UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós – Graduação em Tecnologia Bioquímico – Farmacêutica
Área de Tecnologia em fermentação

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

**Produção e Purificação de Nisina produzida por
Lactococcus lactis em Leite desnatado e Soro de
Leite**

Angela Faustino Jozala

Tese para obtenção do grau de
DOCTOR

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Thereza Christina Vessoni Penna

DEDALUS - Acervo - CQ

30100015686

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

J89p Jozala, Angela Faustino
Produção e purificação de nisina produzida por *Lactococcus lactis* em leite desnatado e soro de leite / Angela Faustino Jozala.
São Paulo, 2009.
125p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Verssoni Penna, Thereza Chistina

1. Microbiologia industrial 2. Produtos biotecnológicos:
Purificação I. T. II. Verssoni Penna, Thereza Chistina, orientador.

660.6 CDD

Angela Faustino Jozala

Produção e Purificação de Nisina produzida por *Lactococcus lactis* em
Leite desnatado e Soro de Leite

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 24/11/09 de _____.

DEDICATÓRIA

À Selma, Daniel e Décio, que são minha vida, meu
coração e alma

"Aquilo que se faz por amor está sempre além do bem e do mal"

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna, minha querida orientadora que por todos esses anos me auxiliou profissionalmente e pessoalmente. A profissional que me inspirou todos os dias por sua dedicação e amor pela ciência e pela vida.

Ao corpo administrativo do Departamento de Tecnologia Bioquímica- Farmacêutica, Elza, Juarez e Miriam por toda paciência e auxílio prestados a mim durante esses anos.

Aos técnicos do laboratório de microbiologia industrial Ricardo, Gkladson e Irene.

Aos colegas do semi-industrial.

Aos queridos alunos de iniciação científica que me ensinaram mais do que eu a eles, que me auxiliaram diretamente na elaboração desta tese: Maura, Gabriel, Stephanie, Cintia, Laís, Talita e Suelen. E aos demais alunos que trabalharam no laboratório e que tornaram os meus dias de trabalho mais agradáveis.

Às amigas que tanto compartilharam comigo durante esses anos, momentos de muita transpiração e inspiração Carolina, Priscila, Leticia e Luciana

À Leticia e Priscila por todo carinho, apoio, risadas e amizade.

Aos meus queridos amigos que estão a 9000 km além mar, mas apesar da distância fazem parte da minha vida.

Feliz é aquele que vê a felicidade dos outros sem ter inveja.
O sol para todos e a sombra pra quem merece.

Bíblia Sagrada

EPÍGRAFE

Hoje de manhã saí muito cedo

Hoje de manhã saí muito cedo,
Por ter acordado ainda mais cedo
E não ter nada que quisesse fazer...

Não sabia que caminho tomar
Mas o vento soprava forte, varria para um lado,
E segui o caminho para onde o vento me soprava nas costas.

Assim tem sido sempre a minha vida, e
Assim quero que possa ser sempre
Vou onde o vento me leva e não me
Sinto pensar.

Alberto Caeiro

Resumo

Jozala, A.F. **Produção e purificação de nisina produzida por *Lactococcus lactis* em leite desnatado e soro de leite**. 2009. 129f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O peptídeo antimicrobiano retratado neste trabalho é a nisina, produzido pela bactéria *Lactococcus lactis subsp. lactis*, um peptídeo estruturalmente composto por 34 aminoácidos, mostra um vasto espectro de atividade inibitória em microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e esporo formadores. O objetivo deste trabalho foi produzir a nisina a partir de células de *Lactococcus lactis* utilizando soro de leite e leite desnatado como meio de cultivo. Para tanto as células de *L. lactis* foram desenvolvidas em agitador rotacional (30°C/36 h/100 rpm) e a atividade de nisina, os parâmetros de crescimento e os componentes do meio de cultivo foram analisados. Em leite desnatado, contendo 2,27 g de sólidos totais, a atividade de nisina foi 20077,05 AU.mL⁻¹ sendo 3 vezes maior em relação ao leite desnatado com 4,54 g sólidos totais, 8739,77 AU.mL⁻¹; e foi 73 vezes maior em relação ao leite desnatado com 1,14 g sólidos totais, 273,21 AU.mL⁻¹. O soro de leite utilizado foi doado por uma indústria de laticínios, em laboratório parte do soro foi tratada de duas formas: (i) filtrado e (ii) esterilizado, e ambos foram utilizados para cultivo das células produtoras de nisina em agitador rotacional 30°C/36 h/100 rpm. Os resultados mostraram que o meio de cultivo composto por soro de leite não filtrado forneceu uma adaptação ao *L. lactis*, sendo a concentração de nisina obtida 1628 vezes maior que do soro de leite filtrado, 11120,13 e 6,83 mg.L⁻¹ respectivamente. Em relação à atividade de nisina contra Gram-negativos, aumentou-se o efeito bactericida quando adicionada ao EDTA. O comportamento da nisina no sistema micelar de duas fases aquosas foi investigado experimentalmente, demonstrando que a biomolécula alvo pode ser extraída tanto do meio fermentado complexo quanto das impurezas presentes na nisina comercial. Nos testes com o sistema micelar de duas fases aquosas, a nisina particionou, preferencialmente, para a fase rica em micelas (coeficiente de partição (K_{Nis}) maior que 1,5), ocorrendo um aumento de 1 ciclo logarítmico na concentração inicial de nisina comercial (10⁵ AU, no sistema). Este trabalho reúne os estudos desenvolvidos onde o principal objetivo foi a obtenção da nisina através de meios de cultivo alternativos, além de sua aplicação e purificação.

Palavras-chave: nisina, soro de leite, leite desnatado, purificação

Abstract

Jozala, A.F. **Nisin production and purification utilizing *Lactococcus lactis* in skimmed milk and milk whey.** 2009. 130f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Nisin is a natural antimicrobial peptide used as food preservative produced by *Lactococcus lactis*, that inhibits the outgrowth of spores, the growth of a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Applications of this bacteriocin include dental care products pharmaceutical products such as stomach ulcers and colon infection treatment and potencial birth control. This study aims to evaluate growth conditions for *L. lactis* as well as the effect in nisin production when utilizing milk whey and skimmed milk. *Lactococcus lactis* ATCC 11454 was developed in a rotatory shaker (30°C/36 h/100 rpm) in diluted skimmed milk and nisin expression, growth parameters and media components were also studied. Nisin expression in skimmed milk 2.27 g total solids (20077.05 AU.mL⁻¹) was up to 3-fold higher than transfers in skimmed milk 4.54 g total solids (8739.77 AU.mL⁻¹) and was up to 85-fold higher than transfers in skimmed milk 1.14 g total solids (273.21 AU.mL⁻¹). Milk whey, a byproduct from dairy industries, was utilized in two different ways (i) without filtration, autoclaved at 121°C for 30 min and (ii) filtrated (1.20 µm and 0.22 µm membrane filter), *L. lactis* was developed in a rotary shaker (30°C/36 h/100 rpm) and these cultures were transferred five times using 5 mL aliquots of broth culture for each new volume of the respective media. The results showed that culture media composed by milk whey without filtration was better for *L. lactis* in its adaptation than milk whey without filtration. Nisin titers, in milk whey without filtration, was 11120.13 mg.L⁻¹ in 2nd transfer, and up to 1628-fold higher than the filtrated milk whey, 6.83 mg.L⁻¹ in 1st transfer. Nisin activity was assayed by the agar diffusion method using *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 and a recombinant *Escherichia coli* DH5α expressing the recombinant green fluorescent protein (GFPuv) as the nisin-susceptible test organisms. Combining EDTA with nisin increased the bactericidal effect of nisin upon the bacteria examined. A potentially scalable and cost-effective way to purify commercial and biosynthesized in bioreactor nisin, including simultaneously removal of impurities and contaminants, increasing nisin activity, was studied (two phase micellar system). Results indicated that nisin partitions preferentially to the micelle rich-phase, despite the surfactant concentration tested, and its antimicrobial activity increases. Biological processing of byproducts (milk whey) can be considered one profitable alternative, generating high-valued bioproducts.

Key-words: nisin, milk whey, skimmed milk, purification

CONTEÚDO

Resumo-----	6
Abstract -----	7
Justificativa -----	11
Objetivo Principal -----	13
Objetivos específicos	13
1.Peptídeos antimicrobianos: Nisina -----	15
1.1. Regulamentação Toxicológica	16
1.2. Mecanismos de ação Nisina	17
1.3. Produção de Nisina.....	18
1.3.1 O leite e o soro de leite	20
1.4. Aplicação da Nisina	22
1.5. Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas	23
2. Referencias Bibliográficas -----	24
Capítulo II-----	33
1 Aspectos Gerais-----	35
2 Material e Métodos	35
2.1 Meio de cultivo e Inoculo	36
2.2 Processo Fermentativo	37
2.3 Procedimentos de análises	39
2.4 Concentração celular, de açúcares e proteínas totais	39
2.5 Atividade de nisina	40
3 Resultados e Discussão -----	41

3.1 Diluição do leite	41
3.2 Componentes do Leite na Formulação do Meio de Cultivo Artificial.....	45
4. Fermentação em bioreator	49
5. Conclusão	52
6 Referencias Bibliográficas	53

Capítulo III 55

1 Histórico	57
2. Materiais e Métodos	57
2.1 Cepas Bacterianas e meio de cultivo	57
2.2 Cultivo por batelada.....	57
2.3 Análise da Atividade de Nisina	58
3 Resultados e Discussão	59
4 Referências Bibliográficas	64

Capítulo IV 65

1 Justificativa.....	67
2 Materiais e Métodos	67
2.1 Materiais	67
2.2 Produção de nisina em fermentador	67
2.3 Determinação da concentração de nisina pelo método de difusão em ágar	67
2.4 Determinação do diagrama de fases do sistema TX114/tampão	69
2.5 Determinação da influência do tensoativo TX114 na atividade de nisina	70
2.6 Partição de nisina em sistema micelar de duas fases aquosas	70
3 Resultados	71
3.1. Partição de nisina em sistema micelar de duas fases aquosas	71

4. Conclusões	75
5 Referências Bibliográficas	76
 Capítulo V	78
1 Introdução.....	80
2 Materiais e Métodos	80
2.1 Preparação do microrganismo e do inóculo.....	80
2.2 Fermentação em batelada.....	81
2.3 Procedimentos analíticos	82
2.4 Detecção da atividade de nisina	82
3 Resultados e Discussão	85
3.1 Bactéria sensível e a associação entre nisina e EDTA	85
3.2 Fermentação	89
4 Referências Bibliográficas	93
 Capítulo VI	95
1 Introdução.....	97
2 Materiais e Métodos	97
2.1 Cepas Bacterianas e meio de cultivo	97
2.2 Cultivo por batelada.....	97
2.3 Análise da Atividade de Nisina	98
3 Resultados e Discussão	99
4 Referências Bibliográficas	107
Conclusões Gerais.....	109

Justificativa

Produtos destinados aos seres humanos e animais devem estar protegidos de eventual sobrevivência microbiana durante a vida útil de prateleira, assegurando as especificações de qualidade dos produtos. Substâncias naturais antimicrobianas, de natureza protéica, como as bacteriocinas, comprovadamente inofensivas aos seres vivos e ao meio ambiente, têm sido utilizadas na conservação desses produtos, principalmente de alimentos.

A nisina, peptídeo antimicrobiano, produzido por *Lactococcus lactis* ATCC 11454, tem o seu uso permitido pela Legislação Brasileira (DETEN/MS nº 29, de 22 de janeiro de 1996) como conservante natural de produtos de natureza biológica (queijos, carnes e embalagens de embutidos). Esta bacteriocina apresenta capacidade de inibir a germinação de esporos e o desenvolvimento de bactérias Gram-positivas; assim como, de bactérias Gram-negativas, na presença de agentes quelantes.

Aplicações da nisina em indústrias alimentícias, farmacêuticas e de artigos médico-odontológicos têm sido desenvolvidas, assim como a possível utilização da nisina como agente terapêutico (por exemplo, na forma liofilizada em aftas bucal). Comercialmente, a nisina é utilizada em produtos processados como: requeijão cremoso, requeijão culinário, queijos fundidos, ricota, sobremesas lácteas, queijos obtidos por ultra-filtração, salsichas, mortadelas, ovo líquido pasteurizado e molhos. O Ministério da Saúde no Brasil prevê a aplicação de nisina em 12,5 mg/kg de produto.

No Brasil, atualmente, a nisina é importada a preços elevados (R\$ 1,700,00, em 25 g do produto, que contem 2,5% de nisina) que dificulta a sua aplicação imediata em escala industrial (lacticínios, embutidos), hospitalar (lactário, dietas, curativos) e em merenda escolar.

Sabendo-se da importância da ação antimicrobiana da nisina, faz-se de extrema importância, para o mercado consumidor, viabilizar a produção nacional desta biomolécula de alto valor agregado.

O presente trabalho foi desenvolvido tendo por objetivos: (i) a produção de nisina por *L. lactis* através de meios de cultivo alternativos, como o soro de leite (resíduo industrial); (ii) processos biotecnológicos de fermentação; (iii) processos biotecnológicos de purificação; e (iv) análise de atividade antimicrobiana da nisina. A motivação do presente estudo trata da melhoria da qualidade de vida, não somente no seu principal objetivo, produção da nisina, mas também na associação da consciência ecológica, pois se utilizou do descarte da indústria de laticínios, soro de leite, como matéria-prima (meio de cultivo) no crescimento das células produtoras da biomolécula. Além de diminuir os custos em relação à produção.

Objetivo Principal

O objetivo deste trabalho foi produzir nisina a partir de células de *Lactococcus lactis* desenvolvidas em meio de cultivo natural (soro de leite e leite desnatado) e em meio de cultivo simulando o leite desnatado (meio de cultivo artificial).

Objetivos específicos

- Verificar a influência da composição do leite desnatado em diferentes diluições, no crescimento celular e concomitante expressão da nisina.
- Verificar a influência do soro de leite, como meio de cultivo, no crescimento celular e concomitante expressão da nisina.
- Realizar ensaios em fermentador de bancada (dorna), depois de estabelecidos os parâmetros de cultivo em agitador rotativo (*shaker*).
- Comparar a atividade da nisina produzida pelo *L. lactis* no processo fermentativo com a nisina adquirida comercialmente. Para isso, serão utilizadas células o *Lactobacillus sakei*, microrganismo Gram-positivo, e a *Escherichia coli* microrganismo Gram-negativo.
- Estudar a purificação da nisina em sistema de extração líquido-líquido (sistema micelar de duas fases aquosas).

Capítulo I

NISINA: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nisin biotechnological production and application: A review.
Trends in Food Science & Technology, p. 1-2, 2009

1. Peptídeos antimicrobianos: Nisina	15
1.1. Regulamentação Tóxica	16
1.2. Mecanismos de ação Nisina	17
1.3. Produção de Nisina	18
1.3.1 O leite e o soro de leite	20
1.4. Aplicação da Nisina	22
1.5. Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas	23
2. Referências Bibliográficas	24

1. Peptídeos antimicrobianos: Nisina

Os peptídeos antimicrobianos, bacteriocinas, são um dos mais importantes constituintes da imunidade natural encontrada na maioria dos seres vivos. São relativamente pequenos (<10 kDa), catiônicos e anfipáticos, de comprimentos, seqüências e estruturas variáveis. Durante mais de duas décadas os peptídeos antimicrobianos tem sido isolados de uma variedade de animais, plantas, bactérias e fungos. Estes peptídeos apresentam espectro de ação contra uma variedade de microrganismos incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, protozoários, fungos e vírus. Alguns peptídeos também demonstraram ter ação citotóxica contra espermatozóides e células tumorais. (REDDY; YEDERY; ARANHA, 2009).

O peptídeo antimicrobiano retratado neste trabalho é a nisina, produzido pela bactéria *Lactococcus lactis subsp. lactis*, um peptídeo estruturalmente composto por 34 aminoácidos, catiônico e hidrofóbico (CHANDRAPATI; O'SULLIVAN, 1998), pertencente à família dos lantibióticos, contendo lantionina e metil-lantionina. Os aminoácidos não comuns podem ser responsáveis pelas principais propriedades da nisina, que incluem a tolerância ácida, termo estabilidade e especificidade bactericida (deVUYST; VANDAMME, 1992).

Nisina pertence ao subgrupo dos lantibióticos lineares (BANERJEE; HANSEN, 1988), sendo termoestável e está incluída na classe I dos lantibióticos (THOMAS; CLARKSON; DELVES-BROUGHTON, 2000). Bactérias gram-positivas, em sua maioria, produzem bacteriocinas menores do que 6 kDa. Aquelas produzidas por bactérias ácido-láticas são divididas em 3 classes (NES et al., 1996): i – Lantibióticos; ii – Lantibióticos pequenos não estáveis; e iii - Grandes proteínas lábeis ao calor. Os lantibióticos são peptídeos antimicrobianos, bacteriocinas, produzidos por uma extensa gama de bactérias Gram-positivas, sendo caracterizadas pela presença única de aminoácidos modificados, particularmente o dehidroaminoácidos e os tioéter aminoácidos lantionina (Lan) e 3-metilantionina (MeLan), produzidos por complexos multienzimáticos.

A classificação da nisina deve-se ao termo do "Group N Inhibitory Substance" produzida por estreptococos de Lancefield – Grupo sorológico N ou gênero estreptococci (MATTICK; HIRSH, 1947). A estrutura do peptídeo nisina foi primeiramente descrita por Gross e Morell (1971), mas geneticamente isolada por Buchman, Banerjee e Hansen (1988).

A solubilidade e a estabilidade da nisina aumentam substancialmente com aumento da acidez do meio. A nisina é estável em pH 2 e podendo ser autoclavada a 121°C (BIWAS et al., 1991). A liberação de nisina pela célula no meio extracelular é dependente do pH do meio. Em pH < 6.0, mais de 80% da nisina formada é liberada no meio de cultivo. Por outro lado, quando as bactérias, *L. lactis* são cultivadas em pH > 6.0, a maioria da nisina é retida dentro da membrana ou intracelularmente (HURST, 1981).

1.1. Regulamentação Toxicológica

Extensivos estudos toxicológicos realizados com a nisina demonstraram que a sua ingestão não causa efeitos tóxicos ao organismo humano, sendo reportada uma DL50 de 6 g/kg, similar ao sal de cozinha, quando administrada oralmente. Com base no nível "no effect" observado nas avaliações toxicológicas realizadas em animais e permitido para humanos, a Organização Mundial da Saúde recomenda a Ingestão Diária Aceitável-IDA ("Acceptable Daily Intake" - ADI que apresenta a quantidade máxima do aditivo que poderia ser ingerida diariamente, sem causar quaisquer danos à saúde do consumidor) de 33000 Unidades Internacionais (UI) (0,825 mg) por quilo de peso corpóreo (HOOVER; STEENSON, 1993). A nisina é usada como um conservante/preservante natural nas indústrias de alimentos e laticínios, aprovadas pelo FDA (agência americana de regulamentação de alimentos e medicamentos) (CLEVELAND et al., 2001).

A nisina é considerada não tóxica para seres humanos, uma vez que ocorre comumente na natureza. É rapidamente inativada pela quimiotripsina, enzima produzida no pâncreas e liberada no intestino delgado, e é sensível à ptialina, não sendo detectada na saliva de humanos após 10 minutos do consumo de líquidos

contendo esta bacteriocina. É também a única bacteriocina que foi confirmada como GRAS "Generally Regarded as Safe" e de uso liberado como aditivo alimentar pelo comitê do *Codex Alimentarius*, da FAO(organização das Nações Unidas para agricultura e alimentação), para uso como agente antimicrobiano na inibição do desenvolvimento pós-germinativo de esporos e formação de toxina por *C. botulinum* em queijos fundidos e pasteurizados (CHANDRAPATI; O'SULLIVAN, 1998).

1.2. Mecanismos de ação Nisina

O mecanismo de ação da nisina é continuamente estudado e alguns pesquisadores indicam que ela seria fortemente atraída aos fosfolipídios na membrana, formando poros ou canais de 0,2-1,0nm de diâmetro. A simultânea despolarização da membrana causaria um rápido efluxo de moléculas essenciais (ions K⁺, aminoácidos e ATP), levando a uma série de alterações que terminariam com a lise celular (ABEE et al., 1994; BRUNO; KAISER e MONTEVILLE, 1992; BRUNO e MONTEVILLE, 1993; RUHR; SAHL, H.G., 1985; SAHL, H.G.; KORDEL e BENZ, 1987).

Autores também afirmam que o mecanismo de ação da nisina possivelmente interage na síntese da parede celular, fenômeno que pode estar ligado à habilidade da nisina de se prender ao lipídeo II, um peptidoglicano precursor, fazendo com que esta síntese seja interrompida (BAUER; DICKS, 2005; DEEGAN et al., 2006).

Nisina mostra um vasto espectro de atividade inibitória em microrganismos Gram-positivos, incluindo cepas de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria* e *Mycobacterium* e por isso há um grande interesse em sua utilização como conservante em alimentos (HURST, 1981; SAHL, H.G.; JACK e BIERBAUM, 1995). Entretanto há resistência efetiva à bactérias Gram-negativas, isso ocorre por causa da estrutura da membrana que envolve as células, atuando como uma eficiente barreira contra soluções hidrofóbicas e macromoléculas semelhantes a

nisina (NIKAIDO, 1996; VAARA, 1992). Estudos mostraram que a utilização da nisina em combinação com agentes quelantes (EDTA, monohidrato cítrico e ortofosfato trisódico) torna bactérias Gram-negativas sensíveis à nisina (GÄNZLE, M.G., HERTEL e HAMMES, W.P., 1999; GÄNZLE, M. G.; WEBER e HAMMES, W.P. HAUBEN, 1996; HELANDER, vonWRIGHT; MATTILA-SHANHOLM, 1997; STEVENS et al., 1991; THOMAS et al., 2000; UKUKU; FETT, 2004; VAARA,1992).

Em um sistema combinando diferentes soluções de antimicrobianos, como nisina/EDTA ou nisina/sorbato de potássio a 10 °C, mostrou um significativo decréscimo da população de *E. coli* O157:H7 comparado às amostras tratadas somente com a nisina, sorbato de potássio ou EDTA (FANG; HUNG-CHI, 2004; GILL; HOLLEY, 2003). A atividade inibitória da nisina em microrganismos Gram-negativos pode ser melhorada através da combinação nisina com EDTA no meio de cultivo (VESSONI PENNA et al., 2006).

A atividade da antimicrobiana contra microrganismos esporos formadores é causada pela ligação da nisina nos grupos sulfidril dos resíduos de proteínas. Foi observado que os esporos se tornam mais sensíveis a ação da nisina quando submetidos a tratamento térmico, sendo um fator importante sua aplicação como conservante de alimentos em processos térmicos. Por exemplo, esporos de *Clostridium* PA3679, dos quais sobreviveram ao tratamento térmico por 3 minutos a 121 °C, são 10 vezes mais sensíveis quando tratados com nisina. (DELVES-BROUGHTON et al. 1996; MORRIS; WALSH e HANSEN,. 1984).

1.3. Produção de Nisina

A bacteriocina nisina, produzida pela bactéria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, foi descoberta na Inglaterra em 1928 por Rogers e Whittier (ROSS et al., 2002). Sua biossíntese ocorre durante a fase exponencial de crescimento e encerra no início da fase estacionária de crescimento (PONGTHARANGKUL; DEMIRCI, 2004).

