado antes da determinação da atividade de enterocina;
- em 6h de incubação foram observados os maiores resultados de atividade de enterocina em todos os sobrenadantes pasteurizados;
- a quantidade de enterocina adicionada é proporcional a atividade de enterocina encontrada;
- as enterocinas produzidas por *E. faecium* e *E. faecalis* são capazes de inibir o crescimento da *L. monocytogenes* Scott A;
- o teste I, uma modificação do procedimento descrito por Berridge e Barret (1952), consegue detectar a atividade das enterocinas testadas.

O método de purificação parcial de enterocina utilizado não forneceu resultados satisfatórios, por isso seria necessário realizá-lo em outros extratos brutos a fim de definir quais etapas são necessárias durante o procedimento de purificação.

O sulfato de amônio precipitou a enterocina produzida por *E. faecalis*, mas não precipitou a enterocina de *E. faecium*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 169-185, 1995.

AUDISIO, M. C.; OLIVER, G.; APELLA, M. C. Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, n. 3, p. 235-241, 2001.

AYMERICH, M. T.; GARRIGA, M.; COSTA, S.; MONFORT, J. M.; HUGAS, M. Prevention of ropiness in cooked pork by bacteriocinogenic cultures. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2/3, p. 239-246, 2002.

BARNBY-SMITH, F. M. Bacteriocins: applications in food preservation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 3, n. 6, p. 133-136, 1992.

BERRIDGE, N. J., BARRET, J. A. A rapid method for the turbidimetric assay of antibiotics. **Journal General of Microbiology**, n. 6, p. 14-20, 1952.

CABO, M. L.; MURADO, M. A.; GONZÁLEZ, M. P.; PASTORIZA, L. A method for bacteriocin quantification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 6, p. 907-914, 1999.

CALLEWAERT, R.; HUGAS, M.; DE VUYST, L. Competitiveness and bacteriocin production of *Enterococci* in the production of Spanish-style dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, n. 1/2, p. 33-42, 2000.

CAROLISSEN-MACKAY, V.; ARENDSE, G.; HASTINGS, J. W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 1-16, 1997

CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; FERNANDEZ, M. F.; HERNANDEZ, P. E. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against

spoilage and foodborne pathogenic bacteria. **Food Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 289-298, 1998.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. **Bacteriocins of lactic acid bacteria – microbiology, genetics e applications**. London, Blackie Academic e Professional, 1994, 1ª edição, 539 p.

DOI, K.; EGUCHI, T.; CHOI, S.; IWATAKE, A.; OHMOMO, S.; OGATA, S. Isolation of enterocin SE-K4 encoding plasmid and a high enterocin SE-K4 producing strain of *Enterococcus faecalis* K-4. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 4, p. 434-436, 2002.

DU TOIT, M.; FRANZ, C. M. A. P.; DICKS, L. M. T.; HOLZAPFEL, W. H. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 482-494, 2000.

ENNAHAR, S.; AOUDÉ-WERNER, D.; ASSOBBEL, O.; HASSEIMANN, C. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 521-526, 1998.

ENNAHAR, S.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 6, p. 705-716, 1999.

ENNAHAR, S.; ASOU, Y.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 291-301, 2001.

FLÔRES, S. M. **Estudo da Produção de Bioconservante Nisina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis***. 2000. 100 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de

Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

FRANCO, B. D. G. M. e LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, 1996, 182 p.

FRANZ, C. M. A. P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. Production and characterization of enterocina 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, n. 2/3, p. 255-270, 1996.

GÁLVEZ, A.; VALDIVIA, E.; MARTÍNEZ, M.; MAQUEDA, M. Bactericidal action of peptide antibiotic AS-48 against *Escherichia coli* K-12. **Canadian Journal Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 318-321, 1989.

GIRAFFA, G. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. **Food Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 291-299, 1995a.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; TARELLI, G. T. Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 7C5. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 6, p. 621-623, 1995b.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2/3, p. 215-222, 2003.

GUERRA, M. M. M. e BERNARDO, F. M. A. Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96, n. 538, p. 65-69, 2001.

HERRANZ, C.; CASAUS, P.; MUKHOPADHYAY, S.; MARTÍNEZ, J. M.; RODRÍGUEZ, J. M.; NES, I. F.; HERNÁNDEZ, P. E.; CINTAS, L. M. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages production the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. **Food Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 115-131, 2001.

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**, v. 24, n. 3, p. 343-362, 1995.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M. T. Functionality of enterococci in meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2/3, p. 223-233, 2003.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiological Letters**, v. 12, n. 1/3, p. 39-86, 1993.