Estudos prévios mostraram que a nisina é formada continuamente desde os estágios iniciais de crescimento até a fase estacionária, além disso, um atraso da fase de crescimento rende um expressivo aumento em produção de nisina (BUCHMAN; BANERJEE e HANSEN, 1988; deVUYST; VANDAMME, 1992).

O lançamento de nisina da célula no meio de propagação é dependente do pH deste ambiente. Em valores de pH menores que 6,0, mais de 80% da nisina produzida é liberada ao meio de crescimento. Enquanto a pH maiores de 6,0 a maior parte da nisina está associada à membrana celular e no interior da célula (HURST; KRUSE, 1972; PARENTE; RICCIARDI e ADDARIO, 1994).

As bactérias lácticas são fastidiosas e requerem meios de cultivo de alto valor nutricional, dos quais melhoram o crescimento e a produção de bacteriocinas. Muitos artigos descrevem os caldos MRS e M17 como ótimos meios de cultivo utilizados para o crescimento celular e produção de bacteriocina pelo *Lactococcus lactis* (BISWAS et al., 1991; CHEIG et al., 2002; DABA et al., 1993; REID e MACGROARTY, 1988; tem BRINK et al., 1994; TOBA et al., 1991).

As diferentes concentrações dos suplementos nutricionais tais como a sacarose, a lactose e a glicose podem estar ligadas a nisina excretadas nos meios de cultivos pelo *L. lactis* (KIM; HALL e DUNN, 1997). E altas concentrações de sacarose podem estar relacionadas ao aumento da produção de nisina no fim da fase estacionária (de VUYST; VANDAMME, 1992). Liu, X. et al (2003) mostraram que a formação da nisina celular está diretamente relacionada às concentrações de nutrientes no meio de cultivo.

A utilização do meio sintético MRS com ou sem a suplementação de sacarose, asparagina e fosfato de potássio, verificou-se que a produção de nisina está ligada a fatores nutricionais e de crescimento, que crescimento celular e a produção de nisina são concomitantes e que produção de nisina e o crescimento celular indicam que o tempo de processo até o início da fase estacionária é ao redor de 36 horas (VESSONI PENNA; MORAES, 2002). Os autores observaram uma influência

positiva dos suplementos mostrando que a produção de nisina e massa celular de *L. lactis* dependiam do balanço de sacarose e asparagina, mas era independente do fosfato de potássio.

Como meio de cultivo, o leite fornece excelentes condições de crescimento para o *L. Lactis* e a excreção de nisina no meio, pois o microrganismo fermenta a lactose contida no leite, formando o ácido láctico, que faz com que o pH do meio de cultivo diminua ocasionando liberação de nisina para o meio extracelular.

Vessoni Penna e Moraes (2002) estudaram a produção de nisina pelo *Lactococcus lactis* ATCC 11454 em caldo MRS. Variando as concentrações de sacarose (5,0 a 12,5 g.L⁻¹), asparagina (7,5 a 75 g.l⁻¹), fosfato de potássio (6,0 a 18,0 g.L⁻¹) e tween 80 (1,0 a 6,6 g.l⁻¹) foram adicionados em caldo MRS para a determinação de qual suplemento era o mais influente.

Jozala et al. (2006) estudaram o leite desnatado (9,09% sólidos totais) e sua incorporação, na proporção 1:1, aos meios de cultivo (MRS, M17), favorecendo o crescimento e simultânea produção de nisina por *L. lactis*. Porém, na proporção 1:1 dos meios de cultivo, concentração de 25% de MRS ou M17 e 25% de leite desnatado, proporcionaram melhores condições para a adaptação e desenvolvimento celular e simultânea produção de nisina. Portanto, afirma-se que a produção de nisina esta relacionada concentração nutricional dos meios de cultivo utilizados para o crescimento do microrganismo.

1.3.1 O leite e o soro de leite

A importância do meio de cultivo é fundamental em trabalhos onde estão envolvidos microrganismos e produtos gerados por eles. No caso da produção de nisina o balanço nutricional do meio de cultivo é indispensável para as células produtoras.

Considerado um alimento de excepcional por seu alto valor nutritivo para o homem, o leite, contém proteínas, hidratos de carbono, ácidos graxos, sais minerais, vitaminas e água. Sendo um alimento rico em componentes nutritivos, constitui um ótimo meio de cultivo para ampla gama de microrganismos. (PONSANO, 1999).

A água é o componente que participa em maior proporção na composição do leite e com exclusão dela, os demais componentes, lipídeos, lactose, caseína, sais minerais e outros, constituem a fração denominada sólidos totais desengordurados ou Extrato Seco Total (EST) do leite (BEHEMER, 1987).

O leite tratado em ultra-alta temperatura (UAT), conhecido como *ultra high temperature (UHT)* é natural, processado obedecendo as mais rigorosas condições tecnológicas e higiênicas. É aquecido à 140° C, durante 5 segundos. Esse aquecimento reduz, drasticamente, qualquer possibilidade de contaminação, preservando o sabor característico. Em seguida, é rapidamente resfriado à temperatura ambiente e acondicionado diretamente em embalagem asséptica, o que impede a proliferação de microrganismos. O leite UHT, após 7 dias de incubação a 35-37° C não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas do produto, em condições normais de armazenamento (ANIVSA – RDC nº 12 de 02/01/2001).

No Brasil, a produção de queijo cresceu muito nas últimas décadas, e a maior parte do soro gerado é indevidamente descartado. Uma pequena proporção é usada para nutrição animal, enquanto outro pequeno percentual é seco por algumas indústrias, porém sem a completa concentração das proteínas. Estima-se que no Brasil 50% do soro seja despejado diretamente nos rios, sem nenhum tipo de tratamento causando poluição devido ao seu alto teor de matéria orgânica.

Soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios e contém nutrientes como lactose, proteínas e sais minerais. Infelizmente, apesar de todas as qualidades nutricionais associadas, o soro de leite tem tradicionalmente sido tratado como resíduo e representa uma importante fonte de

poluição, causado por sua alta demanda biológica e bioquímica de oxigênio e matéria orgânica (LIU, C. et al., 2006).

A indústria de laticínios gera quantidades significantes de resíduos, dos quais o descarte requer um amplo investimento. Aproximadamente 85% do total de leite manufaturado é descartado como soro. A maioria das plantas industriais não está preparada para o descarte ou o tratamento correto de tal sub-produto (PARMJIT et al., 2007).

Atualmente, o soro de leite é o maior subproduto das indústrias de laticínios. Na média, por todo o mundo, o volume de leite é igual a taxa de soro de leite produzido, sendo 42% ao ano, segundo a FAO 2006. Este aumento está diretamente relacionado a quantidade de leite que está sendo destinada para produção de queijo, caseína/caseinato, e outros produtos da indústrias de laticínios (SMITHERS 2008). Consequentemente é interessante o uso deste subproduto como substrato em fermentação na produção de produtos com valor agregado.

1.4. Aplicação da Nisina

Apesar da aplicação principal de toda bacteriocina ser a utilização em alimentos, pesquisas recentes verificaram a grande possibilidade do uso de nisina para finalidades terapêuticas, particularmente interessantes em tratamentos de úlceras estomacais e infecção de cólon intestinal para pacientes com imunodeficiência, assim como estudos com a aplicação da nisina em produtos odontológicos e farmacêuticos como contraceptivo (ARANHA; GUPTA e REDDY, 2004;. DUBOIS 1995; GUPTA, et al. 2008; REDDY et al., 2004; SAKAMOTO; IGARASHI e KIMURA, 2001; TURNER, LOVE e LYONS, 2004).

1.5. Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas

Extração líquido-líquido é um método alternativo de purificação que tem sido estudado em vários tipos de sistemas complexos que atendem de forma interessante as necessidades de biosseparação em casos diversos (ALBERTSSON, 1956; BORDIER, 1981; JOHANSSON et al., 1996, 1999; KAMEI et al., 2002a, 2002b; NIKAS et al., 1992; RANGEL-YAGUI et al., 2003; SIVARS; TJERNELD, 2000; SIVARS et al., 2000). Em particular, sistemas micelares de duas fases aquosas, que são formados quando uma determinada classe de tensoativo é dissolvida em água, são considerados promissores para separação de biomoléculas (NIKAS et al., 1992). Nestes sistemas, a separação de fases pode ser induzida por alterações mínimas no sistema, por exemplo, aumento de temperatura. As duas fases micelares coexistentes formadas (uma rica e outra pobre em micelas são predominantemente aquosas, garantindo ambiente ameno para as biomoléculas e proteínas. As micelas presentes na fase rica em micelas são, em geral, maiores e abundantes se comparadas à fase pobre em micelas. A diferença resulta em dois ambientes física e quimicamente distintos que coexistem e que possibilitam o processo de separação. Historicamente, sistemas micelares de duas fases aquosas foram empregados para separação de proteínas e biomoléculas baseado na hidrofobicidade (BORDIER, 1981), tamanho (NIKAS et al., 1992) e carga (KAMEI et al., 2002a, 2002b).

Produtos derivados de processos biotecnológicos são geralmente obtidos de forma diluída e a partir de meios complexos contendo contaminantes diversos, tais como: células, componentes celulares, proteínas contaminantes, componentes do meio de cultura, pigmentos, polissacarídeos, etc. Tais contaminantes podem diminuir a atividade biológica de uma molécula, ou até mesmo inviabilizá-la no momento da utilização (ASENJO, 1990; KULA, 1985).

A recuperação e a purificação de biomoléculas diretamente de um meio fermentado é um fator crítico em biotecnologia, sendo responsável por grande parcela do elevado custo dos processos

e produtos, justificando desta forma os esforços pelo desenvolvimento de novos processos de recuperação que visem melhor economia e rendimento (ANSEJO, 1990).

2. Referencias Bibliográficas

1. ABEE, T.; ROMBOUTS, F.M.; HUGENHOLTZ, J.G.; LETELLIER, L. Mode of action of nisin against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Applied Environmental Microbiology*, **Washington**, v. 60 (6), p. 1062-1068, jun. 1994.
2. ALBERTSSON PÅ. Chromatography and partition of cells and cell fragments. **Nature**, v. 177, p. 771-774, abr. 1956.
3. ANSEJO, J. A. Separation processes in biotechnology. New York: Marcell Dekker; 1990. 287p.
4. ARANHA C.; GUPTA, S; REDDY, K. V. R. Contraceptive Efficacy Of Antimicrobial Peptide Nisin: *In Vitro* And *In Vivo* Studies. **Contraception**, v. 69(4), p. 333–338, abr. 2004.
5. BANERJEE, S.; HANSEN, J.N. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 9508–9514, jul.1988.
6. BAUER, R.; DICKS, L M. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. **International Journal Food of Microbiology**, Oxford, v. 101(2), p. 201-216, mai. 2005.
7. BISWAS, S. R.; RAY, P.; JOHNSON, M.C.; RAY, B. Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, Pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57(4), p.1265–1267, abr. 1991.
8. BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v.256, p. 1604-1607, fev. 1981.

9. BUCHMAN, G.W.; BANERJEE, S.; HANSEN, J.N. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. . **Journal of Biological Chemistry**, USA, v.263, p.16260-16266, nov. 1988.
10. BEHEMER, M.L.A. Tecnologia do Leite. Ed. Nobel, São Paulo, 3 ed., p. 321, 1984.

BRUNO, M.E.C.; KAISER, A; MONTVILLE, T.J. Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 7, p. 2255-2259, jul. 1992.
11. BRUNO, M.E.C.; MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 9, p. 3003-3010, set. 1993.
12. CHANDRAPATI, S.; O'SULLIVAN, D.J. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis*. **Journal of Biotechnology**, v. 63, p. 229-233, ago.1998.
13. CHEIGH C, KOOK M, KIM S, HONG Y.; PYUN Y. Simple one-step purification of nisin Z from unclarified culture broth of *Lactococcus lactis subsp. lactis* A164 using expanded bed ion exchange chromatography. **Biotechnololy Letters**, Netherlands, v. 26, p. 1341–5, set. 2004;
14. CLEVELAND, J; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural, and antimicrobials for food preservations **International Journal Food of Microbiology**, Amsterdam, v. 71, p.1-20, dez. 2001.
15. DABA, H.; LACROIX, C.; HUANG, J.; SIMARD, R. E. Influence of growth conditions on production and activity of mesenteric 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteries*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v..39, p.166-173, 1993.
16. DELVES-BROUGHTON, J.; BLACKBURN, P.; EVANS, R. J.; HUGENHOLTZ, J. Applications of the bacteriocin, nisin **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 193-202, 1996.

17. DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. **Journal of General Microbiology**, Great Britain, v. 138, p. 571-578, mar.1992.
18. DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v.16, p. 1058-1071, set. 2006,
19. DUBOIS, A. Spiral bacteria in the human Stomach: The gastric *Helicobacter*. **EID - Digestive Diseases Division**, v. 1, p. 79–85, jul/set.1995.
20. FANG, T.J.; HUNG-CHI TI. Growth patterns of *E. coli* O157:H7 in ground beef treated with nisin, chelator, organic acids and their combinations immobilized in calcium alginate gels. **Food Microbiology**, London, v. 20(2), p. 243–253, abr. 2004.
21. FLORES, S.H.; ALEGRE, R. M. Nisin production from *Lactococcus lactis* A.T.C.C. 7962 using supplemented whey permeate. **Biotechnology and applied biochemistry**, London, v. 34(2), 103-107, out. 2001.
22. GÄNZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 48, p. 37-50, abr. 1999a
23. GÄNZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 46, p. 207-217, fev. 1999.b
24. GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Interactive Inhibition Of Meat Spoilage And Pathogenic Bacteria By Lysozyme, Nisin and EDTA In The Presence Of Nitrite And Sodium Chloride At 24 Degrees C. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 80, p. 251-259, 2003
25. GROSS, E.; MORELL, J.L. The structure of nisin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 4634-4635, 1971.

26. GUPTA, S. M.; ARANHA, C. C.; REDDY, K.V.R.. Evaluation of developmental toxicity of microbicide Nisin in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 598–603, 2008.
27. HAUBEN, K.J.A., WUYTACK, E.Y., SOONTJENS, C.C.F.; MICHIELS, C.W. High Pressure Transient Sensitization of *Escherichia Coli* To Lysozyme And Nisin By Disruption Of Outer-Membrane Permeability. **Journal Food Protection**, v. 59, p. 350–355, 1996
28. HELANDER, I.M.; von WRIGHT; MATTILA-SHANHOLM, T.M. Potencial of lactic acid bacteria and navel antimicrobials against gram-negative bacteria. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, p. 146-150, 1997.
29. HOOVER, G. D.; L. R. STEENSON. Bacteriocins of lactic acid bacteria. San Diego : Academic Press. 1993.
30. HURST, A. e KRUSE, H. Effect of secondary metabolites on the organisms producing them: effect of nisin on *Streptococcus lactis* and enterotoxin B on *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.1, p.277-79, 1972.
31. HURST, M. Nisin. **Advances in Applied Microbiology**, v.27, p.85-123, 1981
- JOHANSSON, H. O., LUNDH, G., KARLSTROM, G., TJERNELD, F. Effect of ions on partitioning of serum albumin and lysozyme in aqueous two-phase systems containing ethylene oxide/propylene oxide copolymers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1290, p. 289-298, 1996.
32. JOHANSSON, H. O., PERSSON, J., TJERNELD, F. Thermoseparating water/polymer system: A novel one-polymer aqueous two-phase system for protein purification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 66, p. 247-257, 1999.
33. JOZALA, A.F., NOVAES, L.C.L, CHOLEWA, O.; VESSONI PENNA, T.C. Increased Of Nisin Produced By *Lactococcus Lactis* in Different Media. **African Journal of Biotechnology**, v. 4(3), p. 262-265, 2005.

34. KAMEI, D. T., KING, J. A., WANG, D. I. C., BLANKSCHTEIN, D. Separating lysozyme from bacteriophage P22 in two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, p. 233-236, 2002b.
35. KAMEI, D. T., WANG, D. I. C., BLANKSCHTEIN, D. Fundamental investigation of protein partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/ionic) micellar systems. **Langmuir Journal**, v. 18, p. 3047-3057, 2002a.
36. KIM, W.S., HALL, R.J.; DUNN, N.W. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p. 449-453, 1997.
37. KULA MR. Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. **Bioseparation**, v. 1, p. 181-189, 1990.
38. KULA, M.-R. Liquid-liquid extraction of biopolymers. In: Moo-Young, Murray ed. **Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine**. Oxford: Pergamon Press, v.2., 1985. 632p.
39. LIU, C., HU, B., LIU, Y. e CHEN, S. Stimulation of nisin production from whey by a mixed culture of *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 751-761, 2006.
40. LIU, C., LIU, Y., LIAO, W., WEN, Z.; CHEN, S. Simultaneous production of nisin and lactic acid from cheese whey: optimization of fermentation conditions through statistically based experimental designs. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 627-638, 2004.
41. LIU, X.; CHUNG, Y.K.; YANG, S.T. e YOYSEF, A.E. Continuous nisin production in laboratoty media and whey permeate by immbilized *Lactococcus lactis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 13-24, 2003.
42. MATTICK, A. T. R.; HIRSCH, A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. **Lancet**, v.2, p.5-7, 1947.

43. MORRIS, S.L.; WALSH, R. C.; HANSEN, J. N. Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 13590-13594, nov. 1984.
44. MONDRAGÓN-PARADA, M. E., NÁJERA-MARTÍNEZ, M., JUÁREZ-RAMÍREZ, C., GALÍNDEZ-MAYER, J., RUIZ-ORDAZ, N. e CRISTIANI-URBINA, E. Lactic acid bacteria production from whey. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134(3), p. 223-232, 2006.
45. NES, I.F. DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L.S.; BRURBERG, M.B, EIJSK, V. E HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 70, p. 113-128, 1996.
46. NIKAIDO, H.. Outer membrane In: F. C. Neidhardt, *et al.* (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. Washington, D.C, ASM Press, p. 29-47, 1996.
47. NIKAS, Y.J., LIU, C.L., SRIVASTAVA, T., ABBOTT, N.L. e BLANKSCHTEIN, D. Protein Partitioning In Two-Phase Aqueous Nonionic Micellar Solutions. *Macromolecules*: Washington D.C., v.25, p. 4794-4806, 1992.
48. PANESAR, P. S.; KENNEDY, J F.; GANDHI, D. N. ; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1–14, 2007.
49. PARENTE, E.; RICCIARDI, A.; ADDARIO, G. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 388 – 394, 1994.
50. PITOMBO, R . Effect of Moisture Content on the Invertase Activity of Freeze-Dried *S. cerevisiae*. *Cryobiology*, New york, v. 31, p. 383-392, 1994
51. PONGTHARANGKUL, T.; DEMIRCI, A. Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65(3), p.268-2, 2004.

52. PONSANO, E.H.G.; PINTO, F.M. e LARA, J.A.F. Variação Sazonal e Correlação Entre Propriedades do Leite Utilizadas na avaliação das Qualidades. **Revista Higiene Alimentar**, v. 13, n. 64, p 35-39, 1999.
53. RANGEL-YAGUI, C.O.; LAM, H.; KAMEI, D.T.; WANG, D.I.C.; PESSOA-JR, A.; BLANKSCHTEIN, D. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Partitioning In Two-Phase Aqueous Mixed (Nonionic/Cationic) Micellar Systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.82, p.445-456, 2003.
54. REID, G.; MCGROARTY, J.A., ANGOTTI, R.; COOK, R. L. Lactobacillus inhibitor production against Escherichia coli and coaggregation ability with uropathogens. **Canadian Journal of microbiology**, v. 34(3), p. 974 – 978, 1988.
55. REDDY, K V R; ARANHA, C; GUPTA, S M; YEDERY, R D. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: in vitro and in vivo studies. **Reproduction**, v. 128, p. 117-126, 2004.
56. REDDY, K V R, YEDERY, R D; GUPTA, S M, Antimicrobial peptides: premises and promises **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 536–547, 2009.
57. ROSS, R.P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal Food of Microbiology**, v. 79, p. 3-16.). 2002,
58. RUHR, E.; SAHL, H.G. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potencial of whole cells and on cytoplasmatic and artificial membranes vesicles. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 27, p. 841-845, 1985.
59. SAHL, H-G; KORDEL M.; BENZ R. Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. **Arch Microbiol.** v. 149(2), p. 120–124, 1987.
60. SAHL, H-G; JACK, R. W.; BIERBAUM, G. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. **European Journal of Biochemistry**, v. 230, p. 827-853, 1995.

61. SAKAMOTO, I.; IGARASHI, M.; KIMURA, K. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 709-710, 2001.
62. SIVARS, U.; ABRAMSON, J.; IWATA, S.; TJERNELD, F. Affinity partitioning of a poly(histidine)-tagged integral membrane protein, cytochrome bo_3 ubiquinol oxidase, in a detergent-polymer aqueous two-phase system containing metal-chelating polymer. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p. 307-316, 2000.
63. SIVARS, U.; TJERNELD, F. Mechanisms of phase behavior and protein partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase systems for purification of integral membranes proteins. **BBA-Gen Subjects**, v. 1474, p. 133-146, 2000.
64. SMITHERS, GW. Whey and whey proteins -From 'gutter-to-gold: Review. **International Dairy Journal**. v. 18, p. 695– 704, 2008.
65. STELLER, M. ; PITOMBO, R. N. M. ; LANNES, SCS. Effect of freeze-dried gluten addition on texture of hamburger buns. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 1, p. 19-21, 2005.
66. STEVENS, K.A., SHELDON, B.W.; KLAPES, N.A.; KLAENHAMMER T.R. Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58(5), p. 1786–1788, mai. 1992.
67. ten BRINK, B., MINEKUS, M., VAN DER VOSSEN, J. M., LEER, R. J.; HUIS IN'T VELD, J.H. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. **Journal Applied of Bacteriology**, v. 77, p.140-148, ago.1994.
68. THOMAS, L.V.; DELVES-BROUGHTON, J. New advances in the application of the food preservative nisin. **Advances of Food Science**, v. 2, p. 11-22, 2001.

69. THOMAS, L.V., CLARKSON, M.R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. In: Naidu, A.S., Editor, 2000. Natural Food Antimicrobial Systems, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 463–524.
70. TOBA, T.; SAMANT, S.K.; TOSHIOTA, E.; ITOH, T. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, p. 281-286, set. 1991.
71. TURNER, S.R., LOVE, R.M.; LYONS, K.M. An in-vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine. **International Endodontic Journal**, v. 37, p. 664–671, 2004.
72. UKUKU D.O. e FETT W. Behaviour Of *Listeria Monocytogenes* Inoculated On Cantaloupe Surfaces And Efficacy Of Washing Treatments To Reduce Transfer From Rind To Fresh-Cut Pieces. **Journal of Food Protection**, 2004. 2143-2150.
73. VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiology Reviews**, v. 56, p. 395-411, set. 1992.
74. VESSONI PENNA, T.C; MORAES, D.A. Optimization Of Nisin Production By *Lactococcus lactis*, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 775-789, 2002.
75. VESSONI PENNA, T.C.; JOZALA, A.F.; NOVAES, L.C.L; PESSOA-JR., A; CHOLEWA, O. Production Of Nisin By *Lactococcus Lactis* In Media With Skimmed Milk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121-124, p.1-20, 2005.
76. VESSONI PENNA, T.C.; JOZALA, A.F.; GENTILE, T.R.; PESSOA JÚNIOR, A.; CHOLEWA, O. Detection Of Nisin Expression By *Lactococcus Lactis* Using Two Susceptible Bacteria To Associate The Effects Of Nisin With Edta. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p.334-346, 2006.

PRODUÇÃO DE NISINA UTILIZANDO LEITE DESNATADO OBJETIVANDO A REDUÇÃO DE CUSTOS.

Nisin Production Utilizing Skimmed Milk Aiming to Reduce Process Cost
Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 28, p. 150, 2007.

1 Aspectos Gerais.....	34
2 Material e Métodos	35
2.1 Meio de cultivo e Inoculo	36
2.2 Processo Fermentativo	37
2.3 Procedimentos de análises	39
2.4 Concentração celular, de açúcares e proteínas totais	39
2.5 Atividade de nisina	40
3 Resultados e Discussão	41
3.1 Diluição do leite.....	41
3.2 Componentes do Leite na Formulação do Meio de Cultivo Artificial.....	45
4. Fermentação em bioreator	49
5. Conclusão.....	52

Lista de Figuras

	Legenda	Página
FIGURA 1	Relação entre o logaritmo da atividade de nisina (Log AU. mL ⁻¹) e o crescimento celular (gDCW. L ⁻¹) através dos ensaios em agitador rotacional utilizando leite desnatado diluído como meio de cultivo nas concentrações 4,54 g de sólidos totais ;2,27 g de sólidos totais; 1,14 g de sólidos totais. AU.mL ⁻¹ (Log AU) e halo de inibição (H, mm), foram calculados através da equação: $\text{Log [AU.mL}^{-1} = 10(0.2408 \cdot H - 0.8745)]$.	46
FIGURA 2	Relação entre o logaritmo da atividade de nisina (Log AU. mL ⁻¹) e o crescimento celular (gDCW. L ⁻¹) através dos ensaios em agitador rotacional utilizando meios de cultivo artificiais. AU.mL ⁻¹ (Log AU) e halo de inibição (H, mm) foram calculados através da equação: $\text{Log [AU.mL}^{-1} = 10(0.2408 \cdot H - 0.8745)]$.	50

Lista de Tabelas

TABELA 1	Nutrientes do Leite Desnatado em diferentes diluições	40
TABELA 2	Meios de cultivo elaborados com componentes Artificiais baseados na Composição do Leite Desnatado 2,27 g sólidos totais	40
TABELA 3	Produção de nisina, produção específica, produtividade, consumo de proteínas e açúcares do crescimento de <i>L. lactis</i> após 36 horas de cada cultivo (transferência) em leite desnatado diluído	45
TABELA 4	Produção de nisina, produção específica, produtividade, consumo de proteínas e açúcares do crescimento de <i>L. lactis</i> após 36 horas de cada cultivo (transferência) em meio de cultivo artificial	49
TABELA 5	Produção de nisina, produção específica, produtividade, consumo de proteínas e açúcares do crescimento de <i>L. lactis</i> , após 36 horas de cultivo, em bioreator leite desnatado diluído com 2,27 g de sólidos totais	52

1 Aspectos Gerais

O presente capítulo contempla a produção de nisina em leite desnatado em diferentes concentrações, em substituição ao meio de cultivo sintético, objetivando a redução de custos.

Para tanto a metodologia desenvolvida foi dividida em três etapas. A primeira etapa constituiu na elaboração do leite desnatado diluído em diferentes concentrações, das quais foram utilizadas como meio de cultivo. Na segunda etapa, o desenvolvimento de *L. lactis* foi reproduzido na diluição do leite desnatado que proporcionou maior desempenho das células (2,27g sólidos totais) e maior atividade de nisina (aproximadamente 10^6 AU/ml). Os parâmetros de crescimento e formação de nisina foram comparados àqueles determinados para as células de *L. lactis* desenvolvidas no “meio artificial” de cultivos preparados com os mesmos componentes do leite desnatado na diluição selecionada, gerando meios sintéticos. Os crescimentos das células de *L. lactis*, foram realizados nas mesmas condições (100rpm/30°C/36h) em agitador rotativo (*shaker*). Na terceira etapa, os ensaios realizados na primeira etapa (leite desnatado com 2,27g sólidos totais) foram reproduzidos em dorna de fermentação. Para tanto, o meio de cultivo utilizado foi preparado com a diluição do leite desnatado (1:4) que gerou maior atividade de nisina nas células desenvolvidas

2 Material e Métodos

A cepa produtora de nisina, *L. lactis* ATCC 11544 e a cepa *L. sakei* (Gram-positivo) ATCC 15521, microorganismo sensível a ação de nisina, foram utilizadas neste estudo. Ambas as culturas foram mantidas a -80 °C em caldo MRS (Man Rugosa Shepeer-Bacto Lactobacilli MRS broth, DIFCO) com 40% (v/v) de glicerol (JOZALA et al, 2005; VESSONI PENNA et al., 2006)

2.1 Meio de cultivo e Inoculo

Inicialmente, alíquotas de 100 µL (10^8 UFC) da cultura estoque de *L. lactis* foram inoculadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de caldo MRS (Difco) e incubadas em agitador rotacional (shaker) nas seguintes condições: 100 rpm/30 °C/36 horas. A partir deste cultivo uma alíquota de 5 mL foi transferida para Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio experimental, ou seja, composto de diferentes concentrações do leite desnatado diluído, que foi incubado em agitador rotacional (*shaker*) em 100 rpm/ 30 °C/ 36 horas. Essa transferência, e consequente incubação do crescimento celular para um novo meio de cultivo, foram repetidas por cinco (5) vezes (1°, 2°, 3°, 4° e 5° repiques).

O primeiro grupo de ensaios utilizou o leite desnatado à concentração selecionada como padrão de 9,09 g sólidos totais, a partir do qual foram desenvolvidos os seguintes meios de cultivo: (i) leite desnatado com 50% da concentração padrão de 4,54 g sólidos totais; (ii) leite desnatado com 25% da concentração padrão de 2,27 g sólidos totais; (iii) leite desnatado com 12,5% da concentração padrão de 1,14 g sólidos totais. Todos os meios foram diluídos em água destilada estéril (Tabela 1).

O segundo grupo de ensaios utilizou os componentes em maior concentração do leite desnatado (reprodução artificial) a partir da concentração do meio contendo 2,27 g sólidos totais, e desenvolveram-se os seguintes meios de cultivo: (i) caseína (0,75 g) e lactose (1,25 g); (ii) caseína (0,75 g) e lactose (1,25 g) e cloreto de cálcio (0,06 g); (iii) caseína (0,75 g) e lactose (1,25 g) e citrato de sódio (0,01 g); e (iv) caseína (0,75 g) e lactose (1,25 g) e cloreto de cálcio (0,06 g) e citrato de sódio (0,01 g), conforme a Tabela 2.

2.2 Processo Fermentativo

O pré-inóculo foi preparado adicionando 100 µL da cultura estoque, de *L. lactis* que foi inoculada em Erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL de caldo MRS (Difco) e incubada em agitador rotacional (*shaker*) à 100 rpm/30 °C/36 horas. O volume de 150 mL do pré-cultivo foi inoculado em 1,5 L de leite desnatado diluído contendo 2,27 g sólidos totais, pH 6,8, em dorna de 2 L do fermentador NBS-MF 105 (New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ).

A concentração celular inicial foi de $0,58 \pm 0,10$ g/L. O tempo de cultivo total foi de 36 horas, mantendo os parâmetros de temperatura, agitação e aeração constantes (30 °C/200 rpm/0,5 vvm), mensurados através de eletrodos do próprio equipamento, com objetivo de observar as variações de produção de nisina associada ao crescimento. A formação de espuma foi controlada com a adição de 0,3 mL de dimetilpolisiloxano (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO).

Tabela 1. Nutrientes do Leite Desnatado em diferentes diluições				
Nutrientes	50 mL	25 mL	12,5 mL	6,25 mL
Carboidratos	5,00	2,5	1,25	0,63
Proteínas	3,00	1,5	0,75	0,38
Ferro	0,0001	0,00005	0,00	0,00
Cálcio	0,2	0,1	0,05	0,03
Colesterol	0,0025	0,00125	0,00	0,00
Gorduras Totais	0,33	0,165	0,08	0,04
Gorduras Saturadas	0,05	0,025	0,01	0,01
Sódio	0,5	0,25	0,13	0,06
Vit A	0,006	0,003	0,00	0,00
Vit B	0,00038	0,00019	0,00	0,00
Sólidos Totais (g)	9,09	4,54	2,27	1,14

Tabela 2. Meios de cultivo elaborados com componentes Artificiais baseados na Composição do Leite Desnatado 2,27 g sólidos totais				
Nutrientes	A	B	C	D
Carboidratos	1,25	1,25	1,25	1,25
Proteínas	0,75	0,75	0,75	0,75
Sódio	X	X	0,01	0,01
Cálcio	X	0,06	X	0,06
Sólidos Totais (g)	2,00	2,06	2,01	2,07

2.3 Procedimentos de análises

Nos ensaios realizados em agitador rotacional (*shaker*) as análises foram realizadas nas diferentes transferências, sendo que alíquotas da suspensão celular foram coletadas assepticamente dos cultivos, para análises dos parâmetros como pH, concentração celular e detecção da atividade da nisina. Cada análise foi realizada em triplicata. Nos ensaios realizados em fermentador as amostras foram, assepticamente, coletadas em intervalos de 4 horas (10 amostras) e parâmetros como concentração celular, consume de nutrientes e detecção da atividade da nisina, foram realizados, em triplicata.

2.4 Concentração celular, de açúcares e proteínas totais

A concentração celular, expressa em miligramas de massa seca por litro de meio de cultivo (mg.DCW.L⁻¹), foi determinada através de densidade óptica em 660 nm (DO₆₆₀) segundo a curva de calibração [Células (mg.DCW.L⁻¹) = 2.1042* OD₆₆₀ + 0.124, R² = 0.998], como descrito em trabalhos anteriores (JOZALA et al, 2005; VESSONI PENNA et al., 2006)

Os açúcares (lactose), foi expressa em gramas de lactose por litro de meio de cultivo (g.L⁻¹) sendo determinada através de metodologia colorimétrica Somogyi-Nelson (30), segundo a curva padrão [Lactose g.L⁻¹ = ((0,537 * DO_{540nm}) – 0,0127)].

Proteínas totais, expressa em grama de caseína por litro de meio de cultivo (g.L⁻¹) determinada através do método colorimétrico de Lowry (31), segundo a curva padrão [Caseína g.L⁻¹ = ((0,9023 * DO_{660nm}) – 0,0329)].

2.5 Atividade de nisina

Aliquotas da suspensão celular (1 mL) foram adicionadas em *eppendorfs* e centrifugadas a 13100 g por 10 minutos; o sobrenadante foi coletado e filtrado através de membrana 0,22 μm (Millipore®). Essa amostra foi submetida à metodologia de difusão em ágar, a qual quantifica a nisina expressa e liberada no meio de cultivo em unidades arbitrárias, UA.mL^{-1} (6, 22) utilizando *L. sakei* como microrganismo sensível à ação de nisina. O cultivo de *L. sakei* foi realizado adicionando-se 100 μL (10^8 UFC) das células em 50 mL de caldo MRS (100 rpm/30 °C/24 h). Uma alíquota de 1,5 mL da suspensão ($\text{DO}_{660} = 0,4$) foi transferida, homogeneizada em 250 mL de ágar-soft MRS (caldo MRS com 0,8% p/v de ágar bacteriológico) e invertida em placas de Petri (aproximadamente 20 mL em cada placa). Após a solidificação do ágar, pocinhos de 3 mm de diâmetro foram feitos com o auxílio de um cortador de metal, previamente esterilizado.

A solução padrão de nisina foi preparada dissolvendo 1 g de Nisin® (uma preparação comercial de nisina purificada contendo 25 mg de nisina por grama de Nisin®, correspondendo a 10^6 AU/g; distribuída por Sigma Chemical) em 10 mL de 0,02 M de HCl. A solução foi autoclavada a 121 °C por 15 minutos, e estocada a 4 °C. A curva padrão foi desenvolvida através da diluição da solução padrão de nisina em 0,02 M de HCl e água estéril. A curva padrão é o resultado da relação entre concentrações da solução de nisina padrão (10^0 a 10^5 AU.mL^{-1}) e o diâmetro dos halos formados através da inibição do crescimento de *L. sakei* pela atividade de nisina $\text{AU.mL}^{-1} = 10^{0,2408 H - 0,8745}$. A concentração de nisina em mg.L^{-1} foi obtida através do fator de conversão 0,025 (2,5% de nisina em 1 g de produto), $\text{Nisina (mg.L}^{-1}) = (z \times 0.025)$, sendo $z = \text{AU.mL}^{-1}$. A produção de nisina em relação ao tempo de cultivo foi expressa em $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A produção específica e a produtividade relacionam a nisina com a concentração celular e o tempo de cultivo, $\text{mg.mg}_{\text{DCW}}^{-1}$ e $\text{mg.mg}_{\text{DCW}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

3 Resultados e Discussão

O cultivo celular de *L. lactis* foi transferido cinco vezes consecutivas para o meio de mesma composição (leite desnatado ou meio artificial) daquele inicialmente inoculado. Os cultivos foram realizados nas mesmas condições (100 rpm/30 °C/36 h), segundo procedimentos descritos em trabalhos anteriores (VESSONI PENNA et al., 2005 e 2006; JOZALA et al., 2005). As tabelas 1 e 2 mostram os resultados de atividade (UA.mL⁻¹) e concentração (mg.L⁻¹) de nisina nas amostras analisadas.

3.1 Diluição do leite

Vessoni Penna e colaboradores (2005) observaram que a concentração padrão do leite desnatado (9,09% de sólidos totais) aumentou gradativamente a expressão e liberação de nisina no meio de cultivo durante as cinco transferências consecutivas, de 408,02 (primeiro cultivo) para 884,74 (quinto cultivo) mg.L⁻¹, resultados similares aqueles obtidos nos meios de cultivo contendo (i) 25% de caldo MRS adicionado de 25% de leite desnatado e (ii) 25% de caldo M17 adicionado de 25% de leite desnatado. A maior concentração de nisina (3563,20 mg.L⁻¹) foi obtida na 2ª transferência, para meio de cultivo composto de 25% de caldo MRS adicionado de 25% de leite desnatado. Houve formação e dispersão da nisina nos meios de cultivo (caldo MRS e caldo M17 adicionados de leite desnatado) em concentrações menores que 25%, porém cinco vezes menores àquelas obtidas nos meios contendo 25%, sendo 63,68 mg.L⁻¹ em 17,36% caldo M17 adicionado de 17,36% leite desnatado e 161,19 mg.L⁻¹ em 17,36% caldo MRS adicionado de 17,36% leite desnatado.

Jozala e colaboradores (2005) indicaram que o pré-cultivo do *L. lactis* em caldo MRS permitiu a liberação de nisina pelas células, que quando comparado ao caldo M17, a concentração de nisina foi aproximadamente 2 vezes maior. Porém, a atividade de nisina aumentou quando os caldos MRS e

M17 foram diluídos em leite desnatado, resultando em uma concentração de 25% dos componentes originais de ambos os meios.

Na tabela 3 observa-se que a atividade de nisina aumentou 97 vezes da 1ª a 5ª transferência ($90,14 - 8739,77 \text{ AU.mL}^{-1}$) no meio de cultivo constituído de leite desnatado diluído em água (4,54 g de sólidos totais, pH 6,8). A concentração celular aumentou 3 vezes da 1ª a 4ª transferência (0,47 a $1,43 \text{ g.L}^{-1}$) e decaiu 1,5 vezes na 5ª transferência ($0,97 \text{ g.L}^{-1}$).

A concentração celular (g. L^{-1}) e a atividade de nisina (AU.mL^{-1}) no meio de cultivo composto por leite desnatado diluído (2,27 g de sólidos totais, pH 6,8) aumentou gradualmente durante as transferências (1ª a 5ª), 0,49 a $1,78 \text{ g}_{\text{DCW. L}^{-1}}$ e 1255,16 a $20077,05 \text{ AU.mL}^{-1}$ (Tabela 3). Entretanto, no leite desnatado diluído em água contendo 50% da concentração total de sólidos (1,14 g, pH 6,8), a atividade de nisina foi reduzida 11 vezes da 1ª ($273,21 \text{ AU.mL}^{-1}$) a 4ª ($25,89 \text{ AU.mL}^{-1}$) transferência (Figura 1).

Comparando todos os resultados, o meio de cultivo composto por leite desnatado com 2,27 g de sólidos totais evidenciou ser o melhor meio de cultivo, para o crescimento celular e a atividade de nisina, do que os meios de cultivo compostos por leite desnatado com 4,54 g e 1,14 g de sólidos totais. A média das atividades de nisina através das transferências, no meio de cultivo com 2,27 g de sólidos totais, foi 3 e 85 vezes maior do que nos meios de cultivo com 4,54 g e 1,14 g de sólidos totais, respectivamente.

Tabela 3. Produção de nisina, produção específica, produtividade, consumo de proteínas e açúcares do crescimento de *L. lactis* após 36 horas de cada cultivo (transferência) em leite desnatado diluído.

Transf	pH	Halo	AU.ml ⁻¹	log AU.ml ⁻¹	mg.L ⁻¹	(gocw.L ⁻¹)	mg _{nisina} .mg _{dcw} ⁻¹	mg _{nisina} .mg _{dcw} .h ⁻¹	G _{caseína} .L ⁻¹	G _{lactose} .L ⁻¹			
4,54g	(mm)			0,025			y = 2,1042x + 0,124			y = 0,9023x - 0,0329		y = 0,537x - 0,0127	
	PC	4,50	17,0	1656,15	3,22	41,40	0,87	0,05	-	-	-	-	-
	1	4,80	11,5	90,14	1,95	2,25	0,47	-	-	17,67	21,53	-	-
	2	4,45	12,5	136,62	2,14	3,42	0,36	0,01	-	17,28	21,06	-	-
	3	4,50	15,0	720,94	2,86	18,02	1,37	0,01	-	14,04	21,52	-	-
	4	4,35	19,0	5019,96	3,70	125,50	1,43	0,09	0,00	14,86	22,74	-	-
5	4,43	20,0	8739,77	3,94	218,49	0,94	0,23	0,01	11,98	18,45	-	-	
2,27g	PC	4,55	17,5	2185,24	3,34	54,63	0,85	0,06	<0,01	-	-	-	-
	1	5,33	16,5	1255,16	3,10	31,38	0,49	0,06	<0,01	17,67	13,45	-	-
	2	5,63	17,5	2185,24	3,34	54,63	0,34	0,16	<0,01	17,28	13,16	-	-
	3	4,36	18,25	3312,07	3,52	82,80	1,58	0,05	<0,01	14,04	10,76	-	-
	4	4,51	18,75	4370,19	3,64	109,25	1,64	0,07	<0,01	14,86	11,37	-	-
	5	4,34	21,5	20077,05	4,30	501,93	1,78	0,28	0,01	11,98	9,22	-	-
1,14g	PC	4,55	12,00	103,54	2,02	2,59	0,84	-	-	-	-	-	-
	1	4,3	13,75	273,21	2,44	6,83	0,28	0,02	-	2,94	4,96	-	-
	2	5,75	11,25	68,31	1,83	1,71	0,09	0,02	-	8,87	2,22	-	-
	3	5,92	-	-	-	-	0,55	-	-	2,28	4,89	-	-
	4	6,47	9,50	25,89	1,41	0,65	0,41	-	-	3,70	4,18	-	-
	5	6,73	-	-	-	-	1,91	-	-	4,50	2,94	-	-

*PC: pré cultivo

Figura 1. Relação entre o logaritmo da atividade de nisina (Log AU. mL⁻¹) e o crescimento celular (g_{DCW}. L⁻¹) através dos ensaios em agitador rotacional utilizando leite desnatado diluído como meio de cultivo nas concentrações 4,54 g de sólidos totais ;2,27 g de sólidos totais; 1,14 g de sólidos totais. AU.mL⁻¹ (Log AU) e halo de inibição (H, mm), foram calculados através da equação: $\text{Log [AU.mL}^{-1} = 10^{(0.2408 \cdot H - 0.8745)}]$.

3.2 Componentes do Leite na Formulação do Meio de Cultivo Artificial

Quatro diferentes grupos de ensaios foram desenvolvidos utilizando componentes artificiais, baseados nas proporções do leite desnatado contendo 2,27 g de sólidos totais, para avaliar qual nutriente influenciou diretamente na atividade de nisina.

No ensaio 1 composto por caseína (0,75 g) e lactose (1,25 g), a atividade de nisina reduziu 14 vezes da 1ª a 2ª transferência ($414,10 - 29,70 \text{ AU.mL}^{-1}$) e aumentou 2 vezes da 2ª para 4ª transferência ($29,70 - 68,31 \text{ AU.mL}^{-1}$) (Tabela 4).

Nos grupos de ensaios: (i) caseína (0,75 g), lactose (1,25 g) e cloreto de cálcio (0,06 g); (ii) caseína (0,75 g), lactose (1,25 g) e citrato de sódio (0,01 g); (iii) caseína (0,75 g), lactose (1,25 g), cloreto de cálcio (0,06 g) citrato de sódio (0,01 g), a atividade de nisina foi observada nas 1ª e 2ª transferências (Tabela 4, Figura 2), os respectivos valores são: (i) 475,66 e 45,07 AU.mL^{-1} ; (ii) 68,31 e 45,07 AU.mL^{-1} ; (iii) 156,93 e 59,47 AU.mL^{-1} .

Os valores de pH nos ensaios com os componentes artificiais ficaram em torno de pH 6, conseqüentemente, este fator pode ter contribuído para a inibição da atividade de nisina. O valor de pH do meio de cultivo é um dos fatores que interferem na liberação de nisina pelas células, em valores de pH menores que 6, 80% da nisina é liberada no meio extracelular. Por outro lado, quando o valor de pH está na faixa alcalina ($\text{pH} > 6,0$), a maior parte da nisina fica retida intracelularmente ou na membrana das células (HURST; KRUSE, 1972; PARENTE; RICCIARDI e ADDARIO, 1994; PARENTE; RICCIARDI, 1994).

Cheigh e colaboradores (2002) observaram que as maiores atividades de nisina estavam próximas a fase estacionária de crescimento das células de *L. lactis* (20 h, 30°C) em caldo M17 (pH 6,0) adicionado 3% de lactose. O caldo M17 adicionado com 3% de lactose resultou em uma atividade de nisina 8 vezes maior do que a atividade em caldo M17 suplementado com 0,5% de glicose ou em caldo MRS. Os autores relataram que nos caldo MRS e M17 a atividade de nisina expressada pelas

células foi baixa, embora estes meios favoreceram o crescimento celular ficando entre 10^7 a 10^9 UFC.mL⁻¹, resultados similares aos obtidos neste estudo.

Chandrapati e O'Sullivan (1998) relataram o aumento de 50% na expressão de nisina pelas células de *L. lactis*, utilizando sacarose como fonte de carbono em caldo M17. Os autores observaram que a glicose, também é uma ótima fonte de carbono, e o glicerol o menos apropriado. Eles ainda verificaram que a incorporação de sódio ou fosfato de potássio no meio artificial não aumentou a produção de nisina.