LAUKOVÁ, A.; CZIKKOVÁ, S.; LACZKOVÁ, S.; TUREK, P. Use of enterocin CCM 4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated dry fermented Hornád salami. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, n. 1/2, p. 115-119, 1999a.

LAUKOVÁ, A.; CZIKKOVÁ, S.; DOBRANSKY, T.; BURDOVA, O. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milk products. **Food Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 93-99, 1999b.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 1/2, p. 155-169, 2002.

LÓPEZ-LARA, I.; GÁLVEZ, A.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; MAQUEDA, M.; VALDIVIA, E. Purification, characterization, and, biological effects of a second bacteriocin from *Enterococcus faecalis* spp. *liquefaciens* S-48 and its mutant strain B-48-28. **Canadian Journal Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 769-774, 1991.

LOSTEINKIT, C.; UCHIYAMA, K.; OCHI, S.; TAKAOKA, T.; NAGAHISA, K.; SHIOYA, S. Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of related genes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 4, p. 390-395, 1995.

LYON, W. J.; OLSON, D. G.; MURANO, E. A. Isolation and purification of enterocin EL1, a bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecium*. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 8, p. 890-898, 1995.

MAISNIER-PATIN, S.; FORNI, E.; RICHARD, J. Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 255-270, 1996.

McKAY, A. M. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* against *Listeria* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 15-17, 1990.

MINAHK, C. J.; FARIAS, M. E.; SESMA, F.; MORERO, R. D. Effect of enterocin CRL35 on *Listeria monocytogenes* cell membrane. **FEMS Microbiology Letters**, v. 192, n. 1, p. 79-83, 2000.

MORENO, M. R. F.; REA, M. C.; COGAN, T. M.; DE VUYST, L. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 73-84, 2003.

MURIANA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection**, supplement, p. 54-63, 1996.

NUÑEZ, M.; RODRÍGUEZ, J. L.; CARCÍA, E.; GAYA, P.; MEDINA, M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 671-677, 1997.

OGRODOWSKI, R. **Estudo da Produção de Bacteriocina por *Enterococcus faecium* em Fermentação Submersa**. 2001. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

OLASUPO, N. A.; SCHILLINGER, U.; FRANZ, C. M. A.; HOLZAPFEL, W. H. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from ‘wara’- a fermented skimmed

cow milk product from West Africa. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 438-441, 1994.

OLASUPO, N. A.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. Studies on some technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from Nigerian fermented foods. **Food Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 157-167, 2001.

PARENTE, E. e HILL, C. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 4, p. 290-298, 1992a.

PARENTE, E. e HILL, C. Characterization of Enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 7, p. 497-502, 1992b.

PARENTE, E. e HILL, C. Inhibition of *Listeria* in buffer, broth and milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 7, p. 503-508, 1992c.

PARENTE, E. e RICCIARDI, A. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 12-15, 1994.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Pelotas: Editora Universitária-UFPel, 1996. v.1, 344p.

RODRÍGUEZ, E.; GONZÁLEZ, B.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 1/2, p. 7-15, 2000.

SABIA, C.; MANICARDI, G.; MESSI, P.; NIEDERHÄUSERN, S.; BONDI, M. Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseiflavus* IM 416 K1 isolated from Italian sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, n. 1/2, p. 163-170, 2002.

SAHL, H. G.; JACK, R. W.; BIERBAUM, G. Biosintesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. **European Journal of Biochemistry**, v. 230, n. 3, p. 827-853, 1995.

SARANTINOPOULOS, P.; LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M. D.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 1/2, p. 125-136, 2002.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 19, 1952.

VLAEMYNCK, G.; HERMAN, L.; COUDIZER, K. Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, n. 1/2, p. 211-225, 1994.

VILLANI, F.; SALZANO, G.; SORRENTINO, E.; PEPE, O.; MARINO, P.; COPPOLA, S. Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226 active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, n. 4, p. 380-381, 1993.

WACHSMAN, M. B.; FARÍAS, M. E.; TAKEDA, E.; SESMA, F.; HOLGADO, A. P. R.; TORRES, R. A.; COTO, C. E. Antiviral activity of enterocin CRL 35 against herpesviruses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, n. 4, p. 293-299, 1999.

YANG, R.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environment Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3355-3359, 1992.

YANG, R.; RAY, B. Factors influencing production of bacteriocins by acid lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 281-291, 1994.