Tabela 4. Produção de nisina, produção específica, produtividade, consumo de proteínas e açúcares do crescimento de *L. lactis* após 36 horas de cada cultivo (transferência) em meio de cultivo artificial.

		Halo	Produção de Nisina		Biomassa	Produção específica	Produtividade	Proteínas	Açúcares
Transf	pH	(mm)	AU.ml ⁻¹	log mg.L ⁻¹	gDCW.L ⁻¹	mg _{nisin} .mgDCW ⁻¹	mg _{nisin} .mgDCW.h ⁻¹	g _{casein} .L ⁻¹	g _{lactose} .L ⁻¹
			y = 0,2408x – 0,8745		y = 2,1042x + 0,124			y = 0,9023x – 0,0329	y = 0,537x – 0,0127
Meio A	1	3,90	414,10	2,62	0,15	0,07	-	1,08	13,41
	2	6,29	29,74	1,47	0,42	-	-	8,32	16,19
	3	6,14	-	-	1,56	-	-	10,46	19,79
	4	6,52	68,31	1,83	1,31	-	-	13,13	19,68
	5	6,35	-	-	1,50	-	-	15,26	11,05
Meio B	1	4,23	475,66	2,68	0,14	0,09	-	0,40	13,33
	2	6,14	45,07	1,65	0,20	0,01	-	8,73	15,45
	3	6,27	-	-	0,26	-	-	9,91	15,05
	4	6,64	-	-	0,23	-	-	13,70	18,14
	5	6,43	-	-	0,19	-	-	14,80	10,50
Meio C	1	4,36	68,31	1,83	0,18	0,01	-	1,08	13,41
	2	6,61	45,07	1,65	0,15	0,01	-	8,32	16,19
	3	6,26	-	-	0,20	-	-	10,46	19,79
	4	6,51	-	-	0,25	-	-	13,13	19,68
	5	6,73	-	-	0,23	-	-	14,70	10,50
Meio D	1	4,60	156,93	2,20	0,14	0,03	-	0,06	12,84
	2	6,11	59,47	1,77	0,15	0,01	-	17,01	18,14
	3	5,90	-	-	0,19	-	-	6,53	16,29
	4	6,37	-	-	0,26	-	-	13,48	19,84
	5	6,43	-	-	0,24	-	-	14,75	10,21

Figura 2. Relação entre o logaritmo da atividade de nisina (Log AU. mL^{-1}) e o crescimento celular ($\text{g}_{\text{DCW. L}^{-1}}$) através dos ensaios em agitador rotacional utilizando meios de cultivo artificiais. AU.mL^{-1} (Log AU) e halo de inibição (H , mm) foram calculados através da equação: $\text{Log [AU.mL}^{-1}] = 10^{(0.2408 \cdot H - 0.8745)}$.

4. Fermentação em bioreator

Nas condições de fermentação as atividades de nisina foram observadas após 4 horas de cultivo (45,07 AU.mL⁻¹) e entre 20 a 32 horas de processo esta atividade se apresentou estável (1255,16 AU.mL⁻¹). Nas últimas 4 horas de cultivo (o processo foi realizado em um total de 36 horas) a atividade de nisina aumentou 3 vezes (3312,07 AU.mL⁻¹). O consumo de oxigênio se manteve baixo em todo o processo e não influenciou diretamente na biomassa ou na produção de nisina. O valor de pH estabilizou em 4 horas e manteve-se em pH 4,74 ± 0,2 durante todo o processo, 36 horas de cultivo (Tabela 5, Figura 3).

Flôres e Monte Alegre (2001) estudaram a atividade de nisina durante a fermentação com *L. lactis* ATCC7962 e o efeito bactericida de nisina foi detectado após 4 horas de fermentação, quando 40% de biomassa foi produzida. Assim, a máxima atividade de nisina foi alcançada em 9 horas de processo fermentativo (pH 4,9); porém decresceu nas próximas 24 horas de processo.

Em trabalho anterior nosso grupo de pesquisa (VESSONI PENNA et al., 2006) utilizou meio de cultivo composto por leite desnatado e caldo MRS em fermentação de bancada. Neste ensaio a atividade de nisina aumentou de 1376,97 AU.mL⁻¹ (8 horas de processo) para 5934,03 AU.mL⁻¹ (16 horas de processo).

Neste trabalho, verificou-se que a composição do leite desnatado diluído (2,27 g de sólidos totais) sem adição de nutrientes extras foi o suficiente para o desenvolvimento das células de *L. lactis* e a produção de nisina. A atividade de nisina neste meio de cultivo (2,27 g de sólidos totais) foi similar àquela obtida em trabalho anterior (VESSONI PENNA et al., 2005), formulado com 25% de leite desnatado e 25% de caldo MRS.

LIU, X. e colaboradores (2005) estudaram a fermentação contínua das células imobilizadas de *L. lactis*, e observaram que o caldo M17 suplementado com lactose, como fonte de carbono,

influenciou diretamente na formação específica de nisina ($5,4 \times 10^6$ AU.g⁻¹ em pH 5,5), assim como a taxa de concentração dos nutrientes nos meios de cultivo.

Tabela 5. Produção de nisina, produção específica, produtividade, consumo de proteínas e açúcares do crescimento de *L. lactis*, após 36 horas de cultivo, em bioreator leite desnatado diluído com 2,27 g de sólidos totais

Amostra	Parametros				Produção de Nisina			Biomassa g _{DCW} .L ⁻¹	Proteínas g _{casein} .L ⁻¹	Açúcares g _{lactose} .L ⁻¹		
	Time (h)	°C	pH	%O ₂	rpm	Halo (mm)	AU.ml ⁻¹				log AU.ml ⁻¹	mg.L ⁻¹
0	0	30	5,78	119,80	200	10,5	45,07	1,65	1,13	0,60	0,26	0,11
1	4	30	4,74	111,40	200	13,75	273,21	2,44	6,83	5,80	0,39	0,07
2	8	30	4,73	107,40	200	14,75	475,66	2,68	11,89	5,70	0,40	0,09
3	12	30	4,72	107,00	200	15,25	627,62	2,80	15,69	5,20	0,38	0,10
4	16	30	4,72	106,20	200	16,25	1092,70	3,04	27,32	6,50	0,40	0,20
5	20	30	4,72	104,50	200	16,5	1255,16	3,10	31,38	5,70	0,44	0,21
6	24	30	4,73	103,80	200	16,5	1255,16	3,10	31,38	6,40	0,44	0,21
7	28	30	4,73	103,30	200	16,5	1255,16	3,10	31,38	6,60	0,42	0,24
8	32	30	4,73	88,10	200	16,5	1255,16	3,10	31,38	5,90	0,28	0,23
9	36	30	4,74	88,50	200	18,25	3312,07	3,52	82,80	6,60	0,25	0,25

5. Conclusão

O meio de cultivo composto pelo leite desnatado (2,27 g de sólidos totais) demonstrou ter melhores condições na produção e atividade de nisina pelo *L. lactis*. O mecanismo para este desempenho é desconhecido. A qualidade de um produto natural não pode ser reproduzida artificialmente, porque o leite é composto por um seletivo grupo de nutrientes naturais extremamente complexos. Neste presente trabalho as células de *L. lactis* se desenvolveram em uma concentração mínima do leite desnatado, entretanto na mesma proporção, a elaboração de meio de cultivo utilizando componentes artificiais, não favoreceu a adaptação celular e, conseqüentemente, a produção de nisina.

Em fermentador de bancada a atividade de nisina no meio de cultivo composto por leite desnatado diluído (2,27 g de sólidos totais) foi similar àquela obtida em trabalho anterior da mistura de 25% de leite desnatado com 25% de caldo MRS. (VESSONI PENNA et al., 2005).

Este trabalho mostra a utilização de um meio de cultivo de baixo custo (leite desnatado diluído) para a produção de um antimicrobiano com aplicações em diversas áreas. Além disso, pode ser explorada a utilização de sub-produtos do leite, como por exemplo o soro de leite, pois este contém níveis consideráveis de caseína e lactose, nutrientes dos quais as células de *L. lactis* se utilizaram para a formação de nisina, como observado em nosso trabalho. No Brasil, 50% do soro de leite são descartados sem tratamento em rios, e carrega uma alta quantidade de matéria orgânica, sendo considerado um importante poluente. Neste caso a produção de um antimicrobiano poderia ser associada com a reciclagem, ou a reutilização de material de descarte industrial.

6 Referencias Bibliográficas

77. CHANDRAPATI, S.; O'SULLIVAN, D.J. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing Nisin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis*. **Journal of Biotechnology**, v. 63, p. 229-233, ago.1998.
78. CHEIGH C, KOOK M, KIM S, HONG Y.; PYUN Y. Simple one-step purification of nisin Z from unclarified culture broth of *Lactococcus lactis subsp. lactis* A164 using expanded bed ion exchange chromatography. **Biotechnololy Letters**, Netherlands, v. 26, p. 1341-5, set. 2004;
79. FLORES, S.H.; ALEGRE, R. M. Nisin production from *Lactococcus lactis* A.T.C.C. 7962 using supplemented whey permeate. **Biotechnology and applied biochemistry**, London, v. 34(2), 103-107, out. 2001.
80. HURST, A. e KRUSE, H. Effect of secondary metabolites on the organisms producing them: effect of nisin on *Streptococcus lactis* and enterotoxin B on *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.1, p.277-79, 1972.
81. JOZALA, A.F., NOVAES, L.C.L, CHOLEWA, O.; VESSONI PENNA, T.C. Increased Of Nisin Produced By *Lactococcus Lactis* in Different Media. **African Journal of Biotechnology**, v. 4(3), p. 262-265, 2005.
82. LIU, X.; CHUNG, Y.K.; YANG, S.T. e YOYSEF, A.E. Continuous nisin production in laboratoty media and whey permeate by immbilized *Lactococcus lactis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 13-24, 2003.
83. PARENTE, E.; RICCIARDI, A.; ADDARIO, G. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis* 140NWC during batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 388 – 394, 1994.
84. PARENTE E.; RICCIARDI A. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. **Letters Applied in Microbiology**, v. 19, p.12-15, 1994.

85. VESSONI PENNA, T.C.; JOZALA, A.F.; NOVAES, L.C.L; PESSOA-JR., A; CHOLEWA, O. Production Of Nisin By *Lactococcus Lactis* In Media With Skimmed Milk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121-124, p.1-20, 2005.
86. VESSONI PENNA, T.C.; JOZALA, A.F.; GENTILE, T.R.; PESSOA JÚNIOR, A.; CHOLEWA, O. Detection Of Nisin Expression By *Lactococcus Lactis* Using Two Susceptible Bacteria To Associate The Effects Of Nisin With Edta. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p.334-346, 2006.

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NISINA POR *LACTOCOCCUS LACTIS* EM SORO DE LEITE COMO MEIO DE CULTIVO

Nisin Expression Evaluation from *Lactococcus lactis* in milk whey medium.
Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 83, p. 325-328, 2008.

1 Histórico	56
2. Materiais e Métodos	57
2.1 Cepas Bacterianas e meio de cultivo.....	57
2.2 Cultivo por batelada	57
2.3 Análise da Atividade de Nisina	58
3 Resultados e Discussão	59
4 Referências Bibliográficas	64

Lista de Figuras

Legenda		Página
FIGURA 1	Atividade de Nisina em soro de leite (com e sem filtração) utilizando células de <i>L. lactis</i> nas transferências dos meios de cultivo contendo soro de leite (36h/100rpm/30°C).	66

Lista de Tabelas

TABELA 1	Atividade e concentração de Nisina nas cinco transferências, após 36 h do cultivo de <i>L. lactis</i> (100rpm/30°C), nos meios de cultivos contendo soro de leite	65
-----------------	---	----

1 Histórico

A partir dos resultados e conclusões obtidas no Capítulo II, foram elaborados os ensaios que utilizaram o soro de leite, resíduo gerado pelas indústrias de laticínios, como meio de cultivo para o desenvolvimento das células de *L. lactis* e a produção de nisina.

O soro de leite foi doado por uma indústria alimentícia localizada em Minas Gerais, Brasil. Em laboratório o soro foi aliqotado em dois lotes (i) soro de leite não filtrado e (ii) soro de leite filtrado. Os lotes, assim como o produto *in natura*, foram enviados ao Instituto Adolfo Lutz, tendo como objetivo de avaliar todos seus constituintes (Anexo I).

Recebidas as análises bromatológicas e microbiológicas, procederam-se as metodologias de produção de nisina abaixo descritos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Cepas Bacterianas e meio de cultivo

A cepa produtora de nisina *Lactococcus lactis* ATCC 11454 e o microorganismo sensível a ação de nisina *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 foram utilizados neste estudo. Ambos foram mantidos em estoque congelado a -80°C em meio MRS (Difco, Detroit, MI) com 40% (v/v) de glicerol (JOZALA et al., 2007). O soro de leite foi generosamente fornecido por uma indústria alimentícia.

2.2 Cultivo por batelada

O pré-cultivo foi elaborado com 100 µL da cultura estoque de *L. lactis* (10^8 UFC.mL⁻¹) sendo cultivado em 50 mL de caldo MRS (100 rpm/36 h/30°C) em Erlenmeyers de 250 mL.

Do pré-cultivo, alíquotas de 5 mL da suspensão bacteriana foram transferidas para 50 mL do meio experimental, em Erlenmeyers de 250 mL, que foram incubados por outro período de 36 h (100 rpm/ 30°C). As transferências e a incubação de cada novo meio foram repetidas 5 vezes (1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª transferências).

O meio experimental (pH 6,8, ajustado com NaOH 2M) foi autoclavado a 121°C por 30 min. Em seguida, o soro de leite foi dividido em duas amostras: (i) soro de leite não filtrado) e (ii) soro de leite filtrado. O processo de filtração teve duas etapas: (1) filtração através de uma membrana de 1,20 µm (para remover proteínas insolúveis maiores) seguida por (2) filtração em membrana esterilizante (0,22 µm).

Após o período de 36 horas de incubação, 5 mL da suspensão celular foi assepticamente retirada para analisar os valores de pH e a concentração de nisina. Possíveis contaminações foram monitoradas pela técnica de coloração de Gram.

2.3 Análise da Atividade de Nisina

A atividade de nisina foi avaliada pelo método de difusão em ágar. Para a detecção da atividade de nisina, a suspensão celular foi centrifugada a 13.201g por 10 min a 10°C, e o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de 0,22 µm. As concentrações de nisina liberadas no meio de cultura foram quantificadas e expressas em unidades arbitrárias (AU.mL⁻¹) (JOZALA et al., 2007; PONGTHARANGKUL; DEMIRCI, 2004) utilizando *L. sakei* como bioindicador.

O cultivo de *L. sakei* foi realizado utilizando caldo MRS (100 rpm/30°C/24 h). Uma alíquota de 600 µL da suspensão previamente diluída (DO₆₆₀= 0,4) foi transferida, homogeneizada em 250 mL de ágar-soft MRS (caldo MRS com 0,8% p/v de ágar bacteriológico) e invertida em placas de Petri (aproximadamente 20 mL em cada placa) Após a solidificação do ágar, pocinhos de 3 mm de diâmetro foram feitos com o auxílio de um cortador de metal, previamente esterilizado.

Para todas as amostras, 50 μ L do sobrenadante da suspensão centrifugada de *L. lactis* foram transferidas nos poços do ágar inoculado com *L. sakei*.

As placas, sem inverter, foram incubadas a 30°C por 24 h. Após este período, os diâmetros dos halos de inibição de crescimento foram medidos em 4 direções e a média dos diâmetros dos halos relacionados com as unidades arbitrárias (AU.mL⁻¹) de atividade de nisina formada na respectiva cultura. Os resultados foram comparados a uma curva padrão obtida com a nisina comercial.

A curva padrão foi preparada através da solução estoque de nisina: 1 g de nisina comercial diluída em 10 mL de 0,02 M HCl (Nisin®, Sigma, St. Louis, MO – padrão com atividade de 10⁶ AU, contendo 25000 μ g de nisina por g). A relação entre unidade arbitrária (AU.mL⁻¹) e diâmetro dos halos (H, mm) foi determinada pelas concentrações de nisina padrão (10¹ to 10⁵ AU.mL⁻¹). A atividade de nisina expressa em AU.mL⁻¹ foi convertida em miligramas por mililitros (mg.mL⁻¹), através da relação: Nisina (mg.L⁻¹) = (z x 0,025), onde z = AU.mL⁻¹ e 0,025 é um valor de conversão relacionado com 2,5% de nisina comercial.

3 Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra os resultados da atividade de nisina (AU.mL⁻¹), detectada pelos halos de inibição, que foram correlacionados a 10¹ a 10⁵ AU.mL⁻¹ de nisina em solução acidificada (pH 2,5) e sua concentração (mg.L⁻¹) relacionando unidades arbitrárias (AU.mL⁻¹) com o fator de conversão (0,025 de nisina pura) nas amostras analisadas.

O pré-cultivo de *L. lactis* em MRS, com uma concentração média de 195,18 mg.L⁻¹, estimulou a expressão de nisina na primeira transferência de (i) sem filtração (1153,03 e 7595,56 mg.L⁻¹) e (ii)

com filtração ($6,83 \text{ mg.L}^{-1}$), devido aos nutrientes complexos do caldo MRS que possibilitaram uma formação de nisina a partir das células da cultura estocada.

O maior valor de atividade de nisina foi $11120,13 \text{ mg.L}^{-1}$, detectada na segunda transferência do soro de leite não filtrado, onde provavelmente, as proteínas insolúveis do meio contribuíram com a adaptação celular, considerando que as proteínas insolúveis foram removidas do meio durante as filtrações. Porém a expressão de nisina diminuiu na terceira transferência, reduzindo o tempo de cultivo. O menor valor de concentração de nisina foi de $6,83 \text{ mg.L}^{-1}$ alcançado na primeira transferência do soro de leite..

Valores de pH inferiores a 5 são extremamente importantes na liberação de nisina no meio extracelular, esta diminuição é diretamente relacionada com o consumo de lactose pelas células, que é convertido em ácido láctico. Neste trabalho, a maior atividade de nisina foi detectada em valores de $\text{pH} > 5$, em soro de leite não filtrado, e por outro lado a menor atividade de nisina foi observada em $\text{pH} < 4$, soro de leite filtrado. Podemos associar este fenômeno ao fato da maior concentração de lactose estar no meio filtrado, uma vez que a lactose não foi degradada pelo processo térmico

Comparando os dois meios (filtrado e não filtrado), o soro de leite não filtrado obteve melhor desempenho, provavelmente a maior concentração de nisina relaciona-se às proteínas insolúveis presente no meio. No soro de leite filtrado as proteínas insolúveis foram removidas pelas etapas de filtração, sendo a única diferença nutricional entre a composição dos meios, afetando o metabolismo do microrganismo, inibindo a biosíntese de nisina. A atividade de nisina (AU.mL^{-1}) após 5 incubações a cada $36 \text{ h}/100 \text{ rpm}/30^\circ\text{C}$ (1^{a} , 2^{a} , 3^{a} , 4^{a} e 5^{a} transferências) são mostrados na Figura 1.

Guerra e colaboradores (2001) estudaram o cultivo utilizando soro de leite em fermentações por batelada por 18 h, e observaram maior produção de nisina no soro diluído (misturado com água de reuso) $22,9 \text{ BU.mL}^{-1}$ (BU – Unidades de Bacteriocinas) em relação ao soro concentrado (líquido remanescente após a primeira prensagem do queijo) $8,3 \text{ BU.mL}^{-1}$, apesar do fato que a atividade

metabólica (consumo de nutrientes) tenha sido maior no soro concentrado. Este fato pode sugerir a possibilidade de efeito de inibição pelo substrato.

Flores e Alegre (2001) utilizando soro de leite como suplemento durante fermentação por batelada, obtiveram uma atividade de nisina máxima de 5280 IU.mL⁻¹ após 9 h de processo (pH 4,9). Mondragón-Prada e colaboradores (2006) verificaram que a suplementação de soro de leite filtrado aumentou a produção de biomassa de bactérias lácteas. Pesquisadores testando uma cultura mista de *L. lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* observaram que o meio à base de soro de leite estimula a produção de nisina (LIU, C et al., 2006).

Jozala e colaboradores (2007) mostraram que componentes nutricionais do leite desnatado diluído com 2,27g_{tsólidos totais} (máximo de nisina 501,93 mg.L⁻¹), influenciou a expressão de nisina pelas células durante o cultivo, sugerindo que o soro de leite pode aumentar a produção de nisina e reduzir o custo de produção desta biomolécula. De acordo com o exposto, os máximos valores de nisina obtidos, neste presente estudo, em soro de leite sem filtração (11120,13 mg.L⁻¹) foi 22 vezes maior que o leite desnatado diluído mencionado. Como o meio de cultura de baixo custo, o altamente nutritivo conteúdo do leite e o soro de leite fornecem um excelente crescimento de *L. lactis* e expressão de nisina.

Nosso estudo utilizou soro de leite não suplementado para promover o crescimento e produção de nisina pelo *L. lactis*. Os resultados obtidos demonstraram que a utilização do soro de leite, um subproduto da indústria alimentícia, pode ser utilizado como substrato para a formação e dispersão de nisina por *L. lactis*, como reportado anteriormente (JOZALA et al., 2007). Este meio de baixo custo, usado em culturas microbianas, promove vantagens econômicas, reduzindo a poluição do meio ambiente e estimulando os pesquisadores para a utilização deste subproduto.

Tabela 1. Atividade e concentração de Nisina nas cinco transferências, após 36 h do cultivo de *L. lactis* (100rpm/30°C), nos meios de cultivos contendo soro de leite.

Meio	pH final	Transferência	Atividade ^a (AU.ml ⁻¹)	Nisina ^b (mg.L ⁻¹)
	3,61	1	273,21	6,83
	3,47	2	0	0
Soro de leite filtrado	3,45	3	0	0
	3,52	4	0	0
	0	5	0	0
	3,64	1	46121,14	1153,03
Soro de leite não filtrado 1	3,47	2	0	0
	3,45	3	360,50	9,01
	3,52	4	0	0
	0	5	0	0
	5,39	1	303822,55	7595,56
	5,89	2	444805,35	11120,13
Soro de leite não filtrado 2	5,86	3	192291,46	4807,29
	5,89	4	0	0
	5,86	5	0	0

^a Unidades arbitrárias por mililitros: $AU/ml = 10^{(0.2408 \times H + 0.8745)}$, em que H = diâmetro do halo (mm). ^b Concentração de Nisina: $mg/ml = (x) \times 0.025$, em que x= atividade (AU.ml⁻¹) e 0,025 é um valor de conversão relacionado com 2.5% de nisina comercial.

Figura 1. Atividade de Nisina em soro de leite (com e sem filtração) utilizando células de *L. lactis* nas transferências dos meios de cultivo contendo soro de leite (36h/100rpm/30°C).

4 Referências Bibliográficas

87. FLORES, S.H.; ALEGRE, R. M. Nisin production from *Lactococcus lactis* A.T.C.C. 7962 using supplemented whey permeate. **Biotechnology and applied biochemistry**, London, v. 34(2), 103-107, out. 2001.
88. JOZALA AF, ANDRADE M S, ARAUZ LJ, PESSOA-JÚNIOR A, VESSONI PENNA TC. Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 136-140, p. 515-528, 2007.
89. LIU, C., HU, B., LIU, Y. e CHEN, S. Stimulation of nisin production from whey by a mixed culture of *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 751-761, 2006.
90. MONDRAGÓN-PARADA, M. E., NÁJERA-MARTÍNEZ, M., JUÁREZ-RAMÍREZ, C., GALÍNDEZ-MAYER, J., RUIZ-ORDAZ, N. e CRISTIANI-URBINA, E. Lactic acid bacteria production from whey. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134(3), p. 223-232, 2006.
91. PONGTHARANGKUL, T.; DEMIRCI, A. Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65(3), p.268-2, 2004.

EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE NISINA COMERCIAL E BIOSINTETIZADA EM SISTEMA MICELAR DUAS FASES AQUOSAS

Liquid-Liquid extraction of commercial and biosynthesized nisin by aqueous two-phase micellar systems.
Enzyme and Microbial Technology, v. 1, p. 1, 2008

1 Justificativa	67
2 Materiais e Métodos	67
2.1 Materiais	67
2.2 Produção de nisina em fermentador	67
2.3 Determinação da concentração de nisina pelo método de difusão em ágar	67
2.4 Determinação do diagrama de fases do sistema TX114/tampão	69
2.5 Determinação da influência do tensoativo TX114 na atividade de nisina	70
2.6 Partição de nisina em sistema micelar de duas fases aquosas	70
3 Resultados	71
3.1. Partição de nisina em sistema micelar de duas fases aquosas	71
4. Conclusões	75
5 Referências Bibliográficas	76

Lista de Figuras

Legenda		Página
Figura 1	Curva da nisina padrão, correlacionando unidades de atividade (log AU) <i>versus</i> halo de inibição (mm), $y = 0.2408x - 0.8745$ ($R^2=0,9806$), onde y representa unidades de atividade x halo de inibição (24 horas a 30°C).	
Figura 2	Comparação da atividade de nisina em Triton X-114 2% (p/p), 4% (p/p), 6% (p/p), 8% (p/p). Ensaio foram realizados utilizando nisina comercial pura em cada concentração de tensoativo, antes da partição, a fim de avaliar a influência de TX-114 na atividade da biomolécula. A primeira coluna representa a atividade da nisina comercial na ausência do tensoativo. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	
Figura 3	Comparação da atividade de nisina em 2% e 4% de Triton X-114 (p/p). Ensaio foram realizados utilizando nisina comercial pura nas duas concentrações de tensoativos antes (colunas da direita) e depois da partição (fase rica em micelas e fase pobre em micelas) a 28°C por 2h (colunas centrais e da esquerda). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	
Figura 4	Coeficientes de partição medidos experimentalmente para a biomolécula alvo em quatro diferentes condições: nisina comercial 10^5 UA, nisina comercial 10^3 UA, nisina produzida amostra A, nisina produzida amostra B, sob as mesmas condições experimentais (28°C, 2% Triton X-114). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	

1 Justificativa

Este capítulo tem por objetivo o estudo do processo de extração da nisina. Após os estudos de produção e dos resultados obtidos, houve o interesse de se conhecer o processo de extração da biomolécula.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

O tensoativo não-iônico Triton X-114 foi adquirido da Sigma (St. Louis, MO). Todas as soluções foram preparadas em tampão McIlvaine, pH 7,2, constituído de fosfato de sódio dibásico 16,4 mM e ácido cítrico 1,82 mM diluído em água purificada do sistema Millipore Milli-Q (Bedford, MA). A bactéria produtora de nisina *Lactobacillus lactis* ATCC 11454 e o microrganismo indicador *Lactobacillus sake* ATCC 9221 foram utilizados nesse estudo. A nisina padrão utilizada foi Nisin® (Sigma, St. Louis, MO). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Produção de nisina em fermentador

Foi preparado um pré-inóculo com 100 µL de cultura-estoque de *L. lactis* em 150 ml de caldo MRS (36 h/100 rpm/30°C). Esse meio de cultura foi adicionado a 1,5 L de soro de leite em fermentador de bancada (2L) (New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ). A concentração inicial celular era de $0,35 \pm 0,10$ g por litro. O tempo total de incubação para observar variações na expressão de nisina associada às condições de crescimento foi de 30 h a 30°C. O produto final foi coletado e dividido em dois tipos de amostras: (i) amostra A: centrifugada e esterilizada (121°C/30 minutos) com atividade de 5,25 logAU; e (ii) amostra B centrifugada com atividade de 6,58 logAU.

2.3 Determinação da concentração de nisina pelo método de difusão em ágar

A atividade de nisina presente no meio de cultura foi determinada pelo método de difusão em ágar (CHOL et al., 2000; JOZALA et al., 2005; VESSONI PENNA et al., 2005, 2006). Uma suspensão celular de *L. lactis* foi centrifugada em 13000 g por 10 minutos a 25°C e o sobrenadante coletado foi filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA). Em ágar sólido contendo *L. sakei* (microrganismo indicador) foram perfurados poços de 5 mm e preenchidos com 50 µL de amostras testes. Após incubação, a atividade antimicrobiana foi expressa pelo diâmetro do halo de inibição em volta dos poços. A solução de nisina padrão foi preparada dissolvendo-se 1 g de nisina comercial em 10 mL de água destilada e esterilizada (121°C/30 min). A atividade foi expressa em unidades arbitrárias por mililitro (AU.mL⁻¹), utilizando nisina comercial. As concentrações de nisina padrão (10⁰ to 10⁵ AU.mL⁻¹) foram relacionadas através do diâmetro do halo de inibição (H, mm) e a atividade de nisina dos sistemas foram determinadas e expressas em AU.mL⁻¹ (Figura 5). A conversão de atividade de nisina (AU.mL⁻¹) para concentração de nisina (mg.L⁻¹) é obtida através da relação Nisina (mg.L⁻¹) = (z x 0.025), onde z = AU.mL⁻¹; e 1 g de nisina comercial contém 2.5% de nisina pura (10⁶ AU. mL⁻¹ de nisina correspondem a 0.025 mg_{nisina}.L⁻¹).

Figura 1. Curva da nisina padrão, correlacionando unidades de atividade (log AU) *versus* halo de inibição (mm), $y = 0.2408x - 0.8745$ ($R^2=0,9806$), onde y representa unidades de atividade x halo de inibição (24 horas a 30°C).

2.4 Determinação do diagrama de fases do sistema TX114/tampão

O diagrama de fases do tensoativo não-carregado em tampão foi obtido pelo método ponto-de-névoa (ALBERTSSON, 1986; NIKAS et al., 1992). Soluções tampão de tensoativos de concentrações conhecidas foram preparadas e colocadas em um aparelho termo-regulador transparente com controle de temperatura dentro de 0,02°C. Um agitador magnético foi utilizado a fim de assegurar a temperatura e a homogeneidade da concentração. Primeiramente, a temperatura foi diminuída até que a solução apresentasse uma única e nítida fase. Posteriormente, a temperatura foi aumentada lentamente. A temperatura na qual a solução se tornou nublada, indicando o início da separação de fases, foi identificada como $T_{NÉVOA}$. O procedimento foi realizado em triplicata para cada ponto de dados a fim de assegurar reprodutibilidade. A concentração de Triton X-114 em cada fase coexistente do sistema de duas fases aquosas pode ser determinada no diagrama de fases observando as intersecções entre a linha de amarração e a curva de coexistência.

2.5 Determinação da influência do tensoativo TX114 na atividade de nisina

Diferentes concentrações de Triton X-114, com e sem nisina, foram testadas frente a *L. sake* no método de difusão em ágar, visando avaliar a influência do tensoativo na atividade de nisina. Do mesmo modo, nisina comercial e produzida foram testadas em diferentes concentrações de Triton X-114 (2,4,6 e 8%) a fim de verificar a atividade de nisina na presença do tensoativo (Figura 2) (JOZALA et al., 2005; VESSONI PENNA et al., 2005, 2006).

Figura 2. Comparação da atividade de nisina em Triton X-114 2% (p/p), 4% (p/p), 6% (p/p), 8% (p/p). Ensaios foram realizados utilizando nisina comercial pura em cada concentração de tensoativo, antes da partição, a fim de avaliar a influência de TX-114 na atividade da biomolécula. A primeira coluna representa a atividade da nisina comercial na ausência do tensoativo. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

2.6 Partição de nisina em sistema micelar de duas fases aquosas

Soluções tampão, cada uma com um volume total de 3 mL, foram preparadas em tubos graduados de 10 mL. O tensoativo Triton X-114, com concentração final de 0,06 g Triton X-114/g total

(2%) e 0,12 g Triton X-114/g total (4%) foi misturado com soluções diluídas de nisina. A nisina alcançou concentrações finais de 0,025 g/mL (10^5 AU.mL⁻¹) e 0,00025 g/mL (10^3 AU.mL⁻¹) em cada concentração de Triton X-114. As soluções resultantes foram homogenizadas. Em sequência, as soluções foram colocadas em banho termo-regulado, previamente ajustado na temperatura de 28°C. A razão de fases observada nessa temperatura foi de 1:1, para 0,06 g Triton X-114/g total (2%), que confirma a precisão do diagrama de fases (ver Resultados Experimentais e Discussão), visto que a concentração de tensoativo se dá através do ponto médio da linha de amarração a 28°C. As soluções foram mantidas nessa temperatura por no mínimo 2 h a fim de atingir o equilíbrio de partição.

Após o equilíbrio de partição ter sido alcançado, as duas fases micelares coexistentes foram amostradas separadamente, com o auxílio de seringas e agulhas, e as concentrações de nisina em cada fase foram determinadas como acima descrito. Cada experimento foi realizado em triplicata para assegurar reprodutibilidade.

3 Resultados

3.1. Partição de nisina em sistema micelar de duas fases aquosas

Previamente a partição, a nisina foi testada em diferentes concentrações de Triton X-114 (2, 4, 6 e 8% m/m) a fim de assegurar que a presença do tensoativo não interferiria no crescimento de *L. sake* (microrganismo indicador). O mesmo procedimento foi adotado para determinar a sua influência na atividade da nisina. Os resultados mostram que a presença do tensoativo não interfere na atividade de nisina, assim como não inibe o crescimento de *L. sakei*.

Em alguns casos, foi observado que o comportamento das soluções micelares aquosas são sensíveis à presença de impurezas (BALZER; LÜDERS, 2000), decidiu-se avaliar o comportamento

da nisina comercial e das amostras A (centrifugada e esterilizada) e B (centrifugada) no diagrama de fases.

O diagrama de fases do Triton X-114 na presença de nisina comercial e nas amostras A e B foram determinadas. A curva de coexistência de Triton X-114 puro e na presença dos produtos fermentados foi semelhante. O resultado pode ser confirmado através da razão do volume das fases, que se manteve constante em ambos os ensaios (LAM et al., 2004; KAMEI et al., 2002).

Os experimentos de partição de nisina foram realizados em duas concentrações de Triton X-114 diferentes, 2 e 4%, visando avaliar a concentração de tensoativo mais adequada para ser utilizada nos experimentos. Na figura 5, a 28°C, a concentração de tensoativo não aumentou na partição da biomolécula alvo. Dessa forma, a concentração de Triton X-114 a 2% foi escolhida para ensaios futuros. Para efeito de comparação, a atividade da nisina comercial (10^5 UA.ml⁻¹) está na representada na Figura 3. O ensaio também mostrou que a nisina comercial particionou preferencialmente para a fase rica em micelas.

Após os ensaios iniciais, adicionaram-se nisina comercial e produzida (amostras A e B) em sistema micelar de duas fases aquosas composto por 2% Triton X-114 (m/m) e solução tampão (pH 7,2). Em sequência, o sistema foi colocado em um banho termo-regulado a $28 \pm 0.01^\circ\text{C}$ por 2h até atingir o equilíbrio entre as fases rica e pobre em micelas. A atividade de nisina foi determinada e a partição foi quantificada através do coeficiente de partição, definido por:

$$K_{Nis} = \frac{[Nis]_{\alpha}}{[Nis]_{\beta}} \quad (1)$$

Em que $[Nis]_{\alpha}$ e $[Nis]_{\beta}$ são as concentrações de nisina medidas através da técnica de difusão em agar na fase rica em micelas (α) e na fase pobre em micelas (β), respectivamente.

Figura 3. Comparação da atividade de nisina em 2% e 4% de Triton X-114 (m/m). Ensaio foram realizados utilizando nisina comercial pura nas duas concentrações de tensoativos antes (colunas a direita) e depois da partição (fase rica em micelas e fase pobre em micelas) a 28°C por 2 h (colunas centrais e da esquerda). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Os ensaios nos quais a concentração inicial de nisina comercial era de 10^5 AU.mL^{-1} obteve-se um coeficiente de partição (K_{Nis}) maior que 1,5. No meio mais diluído (10^3 AU.mL^{-1}) o coeficiente de partição não foi tão acentuado (próximo de 1). No ensaio com a nisina produzida, a amostra A obteve um coeficiente de partição $K_{Nis} > 2,0$ e a amostra B $K_{Nis} > 1,3$ (referente à Figura 4, que ilustra os coeficientes de partição). Os dados obtidos tendem a ser similares a nisina comercial (10^5 AU.mL^{-1}). Tanto a nisina comercial quanto a nisina produzida particionaram preferencialmente para a fase rica em micelas.

O valor de K_{Nis} demonstra a eficácia do conceito de partição no sistema micelar de duas fases aquosas, mostrando-se uma unidade bastante útil. A biomolécula alvo foi extraída com sucesso da fase rica em micelas. Isso se deve, provavelmente, ao tamanho da nisina (3 kDa), além das suas características hidrofóbicas (LI *et al.*, 2001). Os efeitos do volume de exclusão, os quais direcionam a

maioria das biomoléculas para a fase pobre em micelas, devido ao tamanho das mesmas (LIU et al., 1998; LIU; NIKAS e BLANKSCHTEIN, 1996; NIKAS et al., 1992) não exerceram influência notável na partição da nisina. Além disso, os valores de K_{Nis} observados a partir da nisina produzida em fermentador sugerem que o sistema micelar de duas fases aquosas é eficaz podendo ser potencialmente ampliado e aplicado industrialmente, já que a presença dos contaminantes não interferiram na extração (MAZZOLA et al., 2006).

Figure 4. Coeficientes de partição medidos experimentalmente para a biomolécula alvo em quatro diferentes condições: nisina comercial 10^5 UA, nisina comercial 10^3 UA, nisina produzida amostra A, nisina produzida amostra B, sob as mesmas condições experimentais (28°C, 2% Triton X-114). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

A precisão dos ensaios foi confirmada medindo-se a concentração da proteína nas duas fases e determinando o balanço peptídico total (através do balanço de atividade) da proteína. O balanço de atividade (AB) foi analisado, como segue:

$$AB = \frac{C_{Nis,t}V_{Nis,t} + C_{Nis,b}V_{Nis,b}}{C_{Nis,i}V_{Nis,i}} \times 100\% \quad (\text{Equação 2})$$

Em que $C_{Nis,t}$, $C_{Nis,b}$, e $C_{Nis,i}$ são as concentrações de nisina na fase *top*, superior, na fase *bottom*, inferior e na solução inicial de nisina adicionada no sistema, respectivamente. V_t , V_b , and V_i são os volumes da fase *top*, superior, da fase *bottom*, inferior, e da solução inicial de nisina adicionada ao sistema, respectivamente.

Os balanços de atividade calculados nas amostras se encontraram perto de 100%, em todos os experimentos, demonstrando que a nisina é estável no sistema micelar com Triton X-114/ tampão.

4. Conclusões

O comportamento da nisina no sistema micelar de duas fases aquosas foi investigado experimentalmente, demonstrando que a biomolécula alvo pode ser extraída tanto do meio fermentado complexo quanto das impurezas presentes na nisina comercial.

A separação da nisina dos compostos presentes na suspensão foi obtida através de um sistema baseado em apenas um tensoativo, Triton X-114, demonstrando que este método é viável para extração de nisina para a fase rica em micelas ao mesmo tempo para remover impurezas para a fase pobre em micelas.

O aumento da atividade de nisina após a partição (Figuras 3 e 4) encoraja ainda mais pesquisas nesta área, visando otimizar a extração da biomolécula através de alteração de parâmetros simples, tais quais temperatura e adição de eletrólitos, entre outros.

Em conclusão, o sucesso obtido da partição da nisina, diretamente da suspensão do fermentado, em sistemas micelar de duas fases aquosas, apresentado neste capítulo, representa um

importante passo no desenvolvimento de um método de separação da nisina de ótimo custo-benefício.

5 Referências Bibliográficas

92. ALBERTSSON PÅ. Chromatography and partition of cells and cell fragments. **Nature**, v. 177, p. 771-774, abr. 1956.
93. BALZER D. e LÜDERS H. Nonionic surfactants: Alkyl polyglucosides. New York: Marcel Dekker; 2000.
94. CHOL HJ, CHEIGH CI, KIM SB. e PYUN YR. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. **J Appl Microbiol** 2000; 88: 563-71.
95. JOZALA, A.F., NOVAES, L.C.L, CHOLEWA, O.; VESSONI PENNA, T.C. Increased Of Nisin Produced By *Lactococcus Lactis* in Different Media. **African Journal of Biotechnology**, v. 4(3), p. 262-265, 2005.
96. KAMEI, D. T., WANG, D. I. C., BLANKSCHTEIN, D. Fundamental investigation of protein partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/ionic) micellar systems. **Langmuir**, v. 18, p. 3047-3057, 2002.
97. LAM H, KAVOOSI M, HAYNES CA, WANG DIC e BLANKSCHTEIN D. Affinity-enhanced protein partitioning in decyl beta-D-glucopyranoside two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnol Bioeng** 2004; 89:381-92.
98. LIU CL, KAMEI DT, KING JA, WANG DIC, e BLANKSCHTEIN D. Separation of proteins and viruses using two-aqueous micellar systems. **J Chromatogr B** 1998; 711:127-38.
99. LIU CL, NIKAS YJ. e BLANKSCHTEIN D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnol Bioeng** 1996; 52:185-92.

100. NIKAS, Y.J., LIU, C.L., SRIVASTAVA, T., ABBOTT, N.L. e BLANKSCHTEIN, D. Protein Partitioning In Two-Phase Aqueous Nonionic Micellar Solutions. *Macromolecules*: Washington D.C., v.25, p. 4794-4806, 1992.
101. VESSONI PENNA, T.C.; JOZALA, A.F.; GENTILE, T.R.; PESSOA JÚNIOR, A.; CHOLEWA, O. Detection Of Nisin Expression By *Lactococcus Lactis* Using Two Susceptible Bacteria To Associate The Effects Of Nisin With Edta. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p.334-346, 2006.
102. VESSONI PENNA, T.C.; JOZALA, A.F.; NOVAES, L.C.L; PESSOA-JR., A; CHOLEWA, O. Production Of Nisin By *Lactococcus Lactis* In Media With Skimmed Milk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121-124, p.1-20, 2005.

DETECÇÃO DE NISINA EXPRESSA POR *Lactococcus lactis* UTILIZANDO DUAS BACTÉRIAS SUSCEPTÍVEIS À AÇÃO DE NISINA ASSOCIADA COM EDTA

Detection of nisin expression by *Lactococcus lactis* using two susceptible bacteria to associate the effects of nisin with EDTA.
Applied Biochemistry and Biotechnology, Humana Press Inc., v. 129/32, p. 334-346, 2006.

1 Introdução	80
2 Materiais e Métodos.....	80
2.1 Preparação do microrganismo e do inóculo.....	80
2.2 Fermentação em batelada.....	81
2.3 Procedimentos analíticos	82
2.4 Detecção da atividade de nisin	82
3 Resultados e Discussão	85
3.1 Bactéria sensível e a associação entre nisin e EDTA	85
3.2 Fermentação	89
4 Referências Bibliográficas	93

Lista de Figuras

Legenda		Páginas
Figura 1	Consumo de oxigênio e atividade de nisina na fermentação (● 1º inóculo AU.mL ⁻¹ ; ◆ 1º inóculo %O ₂ * 2º inóculo AU.mL ⁻¹ ; Δ 2º inóculo %O ₂). Meio de cultivo com 50% de leite desnatado e 50% MRS, iniciadas com o 1º inóculo (agitador rotacional) sendo a equação de conversão AU.mL ⁻¹ = $10^{(0.2307 * H - 1.4174)}$; na fermentação iniciada com o 2º inóculo (agitador rotacional) sendo a equação de conversão AU.mL ⁻¹ = $10^{(0.3211 * H - 2.5553)}$.	91

Lista de tabelas

Legenda		Páginas
Tabela 1	Curvas Padrão e Equações de conversão associadas aos halos de inibição (H, mm, sem o crescimento de <i>E.coli</i> ou <i>L.sakei</i>)	92
Tabela 2	Halos de inibição (H, mm, sem o crescimento de <i>E.coli</i> ou <i>L.sakei</i> growth) convertidos em atividade de nisina (AU.ml ⁻¹) dos sobrenadantes (amostras centrifugadas, fermentador) ou nisina padrão, associadas com 7,45 mg.ml ⁻¹ EDTA diluído em água ou 0.02N HCl, contendo 0,75% NaCl . Metodologia de difusão em agar	93

1 Introdução

Conhecidos os processos de produção da nisina, houve a necessidade de estudar sua atividade como bacteriocina. Com isso desenvolveu-se o capítulo V, que objetiva avaliar a atividade da nisina através de dois microrganismos representando cada um deles, as classes de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.

2 Materiais e Métodos

A realização desse trabalho envolveu a produção de nisina através da cepa de *Lactococcus lactis* ATCC 11454, a cepa do microrganismo indicador sensível à nisina *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 e a bactéria recombinante *Escherichia coli* DH5- α . As culturas de *L. lactis* e *L. sakei* foram armazenadas a -80°C em caldo MRS (Man Rugosa Shepeer-Bacto Lactobacilli MRS broth, DIFCO) na presença de 50% (v/v) de glicerol. A *E. coli* foi cultivada (24 h/100 rpm/37°C) em caldo Luria Bertani (LB, DIFCO) misturada a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina (amp), a fim de selecionar as bactérias com plasmídeo, a partir de culturas estocadas a -80°C na presença de 50% (v/v) de glicerol, de acordo com procedimentos previamente publicados (VESSONI PENNA et al., 2003 e 2005).

2.1 Preparação do microrganismo e do inóculo

Antes da inoculação do meio experimental, 100 μL da cultura estoque de *L. lactis* foram adicionados a 50 mL de caldo MRS (Difco®, Detroit, MI) em Erlenmeyer de 250 mL (pré-inóculo) e incubado a 36 h/100 rpm/30°C.

Uma alíquota de 5 mL da suspensão celular do pré-inóculo foi transferida a um Erlenmeyer de 250 mL (1ª transferência) contendo 50 mL do meio experimental (caldo MRS + leite desnatado, 1:1),

sendo este incubado a 36 h/100 rpm/30°C. As culturas foram transferidas 5 vezes através de alíquotas de 5 mL retiradas do meio de cultivo e transferidos para um novo meio de cultivo, sendo incubados (36 h/100 rpm/30°C) de acordo com estudos anteriores (VESSONI PENNA et al., 2005); apenas o pré-inóculo e a 1ª e 2ª transferência em MRS + leite desnatado (1:1) foram utilizados para o cultivo em dorna nesse trabalho.

2.2 Fermentação em batelada

Uma alíquota de 1,5 mL da 1ª cultura de transferência foi adicionada em 150 mL de meio de cultura (75 mL MRS + 75 mL leite desnatado) e incubado a 36 h/100 rpm/30°C (2ª cultura de transferência). Os 150 mL da 2ª cultura de transferência foi adicionado a 1,5 L do mesmo meio de cultura (MRS mais leite desnatado, 1:1, pH 6,25 - 6,31) em uma dorna de 2 L (NBS-MF 105, New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ). A concentração celular inicial foi de $0,58 \pm 0,10$ g/L. O tempo total de incubação foi de 16 h a 30°C a fim de observar variações na expressão de nisina associada a condições de crescimento. A espuma era controlada conforme necessário pela adição de 0,5 mL de antiespumante (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Agitação e aeração foram mantidas constantes a 200 rpm e 0,5 vvm, respectivamente.

A aeração foi medida através de sensor acoplado a dorna e o pH do meio durante o cultivo foi medido por eletrodo (Ingold, Woburn, MA). Antes da adição do inóculo no fermentador, foram ajustadas a agitação, a taxa de aeração e a temperatura (30°C).

2.3 Procedimentos analíticos

Após cada período de incubação, as suspensões celulares foram retiradas assepticamente dos frascos para analisar pH, densidade celular, número de colônias e concentração de nisina. Cada cultivo foi realizado em triplicata.

As medidas de pH foram realizadas em 10 mL de suspensão celular através de Accumet AR20 pH/mV/conductivitymeter (Fisher Scientific, Hampton, NH) calibrado com soluções tampão padronizadas (Merck; Whitehouse Station, NJ) pH 4, 7 e 10, a 25°C.

A concentração de biomassa, expressa em mg de massa seca por litro de caldo (mg DCW.L⁻¹), foi determinada através de densidade óptica a 660 nm (DO₆₆₀) em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico em espectrofotômetro (Beckman DU-600, CA, USA). A leitura das DO₆₆₀ foram relacionadas com a curva padrão da massa seca de *L. lactis*, a qual foi obtida pelo método gravimétrico de biomassa (mg.L⁻¹) contida na superfície de uma membrana 0,22 µm (Millipore®, SP, Br). A equação da curva de calibração (R² = 0.998) é dada por:

$$DO_{660} = 0,0145 + 0,0022 \cdot DCW \text{ ou } DCW \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = [(DO_{660}) - 0,0145] / (0,0022)$$

A população de microrganismos foi determinada pelo método de contagem em placa, expressa em unidades formadoras de colônia por mL de caldo (CFU.mL⁻¹) em *Plate Count Agar* (PCA, Difco®) a 30°C por 24 h. A quantidade de células foi relacionada com a curva padrão de massa seca (DO₆₆₀) (mg DCW.L⁻¹) da mesma suspensão, na qual DO₆₆₀ = 0,01 foi equivalente a 10⁴ CFU.mL⁻¹.

2.4 Detecção da atividade de nisina

Assim como em trabalhos anteriores (VESSONI PENNA, et al. 2005), o pH da suspensão celular de *L. lactis* foi ajustado de pH 6 para pH 4, e ainda de pH 4 para pH 2,5 com 0,2 M HCl. O

ajuste de pH, antes da centrifugação, foi realizado para precipitar o leite, liberando a nisina em um sobrenadante límpido (após centrifugação) para facilitar a detecção de nisina.

Para a detecção da atividade de nisina, a suspensão celular foi centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 25°C e o sobrenadante coletado foi filtrado através de membrana 0,22 µm (Millipore®). A atividade de nisina no meio de cultivo foi quantificada e expressa em unidades arbitrárias (AU.mL⁻¹) através da metodologia de difusão em ágar (VESSONI PENNA e MORAES 2002; GILL e HOLLEY, 2003) utilizando *L. sakei* ATCC 15521 (Gram-positivo) e a bactéria recombinante *E. coli* DH5-α (Gram-negativo) como cepas de microrganismo indicador sensíveis à nisina.

L. sakei foi cultivado em 50 mL de caldo MRS em Erlenmeyer de 250 mL, sendo incubado (24 h/100 rpm/30°C). Uma alíquota de 1,5 mL da suspensão (DO₆₆₀ = 0,4) foi adicionada a 250 mL de ágar soft (caldo MRS com 0,8% de ágar bacteriológico) em Erlenmeyer de 500 mL. O meio inoculado foi transferido para placas de Petri (20 mL em cada placa – 100mm diâmetro).

E. coli foi cultivada em 50 mL de caldo Luria Bertani (LB) em Erlenmeyer de 250 mL, sendo incubada (24 h/100 rpm/37°C), acrescentando 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina. Uma alíquota da suspensão foi transferida para a superfície do ágar soft LB-amp (caldo LB com 100 µg.mL⁻¹ amp e 0,8% de ágar bacteriológico), no qual foi previamente misturado isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), em concentração final de 0,5 mM (m/v) e incubada a 37°C. Outra alíquota da suspensão sofreu diluição seriada em soro fisiológico até diluição 1:1000, que corresponde a DO₆₆₀ = 0,005. Uma alíquota de 0,6 mL da suspensão diluída (DO₆₆₀ = 0,005) foi adicionada a 100 mL de ágar soft (caldo LB com 100 µg.mL⁻¹ amp, 375 µL de IPTG e 0,8% de ágar bacteriológico) em Erlenmeyer de 250 mL. O meio inoculado foi transferido para placas de Petri (20 mL em cada placa). A bactéria recombinante *E. coli* foi cultivada com amp e IPTG a fim de manter o plasmídeo e expressar GFP, condições que serão aplicadas em estudos futuros utilizando detecção por espectrofluorimetria.

Após a solidificação do ágar, poços de 3 mm de diâmetro foram feitos com o auxílio de um cano de metal esterilizado com 5 mm de diâmetro total. Aliquotas de 50 μL do sobrenadante da suspensão centrifugada de *L. lactis* de cada fermentação, na presença e na ausência de 7,45 mg.mL^{-1} EDTA, foi transferida para cada um dos quatro poços no ágar inoculado com *L. sakei*, e no ágar inoculado com *E. coli*.

As placas com *L. sakei* foram incubadas a 30°C e as placas com *E. coli*, a 37°C, ambas sem inversão. Após o período de incubação, os halos de inibição, ou seja, as regiões nas quais não houve crescimento de *L. sakei* ou *E. coli*, foram medidos em quatro direções, sendo a média dos diâmetros relacionados com a atividade da nisina formada e liberada pelas respectivas culturas em unidades arbitrárias (AU.mL^{-1}), determinada através da curva padrão utilizando nisina comercial como referência. A relação entre (AU.mL^{-1}) e a unidade internacional (IU.mL^{-1}) foi determinada pelo uso de Nisaplin® (preparação de nisina purificada comercial contendo 25 mg de nisina por g de Nisaplin®, que corresponde a 10^6 IU.g^{-1} Nisaplin®; Aplin & Barret, Sigma Chemical); a solução padrão de nisina (Nisaplin®), contendo 250 μg de nisina por mL corresponde a 10^4 AU.mL^{-1} .

A solução de nisina padrão foi preparada dissolvendo 1 g de Nisaplin® em 10 mL de 0,02 M HCl com 0,75% (p/v) de NaCl (pH 1,6–1,8). A solução foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e estocada a 4°C. Diluições foram realizadas em 0,02 M HCl/0,75% NaCl. Para *E. coli*, como microorganismo indicador, a nisina padrão pode ser diluída tanto em água deionizada ou em 0,02 M HCl, e em concentração final de 0,75%(p/v) de NaCl, e de 7,45 mg.mL^{-1} de EDTA. Para a comparação de sensibilidade de *L.sakei* com nisina combinada com EDTA, outra curva padrão foi estabelecida.

Através da curva, as concentrações da nisina padrão (10^0 a 10^5 AU.mL^{-1}) foram relacionadas pelo diâmetro do halo de inibição (H, mm). A atividade da nisina liberada foi determinada e expressa em unidades arbitrárias por mililitro (10^0 a 10^5 AU.mL^{-1}). Baseando-se na correlação das curvas de

calibração (AU.mL⁻¹ e IU.mL⁻¹), 1,09 ± 0,17 AU corresponde a 1,0 IU (40 IU = 1 µg de nisina pura A); conversões para IU foram incluídas nesse trabalho a fim de correlacioná-lo com referências anteriores.

A solução padrão, a qual foi utilizada para todos os ensaios de calibração desse procedimento, apresentou 0,025 mg de Nisina, que corresponde a 10³ AU.mL⁻¹. A atividade de nisina expressa em AU.mL⁻¹ foi convertida para nisina em miligramas por mililitro (mg.mL⁻¹), através da seguinte relação:

$$\text{Nisina}(\text{mg} / \text{mL}) = \frac{(z \times 0.025)}{1000} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde z = AU.mL⁻¹

3 Resultados e Discussão

3.1 Bactéria sensível e a associação entre nisina e EDTA

Utilizando a *E. coli* para avaliar a atividade da nisina em soluções com 7,45 µg.mL⁻¹ de EDTA (Tabela 1), as atividades obtidas variaram de 10¹ a 10⁵ AU.mL⁻¹ de nisina. Nisina mais EDTA em solução aquosa acidificada com HCl (pH 2,5) resultou em atividades de 10 a 10⁵ AU.mL⁻¹ de nisina.

A relação entre ambas as inclinações (1,0693 e 0,783) das curvas padrões mostrou que as unidades arbitrárias foram 37% maiores com a nisina diluída e combinada ao EDTA em solução aquosa (pH 4) se comparada a solução (pH 2,5) ajustada com 0,02 M de HCl. A solução aquosa acidificada reduziu a atividade da nisina no crescimento da *E. coli* em ágar.

Utilizando as células de *L. sakei* para avaliar a atividade da nisina em soluções com 7,45 mg.mL⁻¹ de EDTA, as zonas de inibição variaram de 8.5 mm a 17.5 mm e foram correlacionadas com 10¹ a 10⁵ AU.mL⁻¹ de nisina através da equação de conversão: Log AU.mL⁻¹ = 0,4102 x H – 2,6612,

relacionando a ação da nisina mais EDTA em solução aquosa de pH ajustado com HCl (pH 2,5); (ii) 13,0 mm a 18,25 mm correlacionados com 10^1 a 10^5 UA.mL⁻¹ de nisina através da equação de conversão: $\text{Log AU.mL}^{-1} = 0,7097 \times H - 8,1774$, relacionando a ação da nisina mais EDTA em água (pH 4). A relação entre ambas as inclinações (0,4102 e 0,7097) das curvas padrões proveram unidades arbitrárias 73% maiores para nisina diluída e misturada com EDTA em água (pH 4) comparada a solução aquosa de pH 2,5 ajustada com 0,02M HCl.

O pH baixo em soluções aquosas acidificadas (pH 2,5) diminuiu a suscetibilidade da *E. coli* e do *L. sakei* a nisina, como verificado em trabalhos prévios (VESSONI PENNA et al., 2005), mas o crescimento não foi inibido pela solução de nisina em HCl (pH 2,5) sem agente quelante, adicionada aos poços de *L. sake*. A suscetibilidade de *E. coli* e *L. sakei* a soluções de nisina com EDTA ajustadas a pH 2,5, exibiram maior variabilidade, cerca de 20% entre os halos, para a mesma AU.mL⁻¹ do que com nisina mais EDTA em pH 4,0 de variabilidade aproximadamente 4% (Tabela 8). Examinando as Tabelas 7 e 8, pode ser notado que a associação entre EDTA e nisina aumentou o efeito bactericida sobre a *E.coli*, bactéria Gram-negativa sensível a nisina. *L. sake* se confirmou um indicador biológico Gram-positivo sensível e confiável para detecção de nisina, mesmo sem adição de EDTA.

Também pode ser observado que a formação das zonas de inibição no crescimento de *L.sake* foi maior, cerca de 45%, com nisina mais EDTA em água do que em solução acidificada (pH 2,5), com uma concentração de nisina de 10^1 AU.mL⁻¹ (Tabelas 1). Por outro lado, para *E. coli* com nisina mais EDTA, a zona de inibição foi 30% maior em água (concentração de nisina de 10^1 AU.mL⁻¹) do que em solução acidificada.

As células de *L. sakei* na avaliação da atividade de nisina em leite desnatado (Tabela 7), as zonas de inibição variaram respectivamente de: (i) 5,0 mm a 26,75 mm associados com 10^1 a 10^5 AU.mL⁻¹ de nisina pela equação de conversão $\text{logAU.mL}^{-1} = 0,2307 \times H - 1,4174$, e $\text{logAU.mL}^{-1} = 0,2639 \times H - 0,3641$ para nisina diluída em leite desnatado a pH 4; (ii) 8,75 mm a 22,25 mm associados

com 10^1 a 10^5 AU.mL⁻¹ de nisina pela equação de conversão $\log \text{AU.mL}^{-1} = 0,3211x H - 2,5553$, e $\log \text{AU.mL}^{-1} = 0,3065x H - 1,9808$ para nisina diluída em leite desnatado a pH 6. O pH entre 4 e 6 do leite desnatado mostrou uma variação na suscetibilidade do *L. sake* a nisina de cerca de 20%.

O tratamento com solução de nisina sem EDTA não teve efeito no crescimento da *E. coli*. Somente o sobrenadante, de amostras centrifugadas, tratado com 7,45 mg.mL⁻¹ de EDTA e diluído (1:1) em água foi significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparado com amostras não tratadas (Tabela 8). Por outro lado, o EDTA não influenciou a inibição do crescimento do *L. sake*. Para ambas as cepas de *E. coli* e *L. sake*, a mistura de EDTA em água e sua adição ao sobrenadante (1:1) pareceu aumentar a sensibilidade da célula e resultou em maiores zonas de inibição comparadas aos poços aplicados com EDTA diretamente misturados ao sobrenadante. A mistura de EDTA em água e subsequente adição ao sobrenadante (1:1) mostrou halos de mesmo tamanho para *L. sake* e *E. coli* no ágar inoculado, correspondendo a $1,51 \times 10^3$ AU.mL⁻¹ e $4,5 \times 10^3$ AU.mL⁻¹, respectivamente. Para EDTA misturado diretamente no sobrenadante, os halos de inibição do crescimento de *E. coli* e *L. sake* também foram similares, 13,75 mm e 13 mm, respectivamente, correspondendo a 11 AU.mL⁻¹ e 38 AU.mL⁻¹, com atividade próxima a 33 AU.mL⁻¹ de nisina no sobrenadante não tratado.

A influência do EDTA sobre a suscetibilidade da *E. coli* foi confirmada e a prévia diluição do EDTA em água antes de misturá-lo com o sobrenadante foi significativa. Essa influência também foi confirmada por células de *E. coli* para avaliar a atividade da nisina padrão a concentrações de 50 e 250 µg.mL⁻¹ (2×10^3 AU.mL⁻¹ e 10^4 AU.mL⁻¹) em soluções com adição de EDTA. As zonas de inibição foram maiores para soluções misturadas com EDTA diluído anteriormente e variaram de 15,75 mm a 17 mm, correspondendo a $2,4 \times 10^3$ AU.mL⁻¹ e $5,27 \times 10^4$ AU.mL⁻¹, às de soluções de nisina padrão adicionadas de EDTA diretamente (13 mm e 13,5 mm, respectivamente, correspondendo a $1,2 \times 10^3$ AU.mL⁻¹ e $2,9 \times 10^3$ AU.mL⁻¹), dez vezes maiores. Outros estudos são necessários para determinar as causas desta discrepância pela adição de EDTA diretamente ou

diluído em água; podendo estar relacionadas a diferenças na solubilização do EDTA sobre as respectivas condições.

O efeito bactericida da nisina nos organismos Gram-negativos pode ser melhorado quando usado em combinação com outro agente antimicrobiano, como por exemplo, agentes quelantes (FANG e TSAI, 2004; UKUKU e FETT, 2004; VAARA, 1992; HAUBEN et al., 1996; VESSONI PENNA et al., 2003, GILL e HOLLEY, 2003; VESSONI PENNA et al., 2005).

CUTTER e SIRAGUSA (1995) observaram que a nisina com a adição de quelantes exibiu melhor atividade antimicrobiana sobre patógenos Gram-negativos em meio de cultura. Contudo, essa combinação se mostrou menos efetiva quando aplicada em sistemas alimentares reais.

FANG e TSAI (2003) estudaram o efeito inibitório de antimicrobianos e de sua combinação com EDTA sobre *E. coli* O157:H7 em hambúrgueres a 10°C. Eles observaram que a associação de nisina (10^3 UI.mL⁻¹) e EDTA (7,45 mg.mL⁻¹) misturados a amostras de hambúrgueres (adicionadas ou não de 1,5% CaCl₂) mostrou significativa inibição do crescimento de *E. coli* comparada a amostras tratadas com nisina ou EDTA apenas. O efeito da associação nisina-EDTA foi similar em outros experimentos e confirmou nossos resultados.

Verificamos que a presença de EDTA foi essencial para a melhora da atividade da nisina na inibição do crescimento de *E. coli*. Entretanto, *L. sake* foi mais sensível para avaliação da liberação de nisina no meio de cultura.

O mecanismo de inibição do crescimento pelo EDTA não está completamente esclarecido, mas é geralmente atribuída a sua atividade quelante. O EDTA liga-se primariamente a cátions bivalentes (SHELEF e SEITER, 1993) presentes no sobrenadante obtido do meio de cultivo. Portanto, podemos inferir que a lavagem de células deveria ser o bastante para extrair a maioria dos sais do meio de cultura, de maneira que a ação do EDTA para desestabilizar a membrana de algumas cepas Gram-negativas pela quelação de cálcio e magnésio, necessários para que os lipopolissacarídeos

(LPS) se liguem a parede celular, não fosse limitada (SHELEF e SEITER, 1993; GRAY e WILKSON, 1965; LEIVE, 1965). É possível que a adição de EDTA cause privação de cálcio e magnésio nas células, ou que o EDTA seja tóxico as células por outro mecanismo.

Foi observado que a formação de grandes halos inibitórios ocorreu quando EDTA e nisina foram diluídos em água antes de misturá-los a pH $4,3 \pm 0,5$. Em todas as amostras, para ambas as bactérias sensíveis, a diluição em solução aquosa com HCl a pH 2,5 proveram halos de menor diâmetro quando comparados aos halos formados usando água mais EDTA. Isso pode estar relacionado ao pKa do EDTA e seu efeito como quelante.

BRANEN e DAVIDSON (2004) confirmaram que o EDTA aumenta o atividade sinérgica da nisina, monolauril e da lisozima, aplicados em caldo TSB, contra duas cepas enterohemorrágicas de *E. coli*, mas não obtiveram atividade contra cepas de *Salmonella enteritidis* ou *P. fluorescens*. Entretanto, os autores observaram que nenhum dos antimicrobianos estudados combinados com EDTA mostraram atividade em leite UHT a 25°C, contra as mesmas cepas de microrganismos, demonstrando que a atividade em um sistema contendo alimentos pode ser afetados por uma série de fatores, tais como gordura, proteínas, sais e temperatura de estocagem das amostras. Assim como os resultados deste trabalho, que demonstraram que a associação de EDTA-nisina em água foi mais efetiva contra as células de *E. coli* do que em MRS contendo leite desnatado

3.2 Fermentação

A adição de 50% de leite desnatado a 50% de caldo MRS após incubação por 16 h mostrou aumento na expressão de nisina a partir do crescimento de *L. lactis* por fermentação, tendo como atividade 5,934 AU.mL⁻¹, quatro vezes maior que 1,377 AU.mL⁻¹, atividade obtida com 8 h de fermentação, com a demanda constante de 50-55% de O₂ e pH entre $4,5 \pm 0,5$ (Figura 9). Até o presente momento, ensaios foram realizados com inoculos da 1ª e 2ª culturas de transferência por 8 h

e 16 h de fermentação, respectivamente. Os dados obtidos dos parâmetros de fermentação foram 22 vezes menores que os valores obtidos da expressão de nisina por crescimento de *L. lactis* em 25% de leite e 25% de caldo MRS (com a 4ª cultura de transferência como inoculo) em agitador rotatório (100 rpm) por 36 h a 30°C, observado em estudos anteriores (VESSONI PENNA, et al. 2005). Esses estudos (VESSONI PENNA, et al. 2005) indicaram que os parâmetros de crescimento por fermentação podem ser melhorados através de meio de cultura (25% de leite e 25% de caldo MRS) inoculado pelas 3ª, 4ª e 5ª culturas de transferência de *L. lactis*.

Apesar de a expressão de nisina (AU.mL^{-1}) ter sido observada durante a fermentação, o seu aumento constante observado em 8 h de fermentação foi coincidente com a estabilização do consumo de O_2 , na qual a concentração de O_2 foi ajustado ao crescimento celular.

Figura 1. Consumo de oxigênio e atividade de nisina na fermentação (● 1º inóculo AU.mL^{-1} ; ◆ 1º inóculo $\% \text{O}_2$; * 2º inóculo AU.mL^{-1} ; Δ 2º inóculo $\% \text{O}_2$). Meio de cultivo com 50% de leite desnatado e 50% MRS, iniciadas com o 1º inóculo (agitador rotacional) sendo a equação de conversão $\text{AU.mL}^{-1} = 10^{(0.2307 \cdot H - 1.4174)}$; na fermentação iniciada com o 2º inóculo (agitador rotacional) sendo a equação de conversão $\text{AU.mL}^{-1} = 10^{(0.3211 \cdot H - 2.5553)}$.

Tabela 1 Curvas Padrão e Equações de conversão associadas aos halos de inibição (H, mm, sem o crescimento de *E.coli* ou *L.sakei*)

Atividade de Nisina Padrão (AU.ml⁻¹)

Cepas	Soluções	pH	halos de inibição (SD = ±0.5 mm)					AU.ml ⁻¹	R ²
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
<i>E. coli</i>	Nisina com EDTA em 0,02N HCl	2,5	10	12,5	13,25	14,5	14,75	10 ^(0.783*H - 7.1011)	0,94
	Nisina com EDTA em H ₂ O	4	13,3	14,8	15,7	16,25	17	10 ^(1.0693*H - 13.456)	0,96
	Nisina com EDTA em 0,02N HCl	2,5	8,5	11,5	14,75	16,75	17,5	10 ^(0.4102*H - 2.6612)	0,95
<i>L. sake</i>	Nisina com EDTA em H ₂ O	4	13	14	16,25	17,25	18,25	10 ^(0.7097*H - 8.1774)	0,97
	Nisina em leite desnatado	4	10	15,25	19,25	24,5	26,75	10 ^(0.2307*H - 1.4174)	0,98
	Nisina em leite desnatado com EDTA	4	5	17	19,8	22,31	23,56	10 ^(0.2639*H - 0.3641)	0,98
	Nisina em leite desnatado	6	10,75	14	18,5	21	22,25	10 ^(0.3211*H - 2.5553)	0,96
	Nisina em leite desnatado com EDTA	6	8,75	14,5	16,75	20,5	20,75	10 ^(0.3065*H - 1.9808)	0,92

Tabela 2. Halos de inibição (H, mm, sem o crescimento de *E.coli* ou *L.sake* growth) convertidos em atividade de nisina (AU.ml⁻¹) dos sobrenadantes (amostras centrifugadas, fermentador) ou nisina padrão, associadas com 7,45 mg.ml⁻¹ EDTA diluído em água ou 0,02N HCl, contendo 0,75% NaCl . Metodologia de difusão em agar.

		<i>L.sake</i>			
		Atividade de nisina			
		Halos	Equação de conversão		
Amostras fermentador	pH	Mm	AU.ml ⁻¹	AU.ml ⁻¹	Log ₁₀
A – com EDTA em água (1:1)	4	16	10 (0.7097*H - 8.1774)	1,505	3,18
B – com EDTA em 0,02N HCl (1:1)	2	11,5	10 (0.4102*H - 2.6612)	114	2,06
C – com EDTA	4,8	13,75	10 (0.7097*H - 8.1774)	38	1,58
D – sem tratamento (sem EDTA)	4,8	12,25	10 (0.33211*H-2.5553)	33	1,51

		<i>E.coli</i>			
		Atividade de nisina			
		Halos	Equação de conversão		
Amostras fermentador	pH	Mm	AU.ml ⁻¹	AU.ml ⁻¹	Log ₁₀
A - com EDTA em água (1:1))	4	16	10 (1.0693*H - 13.456)	4,495	3,65
B com EDTA em 0,02N HCl (1:1)	2	0	10 (0.783*H - 7.1011)	nd	
C – com EDTA	4,8	13	10 (0.783*H - 7.1011)	11	1,05
D – sem tratamento (sem EDTA)	4,8	0	10 (0.783*H - 7.1011)	nd	

nd = sem detecção

		<i>E.coli</i>			
		Atividade de nisina			
		Halos	Equação de conversão		
Solução padrão de nisina	pH	mm	AU.ml ⁻¹	AU.ml ⁻¹	Log ₁₀
50 µg.ml ⁻¹ nisina (2x10 ³ AU.ml ⁻¹) Em água	4	15,75	10 (1.0693*H - 13.456)	2,429	3,39
50 µg.ml ⁻¹ nisina (2x10 ³ AU.ml ⁻¹) em HCl	2	13	10 (0.783*H - 7.1011)	1,197	3,08
50 µg.ml ⁻¹ nisina (2x10 ³ AU.ml ⁻¹) em HCl:água (1:1)	2	13	10 (0.783*H - 7.1011)	1,197	3,08
250 µg.ml ⁻¹ nisina (1x10 ⁴ AU.ml ⁻¹) Em água	4	17	10 (1.0693*H - 13.456)	52,735	4,72
250 µg.ml ⁻¹ nisina (1x10 ⁴ AU.ml ⁻¹) em HCl	2	13,5	10 (0.783*H - 7.1011)	2,947	3,47
250 µg.ml ⁻¹ nisina (1x10 ⁴ AU.ml ⁻¹) em HCl:água (1:1)	2	14,8	10 (0.783*H - 7.1011)	30,711	4,49

4 Referências Bibliográficas

103. BRANEN, J.K. e DAVIDSON, P.M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. (2004), **Int. J. Food Microbiol.** 90, 63-74.
- CUTTER C. N. e SIRAGUSA G. R. Reductions Of *Listeria Innocua* And *Brochothrix Thermosphacta* On Beef Following Nisin Spray Treatments And Vacuum Packaging. **Food Microbiology**, 1996.13(1), 23-33p
104. FANG, T.J.; HUNG-CHI TI. Growth patterns of *E. coli* O157:H7 in ground beef treated with nisin, chelator, organic acids and their combinations immobilized in calcium alginate gels. **Food Microbiology**, London, v. 20(2), p. 243–253, abr. 2004.
105. GRAY, G.W. e WILKSON, S.G. The action of ethylenediaminetetra-acetic acid on *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Appl. Microbiol.** 28, 153. (1965),
106. GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Interactive Inhibition Of Meat Spoilage And Pathogenic Bacteria By Lysozyme, Nisin and EDTA In The Presence Of Nitrite And Sodium Chloride At 24 Degrees C. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 80, p. 251-259, 2003
107. HAUBEN, K.J.A., WUYTACK, E.Y., SOONTJENS, C.C.F.; MICHIELS, C.W. High Pressure Transient Sensitization of *Escherichia Coli* To Lysozyme And Nisin By Disruption Of Outer-Membrane Permeability. **Journal Food Protection**, v. 59, p. 350–355, 1996
108. SHELEF, L.A. e SEITER, J. (1993), In: Davidson, P.M., Branen, A.L., ed., Antimicrobial in Foods, Marcel Dekker, New York, pp. 539-569.
109. UKUKU D.O. e FETT W. Behaviour Of *Listeria Monocytogenes* Inoculated On Cantaloupe Surfaces And Efficacy Of Washing Treatments To Reduce Transfer From Rind To Fresh-Cut Pieces. **Journal of Food Protection**, 2004. 2143-2150.

110. VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiology Reviews**, v. 56, p. 395-411, set. 1992
111. VESSONI PENNA, T.C; MORAES, D.A. Optimization Of Nisin Production By *Lactococcus lactis*, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 775-789, 2002.
112. VESSONI PENNA, T.C.; JOZALA, A.F.; NOVAES, L.C.L; PESSOA-JR., A; CHOLEWA, O. Production Of Nisin By *Lactococcus Lactis* In Media With Skimmed Milk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121-124, p.1-20, 2005.

PRODUÇÃO DE NISINA UTILIZANDO *Lactococcus lactis* EM SORO DE LEITE SUPLEMENTADO

SUBMETIDO PAR APUBLICAÇÃO: PROCESS BIOCHEMISTRY

1 Introdução.....	97
2 Materiais e Métodos.....	97
2.1 Cepas Bacterianas e meio de cultivo	97
2.2 Cultivo por batelada.....	97
2.3 Análise da Atividade de Nisina	98
3 Resultados e Discussão	99
4 Referências Bibliográficas	107

Lista de Figuras

Legenda		Páginas
Figura 1	Atividade de Nisina em soro de leite em concentração S100 (100g/L) e S50 (50 g/L) utilizando células de <i>L. lactis</i> nas transferências dos meios de cultivo (36h/100rpm/30°C).	104
Figura 2	Atividade de Nisina em soro de leite suplementado A1 e A2 utilizando células de <i>L. lactis</i> nas transferências dos meios de cultivo (36h/100rpm/30°C).	106

Lista de tabelas

Legenda		Páginas
Tabela 1	Concentração em g.L ⁻¹ dos meios de cultura	99
Tabela 2	Atividade e concentração de Nisina nas cinco transferências, após 36 h do cultivo de <i>L. lactis</i> (100rpm/30°C), nos meios de cultivos contendo soro de leite	104
Tabela 3	Atividade e concentração de Nisina nas cinco transferências, após 36 h do cultivo de <i>L. lactis</i> (100rpm/30°C), nos meios de cultivos contendo soro de leite suplementado	106

1 Introdução

Este capítulo elucida parte do projeto desenvolvido na Universidade do Minho, Braga, Portugal, do qual o objetivo foi estudar a produção de nisina utilizando soro de leite suplementado e conhecer o comportamento do peptídeo em cromatografia de interação hidrofóbica.

2 Materiais e Métodos

2.1 Cepas Bacterianas e meio de cultivo

A cepa produtora de nisina *Lactococcus lactis* ATCC 11454 e o microorganismo sensível a ação de nisina *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 foram utilizados neste estudo. Ambos foram mantidos em estoque congelado a -80°C em meio MRS (Difco, Detroit, MI) com 40% (v/v) de glicerol (JOZALA et al., 2007). O soro de leite foi generosamente fornecido em forma liofilizada por uma indústria de laticínios de Portugal (LACTOGAL, Produtos Alimentares S.A., Portugal). No primeiro grupo de ensaios o soro foi preparado com água destilada em 4 diferentes concentrações: (i) 100 g.L^{-1} ; (ii) 50 g.L^{-1} ; (iii) 30 g.L^{-1} e (iv) 10 g.L^{-1} , o pH foi ajustado em 6,5 com NaOH 0,1M e esterilizados a 121°C por 30 minutos. No segundo grupo de ensaios duas formulações diferentes foram preparadas a partir do soro de leite em concentração de 100 g.L^{-1} , contendo (i) extrato de levedura 5 g.L^{-1} (ii) extrato de levedura 5 g.L^{-1} e extrato de tomate 10 g (p/v) .

2.2 Cultivo por batelada

O pré-cultivo foi elaborado com $100\text{ }\mu\text{l}$ da cultura estoque de *L. lactis* (10^8 UFC.ml^{-1}) sendo cultivado em 50 ml de caldo MRS (100 rpm/36 h/ 30°C) em erlenmeyer de 250 ml.

Do pré-cultivo alíquotas de 5ml da suspensão bacteriana foram transferidas para 50ml do meio experimental, em frascos de 250ml, que foram incubados por outro período de 36 h (100rpm/30°C). As transferências e a incubação de cada novo meio foram repetidas 5 vezes (1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª transferências).

Após o período de 36 horas de incubação, 5ml da suspensão celular foi assepticamente retirada dos frascos para analisar os valores pH e a concentração de nisina. Possíveis contaminações foram monitoradas pela técnica de coloração de Gram.

2.3 Análise da Atividade de Nisina

A atividade de nisina foi avaliada pelo método de difusão em ágar. Para a detecção da atividade de nisina, a suspensão celular foi centrifugada a 13.201g por 10 min a 10°C, e o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de 0,22 µm. As concentrações de nisina liberadas no meio de cultura foram quantificadas e expressas em unidades arbitrárias (AU.ml⁻¹) (JOZALA et al., 2007; VESSONI PENNA et al., 2006) utilizando *L. sakei* como bioindicador.

O cultivo de *L. sakei* foi realizado utilizando caldo MRS (100rpm/30°C/24h). Uma alíquota de 1mL da suspensão previamente diluída a 10⁵ UFC/mL, foi transferida e homogeneizada em 250 ml de ágar-soft MRS (caldo MRS com 0,8% p/v de ágar bacteriológico) , o agar foi invertido em placas de Petri (± 20 ml em cada placa) Após a solidificação do ágar, poçinhos de 3mm de diâmetro foram feitos com o auxílio de um cortador de metal, previamente esterilizado.

Em todas as amostras, 50 µl do sobrenadante da suspensão centrifugada de *L. lactis* foram transferidas nos poços do ágar inoculado com *L. sakei*.

As placas, sem inverter, foram incubadas a 30°C por 24hs. Após, os diâmetros de inibição do crescimento foram medidos em 4 direções e a media dos diâmetros dos halos relacionados com as

unidades arbitrárias (AU/ml) de atividade de nisina formada na respectiva cultura. Os resultados foram comparados a uma curva padrão obtida com a nisina comercial.

A curva padrão foi preparada através da solução estoque de nisina, adição de 1g de nisina comercial em 10 ml de 0,02 M HCL (Nisin®, Sigma, St. Louis, MO – padrão com atividade de 10^6 AU, contendo 25000 μg de nisina por g). A relação entre unidade arbitrária ($\text{AU}\cdot\text{ml}^{-1}$) e diâmetro dos halos (H, mm) foi determinada pelas concentrações de nisina padrão (10^1 to 10^5 $\text{AU}\cdot\text{ml}^{-1}$). A atividade de nisina expressa em $\text{AU}\cdot\text{ml}^{-1}$ foi convertida em miligramas por mililitros ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), através da relação: Nisina ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) = ($z \times 0,025$), onde $z = \text{AU}\cdot\text{ml}^{-1}$ e 0,025 é um valor de conversão relacionado com 2.5% de nisina comercial.

3 Resultados e Discussão

A influência do soro de leite no comportamento do *L. lactis* foi analisada retirando-se 5 mL da cultura de cada processo de transferência do microrganismo, como reportado em nossos trabalhos anteriores (JOZALA et al. 2005, 2006, 2007; VESSONI PENNA et al. 2005,2006).

Os pré-cultivos de *L. lactis* em caldo MRS, apresentaram as atividades de 3,27 e 3,37 $\log\text{AU}\cdot\text{mL}^{-1}$, correspondente a 46,53 e 58,17 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ambos utilizados para iniciar os cultivos utilizando soro de leite, respectivamente, e um crescimento de aproximadamente 10^6 $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. O crescimento das células e a formação de nisina, no pré-cultivo, se devem ao fato do caldo MRS conter nutrientes complexos, mantendo condições ideais para o início dos ensaios nos meios de cultura compostos de soro de leite e suplementos (Tabela 1), denominados por S100, S50, S30, S10, A1 e A2.

Tabela 1. Concentração em g.L⁻¹ dos meios de cultura

	S10	S30	S50	S100	A1	A2
soro de leite	10	30	50	100	100	100
extrato de levedura	-	-	-	-	5	-
extrato de tomate	-	-	-	-	-	10

Os meios S100 e S50 apresentaram os melhores resultados (i) S100 apresentou crescimento do microrganismo durante as transferências e a atividade de nisina foi detectada apenas na 2ª e 5ª transferência, correspondendo a atividade de 2,56 e 3,33 logAU, respectivamente. Nas transferências os valores de pH foram de 5 e 5,44, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para o meio S50, sendo a atividade de nisina detectada na 1ª e 5ª transferência, 2,59 e 2,65 logAU, e valores de pH 5,45 e 5,68 respectivamente. Nos meios S30 e S10 não houve crescimento celular.

Apesar do meio de cultivo S100 e S50 apresentarem as melhores condições para o desenvolvimento das células de *L. lactis* e a liberação de nisina (Tabela 2, figura 1), em relação aos resultados apresentados pelos meios S10 e S30, não foi possível uma linearidade nas atividades detectadas, a hipótese levantada para este modelo de resultado pode estar ligada a ausência de nutrientes no meio de cultura, como reportado no trabalho realizado por JOZALA et al. (2007), onde observaram que o equilíbrio da concentração dos nutrientes em um meio de cultivo foi essencial para a maior produtividade de nisina pelas células de *L. lactis*.

Além disso, as bactérias lácticas são fastidiosas e requerem meios de cultivo de alto valor nutricional, dos quais melhoram o crescimento e a produção de bacteriocinas (JOZALA et al., 2007). Muitos artigos descrevem os caldos MRS e M17 como ótimos meios de cultivo utilizados para o crescimento celular e produção de bacteriocina pelo *Lactococcus lactis* (BISWAS et al., 1991; DABA

et al.,1993; REID; MACGROARTY, 1988; tem BRINK et al., 1994; TÓBA et al., 1991; CHEIG et al., 2002).

Observado os resultados dos cultivos realizados em soro de leite, optou-se por utilizar suplementos nutricionais. Através da bibliografia do texto, buscamos trazer para os ensaios contidos neste trabalho, meios de cultivos que favoreçam o crescimento e a excreção de nisina pelo microrganismo. Segundo o site da ATCC (<http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx>) o meio de cultivo ideal a ser utilizado para o desenvolvimento das células de *L. lactis* contém extrato de levedura, suco de tomate e leite, partindo desse ponto elaborou-se 2 meios de cultivo contendo, separadamente, extrato de levedura e tomate. (tabela 1)

A suplementação dos meios de cultivo resultou em melhor adaptação das células produtoras de nisina, observou-se que durante as transferências uma maior linearidade dos resultados. No meio de cultivo A1, contendo extrato de levedura, a atividade de nisina foi observada na 1ª transferência 2,85 logAU, correspondendo a 17,79 mg.L⁻¹, pH 4,55 e crescimento celular de aproximadamente 10⁴ log UFC/mL. O pico de atividade foi detectado na 5ª transferência 3,07 correspondendo a 29,18 mg.L⁻¹, pH 4,65 e crescimento celular de aproximadamente 10⁵ log UFC.mL⁻¹. Observou-se que na 2ª transferência não foi detectada atividade da nisina, fato que pode estar relacionado ao valor de pH que estava em 5,15 (Tabela 3, figura 2).

No meio de cultivo A2, contendo o extrato de tomate, a atividade de nisina foi observada durante as três primeiras transferências, sendo os valores 2,73, 3,01, 2,91 logAU, respectivamente da primeira a terceira. Na 5ª transferência a atividade detectada foi de 3 logAU, pH 4,54 e crescimento celular de 10⁴ UFC.mL⁻¹. O crescimento celular manteve-se estável durante todo o processo. Entretanto, não foi detectada atividade de nisina na 4ª transferência, fato atribuído para o aumento de pH. Esse mesmo fenômeno ocorreu no ensaio contendo o meio de cultivo A1, na 2ª transferência não

apresentou atividade de nisina e o valor de pH estava similar ao da 4ª transferência do ensaio contendo meio de cultivo A2, ao redor de 5,15 (Tabela 3, figura 3).

Em valores de pH inferiores a 6, pelo menos, 80% da nisina expressa pelas células é liberada no meio de cultivo. Enquanto em pH superiores a 6 a maioria da nisina pode ser retida na membrana celular ou estar dentro das células (ARAUZ et al., 2008).

A partir da abordagem dos resultados em relação aos valores de pH, foram realizadas as análises de extração da nisina, adaptando-se a metodologia descrita por (YANG; JOHNSON e RAY, 1992). Os resultados indicaram a não atividade de nisina pós o tratamento, indicando que toda a nisina produzida foi excretada pelas células.

Neste trabalho, nos ensaios utilizando suplementação extra de nutrientes, a maior atividade de nisina foi detectada em valores de pH < 5, para tanto, no estudo utilizando apenas o soro de leite os maiores valores de atividade de nisina foram detectados em pH > 5.

Comparando os dois ensaios, com e sem suplementação, o soro de leite suplementado mostrou ter o melhor desempenho para a produção da bacteriocina pelas células, provavelmente a maior concentração de nisina foi relacionada as fontes de nitrogênio presentes no meio.

Guerra e colaboradores (2007) estudaram o cultivo utilizando soro de leite em fermentações por batelada por 18h, e observaram maior produção de nisina no soro diluído (misturado com água de reuso) 22,9 BU.ml⁻¹ (BU – Unidades de Bacteriocinas) em relação ao soro concentrado (líquido remanescente após a primeira prensagem do queijo) 8,3 BU.ml⁻¹, apesar do fato que a atividade metabólica (consumo de nutrientes) tenha sido maior no soro concentrado. Este fato pode sugerir a possibilidade de efeito de inibição pelo substrato.

Jozala e colaboradores (2007) mostraram que componentes nutricionais do leite desnatado diluído com 2,27g sólidos totais (máximo de nisina 501,93 mg.L⁻¹), influenciou a expressão de nisina pelas células durante o cultivo, sugerindo que o soro de leite pode aumentar a produção de nisina e reduzir

o custo de produção desta biomolécula. De acordo com o exposto, os máximos valores de nisina obtidos, neste presente estudo, em soro de leite sem filtração ($11120,13 \text{ mg.L}^{-1}$) foi 22 vezes maior que o leite desnatado diluído mencionado. Como o meio de cultura de baixo custo, o altamente nutritivo conteúdo do leite e o soro de leite fornecem um excelente crescimento de *L. lactis* e expressão de nisina.

No trabalho desenvolvido por Arauz e colaboradores (2008) a utilização do soro de leite sem a suplementação extra de nutrientes, mostrou ser um ótimo substrato para a formação e dispersão de nisina por *L. lactis*.

O pré-cultivo de *L. lactis* em MRS, com uma concentração média de $46,53 \text{ mg.L}^{-1}$, estimulou a expressão de nisina na primeira transferência de (i) S100 ($1153,03$ e $7595,56 \text{ mg.L}^{-1}$) e (ii) com filtração ($6,83 \text{ mg.L}^{-1}$), devido aos nutrientes complexos do caldo MRS que possibilitaram uma formação de nisina a partir das células da cultura estocada.

Os resultados obtidos demonstraram que a utilização do soro de leite, um subproduto da indústria alimentícia, pode ser utilizado como substrato para a formação e dispersão de nisina por *L. lactis*, como reportado anteriormente (ARAUZ et al., 2008; JOZALA et al., 2007). Este meio de baixo custo, usado em culturas microbianas, promove vantagens econômicas, reduzindo a poluição do meio ambiente e estimulando os pesquisadores para a utilização deste subproduto.

Arauz e colaboradores 2008 demonstraram que o soro de leite, acidificado, líquido, residual de indústria sem suplementação foi ideal na formação e dispersão de nisina pelas células de *L. lactis*. Nossos resultados mostraram que o soro de leite em pó pode ser utilizado como meio de cultivo desde que seja suplementado com fontes de nitrogênio. A hipótese apontada para estes resultados esta associada ao tipo de tratamento que o soro de leite possa ter recebido.

A utilização do soro de leite, um efluente, pode ser reciclado contribuindo para a diminuição da poluição ambiental e ainda utilizado para a produção de biomoléculas. Estudos futuros poderão ser realizados baseados nas diferentes concentrações de suplementos em soro de leite em pó.

Tabela 2. Atividade e concentração de Nisina nas cinco transferências, após 36 h do cultivo de *L. lactis* (100rpm/30°C), nos meios de cultivos contendo soro de leite.

Soro de leite 100g/L (s100)						
transferencias	UFC/mL	pH	halos (mm)	AU/mL	log(AU)	mg/mL
pré (MRS)	2,50E+06	4,89	19,62	1861,02	3,27	46,53
1	1,30E+04	5,41	-	-	-	-
2	8,70E+04	5	13,64	364,77	2,56	9,12
3	1,90E+05	5,58	-	-	-	-
4	2,13E+05	5,68	-	-	-	-
5	4,20E+05	5,44	20,16	2157,39	3,33	53,93

Soro de leite 50g/L (S50)						
transferencias	UFC/mL	pH	halos (mm)	AU/mL	log(AU)	mg/mL
pré (MRS)	2,50E+06	4,89	19,62	1861,02	3,27	46,53
1	1,70E+04	5,45	13,91	393,15	2,59	9,83
2	3,20E+04	5,33	-	-	-	-
3	1,70E+05	5,76	-	-	-	-
4	1,80E+05	5,59	-	-	-	-
5	2,20E+05	5,68	14,40	449,28	2,65	11,23

Soro de leite 30g/L (s30)						
transferencias	UFC/mL	pH	halos (mm)	AU/ml	log(AU)	mg/mL
pré (MRS)	2,50E+06	4,82	19,62	1861,02	3,27	46,53
1	-	4,33	-	-	-	-
2	-	5,2	-	-	-	-
3	-	5,26	-	-	-	-
4	-	5,39	-	-	-	-
5	-	5,5	-	-	-	-

Soro de leite 10g/L (s10)						
transferencias	UFC/mL	pH	halos (mm)	AU/ml	log(AU)	mg/mL
pré (MRS)	2,50E+06	4,82	19,62	1861,02	3,27	46,53
1	-	4,1	-	-	-	-
2	-	5,33	-	-	-	-
3	-	5,76	-	-	-	-
4	-	5,59	-	-	-	-
5	-	5,68	-	-	-	-

^a Unidades arbitrárias por mililitros: $AU/ml = 10^{(0.1183 \times H + 0.949)}$, em que H = diâmetro do halo (mm). ^b Concentração de Nisina: $mg/ml = (x) \times 0.025$, em que x = atividade ($AU \cdot ml^{-1}$) e 0,025 é um valor de conversão relacionado com 2.5% de nisina comercial.

Figura 1. Atividade de Nisina em soro de leite em concentração S100 (100g/L) e S50 (50 g/L) utilizando células de *L. lactis* nas transferências dos meios de cultivo (36h/100rpm/30°C).

Tabela 3. Atividade e concentração de Nisina nas cinco transferências, após 36 h do cultivo de *L. lactis* (100rpm/30°C), nos meios de cultivos contendo soro de leite suplementado

Soro de leite 100g/L e extrato de levedura 5g/L (A1)						
transferencias	UFC/mL	pH	halos (mm)	AU/mL	log(AU)	mg/mL
pré (MRS)	2,50E+06	4,96	20,44	2326,78	3,37	58,17
1	1,70E+04	4,55	16,09	711,46	2,85	17,79
2	3,20E+04	5,15	-	-	-	-
3	1,70E+05	5,04	16,57	810,84	2,91	20,27
4	1,80E+05	4,96	16,59	815,27	2,91	20,38
5	2,20E+05	4,65	17,91	1167,24	3,07	29,18

Soro de leite 100g/L; extrato de levedura 5g/L e extrato de tomate 10 mL (v/v) (A2)						
transferencias	UFC/mL	pH	halos (mm)	AU/mL	log(AU)	mg/mL
pré (MRS)	2,50E+06	4,96	20,44	2326,78	3,37	58,17
1	1,20E+03	4,53	15,04	534,49	2,73	13,36
2	1,50E+04	5,16	17,73	1113,67	3,05	27,84
3	1,60E+04	4,98	16,55	806,43	2,91	20,16
4	1,80E+04	4,89	-	-	-	-
5	2,00E+04	4,54	17,31	993,27	3,00	24,83

Figura 2. Atividade de Nisina em soro de leite suplementado A1 e A2 utilizando células de *L. lactis* nas transferências dos meios de cultivo (36h/100rpm/30°C).

4 Referências Bibliográficas

3. ARAUZ LJ; JOZALA AF; PINHEIRO GS; MAZZOLA PG; PESSOA-JÚNIOR A, VESSONI PENNA TC. Nisin expression production from *Lactococcus lactis* in milk whey medium. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v.83, p. 325-328. 2008;
4. BISWAS, S. R.; RAY, P.; JOHNSON, M.C.; RAY, B. Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, Pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57(4), p.1265–1267, abr. 1991.
15. CHEIGH C, KOOK M, KIM S, HONG Y.; PYUN Y. Simple one-step purification of nisin Z from unclarified culture broth of *Lactococcus lactis subsp. lactis* A164 using expanded bed ion exchange chromatography. **Biotechnololy Letters**, Netherlands, v. 26, p. 1341–5, set. 2004;
6. DABA, H.; LACROIX, C.; HUANG, J.; SIMARD, R. E. Influence of growth conditions on production and activity of mesenteric 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteries*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v..39, p.166-173, 1993.
7. DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis subsp. lactis* batch fermentations. **Journal of General Microbiology**, Great Britain, v. 138, p. 571-578, mar.1992.
8. REID, G.; MCGROARTY, J.A., ANGOTTI, R.; COOK, R. L. Lactobacillus inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. **Canadian Journal of microbiology**, v. 34(3), p. 974 – 978, 1988.
20. ten BRINK, B., MINEKUS, M., VAN DER VOSSEN, J. M., LEER, R. J.; HUIS IN'T VELD, J.H. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. **Journal Applied of Bacteriology**, v. 77, p.140-148, ago.1994.

121. TOBA, T.; SAMANT, S.K.; TOSHIOTA, E.; ITOH, T. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, p. 281-286, set. 1991.
122. JOZALA, A.F.; NOVAES, L.C.L; CHOLEWA, O.; VESSONI PENNA, T.C. Increased Of Nisin Produced By *Lactococcus Lactis* in Different Media. **African Journal of Biotechnology**, v. 4(3), p. 262-265, 2005.
123. JOZALA AF, ANDRADE M S, ARAUZ LJ, PESSOA-JÚNIOR A, VESSONI PENNA TC. Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 136-140, p. 515-528, 2007.
124. FLORES, S.H.; ALEGRE, R. M. Nisin production from *Lactococcus lactis* A.T.C.C. 7962 using supplemented whey permeate. **Biotechnology and applied biochemistry**, London, v. 34(2), 103-107, out. 2001.
125. MONDRAGÓN-PARADA, M. E., NÁJERA-MARTÍNEZ, M., JUÁREZ-RAMÍREZ, C., GALÍNDEZ-MAYER, J., RUIZ-ORDAZ, N. e CRISTIANI-URBINA, E. Lactic acid bacteria production from whey. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134(3), p. 223-232, 2006.
126. PONGTHARANGKUL, T.; DEMIRCI, A. Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65(3), p.268-2, 2004.
127. VESSONI PENNA, T.C.; JOZALA, A.F.; NOVAES, L.C.L; PESSOA-JR., A; CHOLEWA, O. Production Of Nisin By *Lactococcus Lactis* In Media With Skimmed Milk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121-124, p.1-20, 2005.
128. VESSONI PENNA, T.C.; JOZALA, A.F.; GENTILE, T.R.; PESSOA JÚNIOR, A.; CHOLEWA, O. Detection Of Nisin Expression By *Lactococcus Lactis* Using Two Susceptible Bacteria To Associate The Effects Of Nisin With Edta. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p.334-346, 2006.

Conclusões Gerais

Este trabalho reúne os principais trabalhos desenvolvidos onde o principal objetivo é a obtenção da nisina através de meios de cultivo alternativos, além de sua aplicação e purificação. Visando sempre demonstrar sua possível aplicação futura, pois o Ministério da Saúde prevê a aplicação de nisina em até de 12,5mg/kg. Porém, atualmente a nisina utilizada é importada a preços elevados (R\$1,720.00, em 25g do produto, que contem 2.5% de nisina) que dificultam a sua aplicação imediata em escala hospitalar (lactário, dietas, feridas) mesmo se tratando de antimicrobiano natural.

Ressalta-se a inovação científica e tecnológica deste trabalho no que tange a utilização do soro de leite como meio de cultivo, valorizando o conceito ambiental alinhando com a produção de uma biomolécula de alto valor agregado, pois o soro de leite é um subproduto gerado por indústrias de laticínios e considerado um agente poluidor, por conter uma alta quantidade de matéria orgânica. Aponta-se que no Brasil, 50% do soro de leite é descartado sem tratamento em rios, necessitando de cautela em seu descarte. Neste caso a produção de um antimicrobiano poderia ser associada com a reciclagem, ou a reutilização de material de descarte industrial. Este trabalho demonstrou a possibilidade dessa reutilização, além da utilização de meios de cultivo de baixo custo (leite desnatado diluído) na produção da biomolécula, e ainda possibilitando sua possível extração/purificação diretamente da suspensão do fermentado, representando um importante passo no desenvolvimento de um método de separação com relativo custo-benefício.

No decorrer dos capítulos observa-se esta possível produção com o estudo de ação da nisina contra microrganismos Gram-negativos. Estes estudos da atividade de nisina contra microrganismos gram-negativos estão sendo estudados, mais intensamente, utilizando outras cepas bacterianas Gram-negativas.

Além disso, obtive a bolsa de doutorado sanduíche junto a CAPES e tenho certeza que serei muito beneficiada com a oportunidade de realizar parte deste trabalho em Portugal, pois ao apresentar nossa linha de pesquisa houve interesse em desenvolver um trabalho conjunto abordando inicialmente algumas etapas do projeto.

O objetivo do Doutorado-Sanduiche, além daquele de aprimorar experiência na área de estudo, é dar continuidade e complementação ao Plano de Trabalho já estabelecido no Projeto de Doutorado. Assim, durante o período solicitado para a realização dos experimentos no Departamento de Engenharia Biológica (DEB-UMinho, Portugal) sob a Supervisão do Prof. Dr. José António C. Teixeira serão avaliados a obtenção de Nisina por *Lactococcus lactis* em diferentes processos fermentativos usando como substrato leite desnatado e soro de leite, conforme condições previamente obtidas em agitadores rotativos., em especial a parte relacionada a obtenção de nisina por *L. lactis* em meios de cultivo contendo leite desnatado e subprodutos derivados do leite, adequando-as em escala semi-piloto por aplicação de biorreatores.

No entanto, os resultados de nosso trabalho indicam que a suplementação do meio de cultivo foi essencial para o desenvolvimento celular e a formação de nisina. Pois, o substrato é derivado da reação enzimática do leite realizada na produção de queijos, tido como soro doce e em forma liofilizada. Já o soro utilizado por Arauz e colaboradores proveio de reação ácida e ainda continha água de reuso, a utilização desse soro foi em forma líquida coletada diretamente da indústria. O próximo passo em relação ao estudo de produção de nisina utilizando o soro de leite liofilizada será estudar diferentes concentrações dos suplementos utilizados. E ainda, coletar o leite da indústria e realizar hidrólise enzimática e ácida para comparar o crescimento das células e sua produção de nisina.

DECLARAÇÃO DE DISPENSA DE ANÁLISE EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 20 de setembro de 2007.

Aos membros da Banca Examinadora,

Eu, **Angela Faustino Jozala**, matriculado sob o número **4853079/3** no programa de pós-graduação de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em concordância com minha orientadora, **Professora Doutora Thereza Christina Vessoni Penna**, declaramos, para os devidos fins, que o projeto de doutorado sob título "Produção e Purificação de Nisina produzida por *Lactococcus lactis* em Leite desnatado e Soro de Leite" dispensou análise do Comitê de Ética em Pesquisa e/ou do Comitê de Ética em Experimentação Animal desta instituição.

Msc. Angela Faustino Jozala

Prof. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

OF. AG. USP Inovação / 1262 / 2008

São Paulo, 02 de dezembro de 2008.

REF.: DEPÓSITO DO PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO "PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS E PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE BACTERIOCINAS".

Senhor(a) Professor(a),

Em complemento do OF. AG. USP INOVAÇÃO / 856 / 2008, de 18.08.08, informamos a V.Sa., que o(s) pedido(s) de patente(s) em referência, recebeu(ram) o(s) nº P. I. 0.802.371-9, conforme anexo.

Outrossim, solicitamos a V.Sa. à gentileza de estender este comunicado ao(s) outro(s) inventor(es).

Colocamo-nos à inteira disposição para eventuais esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

Jussara S. Ferreira
Ch. Seq. Apoio a Inovação

Ilm^o(a). Sr^a.
Prof^a. Dr^a. THEREZA CHRISTINA VESSONI PENNA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - FCF
DEPTO.: Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica

AGÊNCIA USP INOVAÇÃO

AV. PROF. LUCIANO GUALBERTO, TRAV. "J", 374 - 7º. ANDAR - BUTANTÃ - SÃO PAULO - S. P. 05508 - 010
TEL.: (11) 3091.4474 / 4415 - FAX.: (11) 3031.0922 - <http://www.inovacao.usp.br> - e-mail: inovacao@usp.br

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PROTOCOLO CEN
14/08/2008 018080051196
14-31 DESP

0000220804024299

Espaço reservado para protocolo

PI0802371-9

DEPÓSITO PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP / FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP

1.2 CNPJ/CPF (se houver): 63.025.530/0001-0 / 43.828.151/0001-45

1.3 Endereço completo: Av. Prof. Luciano Gualberto, Trav. "J", 374, 7º andar - Cidade Universitária - São Paulo - SP / RUA PIO XI, 1500 - ALTO DA LAPA - SÃO PAULO - S.P.

1.4 CEP: 05508-010 / 05468-901

1.5 Telefone: (11) 3091.4474 / (11) 3838.4000 1.6 FAX: (11) 3031.0922 / (11) 3645.4167

☐ Continua em folha anexa

2. Natureza:

☒ 2.1 Invenção

☐ 2.1.1 Certificado de Adição

☐ 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: INVENÇÃO

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição (54):

"PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS E PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE BACTERIOCINAS"

☐ Continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido nº. de

5. Prioridade:

☐ Interna

☐ Unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

Pais ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito
		1 / 1
		1 / 1
		1 / 1

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: THEREZA CHRISTINA VESSONI PENNA

6.2 Qualificação: Farmacêutica, Brasileira, casada 6.3 CPF: 396.159.878-91

6.4 Endereço Completo: Rua Antonio de Macedo Soares, 452 - Campo Belo - S.P.

6.5 CEP: 04607-000

6.6 Telefone: (11) 3091.4474

6.7 Fax: (11) 3031.0942

6.8 E-mail: inovação@usp.br

☒ Continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2, do Ato normativo nº. 127/97:

☒ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):

(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Declaração na forma do art. 2º da Resolução/INPI nº 134 de 13/12/06

☐ 9.1 Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso a amostra de componente do patrimônio genético nacional, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Medida Provisória 2.186-16, de 23/08/01, informando ainda:

9.2 Número e a data da Autorização do acesso correspondente:

Nº:

Data:

9.3 Origem do material genético e do conhecimento tradicional associado, quando for o caso:

☐ continua em anexo

☐ 9.4 Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso a amostra de componente do patrimônio genético nacional, realizado a partir de 30 de junho de 2000.

10. Procurador (74):

10.1 Nome e CPF/CGC: MARIA APARECIDA DE SOUZA

10.2 CPF/CNPJ: 121.846.178-06 API/OAB: API-1833

10.3 Endereço completo: Av. Prof. Luciano Gualberto, Trav. "J", 374, 7º andar - Cidade Universitária - São Paulo - SP.

10.2 CEP: 05508-010

10.3 Telefone (11) 3091.4474

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

☒	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	☒	11.5 Relatório Descritivo	24 fls.
☒	11.2 Procuração	2 fls.	☒	11.6 Reivindicações	2 fls.
☐	11.3 Documentos de prioridade	fls.	☒	11.7 Desenhos	2 fls.
☐	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	☒	11.8 Resumo	1 fls.
☒	11.9 Outros (especificar): Aut. Inventor				4 fls.
	11.10 Total de folhas anexadas:				36 fls.

12. Declaro, sob pena da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

São Paulo, 14 de agosto de 2008.

Local e Data

Assinatura e Carimbo

MARIA APARECIDA DE SOUZA
Procuradora

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: THEREZA CHRISTINA VESSONI PENNA

6.2 Qualificação: Profª. Universitária e Farmacêutica, Brasileira, casada, portadora do R. G. nº 5.133.403 6.3 CPF 396.159.878-91

6.4 Endereço Completo: Rua Antonio de Macedo Soares, 452 – Campo Belo – S.P.

6.5 CEP: 04607-000

6.6 Telefone: (11) 3091.4474

6.7 Fax: (11) 3031.0922

6.8 E-mail: inovacao@usp.br

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.3 Nome: ADALBERTO PESSOA JÚNIOR

6.4 Qualificação: Engenheiro de Alimentos, casado, portador do R. G. nº 11.953.288 - SSP/SP 6.3 CPF 031.440.808-88

6.7 Endereço Completo: Rua Aibi, 16, apto. 114 – Alto da Lapa – S.P.

6.8 CEP: 05054-010

6.9 Telefone: (11) 3091.4474

6.7 Fax: (11) 3031.0922

6.8 E-mail: inovacao@usp.br

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: ANGELA FAUSTINO JOZALA

6.2 Qualificação: Tecnóloga em Saúde, Brasileira, solteira, portadora do R. G. nº 29.526.763X 6.3 CPF 277.141.138-55

6.4 Endereço Completo: Rua Professor João Machado, 502 – São Paulo – S.P.

6.5 CEP: 02927-000

6.6 Telefone: (11) 3091.4474

6.7 Fax: (11) 3031.0922

6.8 E-mail: inovacao@usp.br

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.3 Nome: PRISCILA GAVA MAZZOLA

6.4 Qualificação: Farmacêutica, Brasileira, solteira, portadora do R. G. nº 30.697.877-5 6.3 CPF 292.033.668-14

6.7 Endereço Completo: Rua Pintassilgos, 218, apto 13 – Jd. Itália - Vinhedo – S.P.

6.8 CEP: 13280-000

6.9 Telefone: (11) 3091.4474

6.7 Fax: (11) 3031.0922

6.8 E-mail: inovacao@usp.br

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
DIVISÃO DE BROMATOLOGIA E QUÍMICA
Av.Dr. Arnaldo, 355 - 01246-902 - São Paulo-SP Tel/Fax: (11) 3068.2800/3062.5363

Data: 07/12/2006

Hora: 16:48:50

Via : 1

Laudo de Análise 9871.00/2006

Número do Protocolo : BQ 4644/06

Modalidade de Análise: ORIENTAÇÃO

Programa : ALIMENTOS

Nome do Produto: SORO DE LEITE

Data de Fabricação: NÃO SE APLICA

Data de Validade: NÃO SE APLICA

Número do Lote: NÃO SE APLICA

Registro: NÃO SE APLICA

Defensor: NÃO SE APLICA

Logradouro: NÃO SE APLICA

País: ---

Local de Coleta: RUA JOSÉ MARIA DE OLIVEIRA LIMA, 54 - BUTANTÃ

Requerente: PESSOA FÍSICA

Pessoa de Contato: O MESMO

Documento: S/Nº

Data de Entrada: 21/11/2006

Descrição da Amostra: AMOSTRA ACONDICIONADA EM FRASCO PLÁSTICO (NÃO AUTOCLAVADO)
SOLICITANTE: LUCIANA JUNCIONI DE ARAUZ

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
DIVISÃO DE BROMATOLOGIA E QUÍMICA

Av. Dr. Arnaldo, 355 - 01246-902 - São Paulo-SP Tel/Fax: (11) 3068.2800/3062.5363

Data: 07/12/2006

Hora: 16:48:50

Via : 1

Laudo de Análise 9871.00/2006

Unidade Analítica: SEÇÃO DE LATICÍNIOS

Nome do Ensaio: Substâncias voláteis

Resultado: 97,24 g/100mL

Conclusão: NÃO SE APLICA

Nome do Ensaio: Resíduo mineral fixo

Resultado: 1,55 g/100mL

Conclusão: NÃO SE APLICA

Nome do Ensaio: Glicídios redutores, em lactose

Resultado: 0,47 g/100mL

Conclusão: NÃO SE APLICA

Nome do Ensaio: Gorduras totais

Resultado: 0,013 g/100mL

Conclusão: NÃO SE APLICA

Nome do Ensaio: Proteínas

Resultado: 0,50 g/100mL (f= 6,38)

Conclusão: NÃO SE APLICA

Nome do Ensaio: Valor Energético

Resultado: 4,00 kcal/100mL

Nota: calculado com base nos teores de proteínas , gorduras totais e carboidratos, utilizando os fatores 4, 9 e 4, respectivamente.

Conclusão: NÃO SE APLICA

Unidade Analítica: SEÇÃO DE MICROBIOLOGIA ALIMENTAR

Nome do Ensaio: Contagem padrão em placas (mesófilos)

Resultado: acima de 3×10^2 UFC/mL

Conclusão: NÃO SE APLICA

Nome do Ensaio: Bolores

Resultado: abaixo de 1 UFC/mL

Conclusão: NÃO SE APLICA

Nome do Ensaio: Leveduras:

Resultado: acima de 3×10^2 UFC/mL

Conclusão: NÃO SE APLICA

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
DIVISÃO DE BROMATOLOGIA E QUÍMICA
Av. Dr. Arnaldo, 355 - 01246-902 - São Paulo-SP Tel/Fax: (11) 3068.2800/3062.5363

Data: 07/12/2006

Hora: 16:48:51

Via : 1

Laudo de Análise 9871.00/2006

Observações: 1- Estes resultados têm valor restrito à amostra analisada.
2- A expressão "não se aplica" na conclusão do ensaio significa inexistência de parâmetro de referência na legislação.

Conclusão: NÃO SE APLICA

Em, 07/12/2006

Regina M. Morelli S. Rodrigues
Diretora Substituta Serviço de Alimentos
Instituto Adolfo Lutz

Odair Zenebon
Diretor
Divisão de Bromatologia e Química
RG: 2.679.306

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
DIVISÃO DE BROMATOLOGIA E QUÍMICA
Av.Dr. Arnaldo, 355 - 01246-902 - São Paulo-SP Tel/Fax: (11) 3068.2800/3062.5363

Data: 07/12/2006

Hora: 16:47:57

Via : 1

Laudos de Análise 9870.00/2006

Número do Protocolo : BQ 4644/06

Modalidade de Análise: ORIENTAÇÃO

Programa : ALIMENTOS

Nome do Produto: SORO DE LEITE

Data de Fabricação: NÃO SE APLICA

Data de Validade: NÃO SE APLICA

Número do Lote: NÃO SE APLICA

Registro: NÃO SE APLICA

Detentor: NÃO SE APLICA

Logradouro: NÃO SE APLICA

País: ---

Local de Coleta: RUA JOSÉ MARIA DE OLIVEIRA LIMA, 54 - BUTANTÃ

Requerente: PESSOA FÍSICA

Pessoa de Contato: O MESMO

Documento: S/Nº

Data de Entrada: 21/11/2006

Descrição da Amostra: AMOSTRA ACONDICIONADA EM FRASCO DE VIDRO (AUTOCLAVADO)
SOLICITANTE: LUCIANA JUNCIONI DE ARAUZ

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
DIVISÃO DE BROMATOLOGIA E QUÍMICA

Av. Dr. Arnaldo, 355 - 01246-902 - São Paulo-SP Tel/Fax: (11) 3068.2800/3062.5363

Data: 07/12/2006

Hora: 16:47:59

Via : 1

Laudo de Análise 9870.00/2006

Unidade Analítica: SEÇÃO DE LATICÍNIOS

Nome do Ensaio: Substâncias voláteis

Resultado: 95,92 g/100mL

Conclusão: NÃO SE APLICA

Nome do Ensaio: Resíduo mineral fixo

Resultado: 1,96 g/100mL

Conclusão: NÃO SE APLICA

Nome do Ensaio: Glicídios redutores, em lactose

Resultado: 0,60 g/100mL

Conclusão: NÃO SE APLICA

Nome do Ensaio: Gorduras totais

Resultado: 0,023 g/100mL

Conclusão: NÃO SE APLICA

Nome do Ensaio: Proteínas

Resultado: 0,58 g/100mL (fator= 6,38)

Conclusão: NÃO SE APLICA

Nome do Ensaio: Valor Energético

Resultado: 4,9 kcal/100mL

Nota: calculado com base nos teores de proteínas , gorduras totais e carboidratos, utilizando os fatores 4, 9 e 4, respectivamente.

Conclusão: NÃO SE APLICA

Unidade Analítica: SEÇÃO DE MICROBIOLOGIA ALIMENTAR

Nome do Ensaio: Contagem padrão em placas (mesófilos)

Resultado: acima de 300×10^3 UFC/mL

Conclusão: NÃO SE APLICA

Nome do Ensaio: Bolores e leveduras

Resultado: abaixo de 1 UFC/mL

Conclusão: NÃO SE APLICA

5,8 mg/mL $\rightarrow 1:10 \rightarrow$

$\pm 0,5 - 0,3$ mg/mL

$1:10 \Rightarrow 1:2 - 1:5$

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
DIVISÃO DE BROMATOLOGIA E QUÍMICA
Av.Dr. Arnaldo, 355 - 01246-902 - São Paulo-SP Tel/Fax: (11) 3068.2800/3062.5363

Data: 07/12/2006

Hora: 16:48:00

Via : 1

Laudo de Análise 9870.00/2006

Observações: 1- Estes resultados têm valor restrito à amostra analisada.
2- A expressão "não se aplica" na conclusão do ensaio significa inexistência de parâmetro de referência na legislação.

Conclusão: NÃO SE APLICA

Em, 07/12/2006

Regina M. Morelli S. Rodrigues
Diretora Substituta Serviço de Alimentos
Instituto Adolfo Lutz

Odair Zenebon
Diretor
Divisão de Bromatologia e Química
RG: 2.679.306